Luciana Rodrigues Lisboa Faucz

**Avaliação dos efeitos proliferativos e de síntese induzidos
pela luz intensa pulsada em fibroblastos
e células endoteliais humanas**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Faucz, Luciana Rodrigues Lisboa

Avaliação dos efeitos proliferativos e de síntese induzidos pela luz intensa pulsada em fibroblastos e células endoteliais humanas / Luciana Rodrigues Lisboa Faucz. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Lasers 2.Colágeno 3.Células endoteliais 4.Luz intensa pulsada
5.Fotoenvelhecimento 6.Lesões vasculares

USP/FM/DBD-060/11

Dedico esse trabalho...

Ao meu marido **Rafael,**

Companheiro, amigo, conselheiro, incentivador...

Você é o maior exemplo de caráter e honra que eu já conheci

Tenho muito orgulho de fazer parte da sua história

Amo você demais!

Aos meus pais **Joaquim e Valmira,**

Responsáveis diretos por tudo que sou hoje

Valeu cada quilômetro de distância,

Cada lágrima derramada de saudades...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria**, por ter me ensinado a ver a pesquisa com outros olhos. O seu amor pela ciência contagia. Obrigada pela paciência que teve durante todo este trabalho.

A todos os meus **familiares na Bahia, irmãos, sobrinhos, primos e tios**. Apesar da distância, sei que todos torceram por mim.

Ao **Dr. Renato Faucz e Maria Inês Faucz**, muito mais que sogro e sogra. Vocês me acolheram como uma filha. Obrigada por tudo.

Ao meu colega **Dr. Lincoln Helder Zambaldi Fabrício**, pela oportunidade de ingressar na carreira acadêmica e pelo entusiasmo e incentivo à realização deste trabalho. Obrigada por ter me apresentado aos meus colegas e amigos do CEDISA.

Aos **residentes do Hospital Evangélico de Curitiba**. Vocês são o grande incentivo para continuar a estudar. Obrigada por me ensinarem muito a cada dia.

Aos queridos colegas e amigos do **CEDISA**, especialmente o **Dr. José Fillus Neto, Dr. Sérgio Serafini, Dr. Carlos Bastos, Dr. Ezio Amaral, Dra. Lillian Nishino, Dra. Máisa Cruzes, Dra. Marta Kizima, Dra. Marli de Carvalho e Dra. Betina Werner**, por terem me acolhido com tanto carinho desde o início e por permitirem, a cada semana, novo aprendizado.

A colega e amiga **Dra. Betina Werner**, pelas contribuições valiosas e fundamentais na aula de qualificação e pelo apoio durante toda a elaboração desta tese.

A amiga **Dra. Norma Ikeda**, sempre solícita a ajudar nas minhas inúmeras viagens a São Paulo.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, **Fernanda, Kleber, Ricardo e Daiane**. Obrigada pelos ensinamentos da rotina de laboratório, algo inédito até então.

A **Dra. Marina Odo e Catarina Capela**, pelos valiosos conhecimentos transmitidos em cirurgia dermatológica na UNISA.

A **Dra. Luciana Lourenço**, pelos importantes conhecimentos transmitidos em cosmiatria no Hospital Heliópolis.

Ao **Prof. Dr. Luís Carlos Cucé**, pela oportunidade de iniciar o projeto de pesquisa que resultou nesta tese.

A **Dra. Régia Patriota De Sica**, que muito contribuiu para a realização deste sonho, incentivando e apoiando as idéias quando esta tese ainda não passava de um esboço de um projeto.

Ao **Maeda**, por incentivar a pesquisa, cedendo gentilmente o aparelho usado neste projeto, viabilizando a realização do trabalho.

A minha funcionária **Elenice Spring**, sempre pronta para atender as minhas solicitações, mesmo as mais difíceis e de última hora.

Aos **meus pacientes**, que me ensinam diariamente, não apenas medicina, mas ideais de vida. A vocês eu atribuo o meu empenho e perseverança neste trabalho, pois, esta é a minha vocação e é assim que eu me realizo.

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

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

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

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

Sumário

Listas
Resumo
Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Matriz extracelular.....	2
1.2 Sistema vascular.....	6
1.3 Envelhecimento.....	7
1.4 Morte celular.....	12
1.5 Radical livre.....	13
1.6 Laser e luz intensa pulsada.....	15
2 OBJETIVOS.....	23
3 MÉTODOS.....	25
3.1 Cultura de fibroblastos humanos.....	26
3.2 Cultura de células endoteliais humanas.....	27
3.3 Irradiação das culturas celulares com Luz Intensa Pulsada.....	27
3.4 Análise da capacidade proliferativa pelo método colorimétrico MTT.....	31
3.5 Determinação da formação de peróxidos lipídicos.....	32
3.6 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	34
3.7 Caracterização dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular e nas vias de morte celular programada por citometria de fluxo.....	35
3.8 Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial por citometria de fluxo.....	37
3.9 Análise da atividade mitocondrial por microscopia confocal.....	38
3.10 Quantificação da biossíntese de colágeno pelos Fibroblastos.....	39
3.11 Microscopia eletrônica de varredura em fibroblastos.....	40
3.12 Análise estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Análise das alterações morfológicas causadas pela irradiação com LIP em FN1 e HUVEC.....	43
4.1.1 FN1.....	43
4.1.2 HUVEC.....	46
4.2 Análise da capacidade proliferativa pelo método colorimétrico MTT.....	49
4.2.1 FN1.....	49
4.2.1.1 Determinação da capacidade proliferativa em culturas de FN1 24 horas após irradiação com LIP.....	49
4.2.1.2 Determinação da capacidade proliferativa em culturas de FN1 48 horas após irradiação com LIP.....	50
4.2.2 HUVEC.....	51
4.2.2.1 Determinação da capacidade proliferativa em culturas de HUVEC 24 e 48 horas após irradiação com LIP.....	51
4.3 Determinação da formação de peróxidos lipídicos (LPO).....	52
4.3.1 FN1.....	52

4.3.1.1 Determinação da formação de peróxidos lipídicos em cultura de FN1 24 horas após a irradiação com LIP.....	52
4.3.1.2 Determinação da formação dos peróxidos lipídicos em cultura de FN1 48 horas após irradiação com LIP.....	53
4.3.2 HUVEC.....	54
4.3.2.1 Determinação da formação de peróxidos lipídicos em cultura de HUVEC 24 horas após irradiação com LIP.....	54
4.3.2.2 Determinação da formação de peróxidos lipídicos em cultura de HUVEC 48 horas após irradiação com LIP.....	55
4.4 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	56
4.4.1 FN1.....	56
4.4.1.1 Determinação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo de FN1 24 e 48 horas após irradiação com LIP.....	57
4.4.2 Determinação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo das HUVEC 24 e 48 horas após a irradiação com LIP.....	63
4.5 Caracterização dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular e das vias de morte celular programada por citometria de fluxo.....	69
4.5.1 FN1.....	69
4.5.1.1 Toxicidade pela incorporação de Iodeto de Propídeo 24 e 48 horas após a irradiação com LIP.....	69
4.5.1.2 Expressão do marcador Ki-67 em FN1 após 24 e 48 horas de cultura...	72
4.5.1.3 Expressão dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular e nas vias de morte celular em FN1 após 24 e 48 horas de cultura.....	75
4.5.1.3.1 Caspase 3.....	75
4.5.1.3.2 Ciclina D1.....	78
4.5.2 HUVEC.....	80
4.5.2.1 Toxicidade pela incorporação de Iodeto de Propídeo após 24 e 48 horas de cultura analisados por citometria de fluxo.....	80
4.5.2.2 Expressão do marcador Ki-67 em HUVEC após 24 e 48 horas de cultura analisados por citometria de fluxo.....	83
4.5.2.3 Expressão dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular e nas vias de morte celular em HUVEC após 24 e 48 horas de cultura...	86
4.5.2.3.1 Caspase 3.....	86
4.5.2.3.2 Ciclina D1.....	89
4.6 Potencial elétrico e funcional da membrana mitocondrial.....	91
4.6.1 FN1.....	91
4.6.2 HUVEC.....	93
4.7 Análise da atividade mitocondrial por microscopia confocal nos fibroblastos humanos.....	96
4.8 Quantificação da produção de colágeno total pelos fibroblastos.....	99
4.8.1 Quantificação da biossíntese de colágeno pelo método colorimétrico de Picrosirius - Red em FN1 do grupo controle e dos grupos irradiados 24 e 48 horas após a irradiação com LIP.....	99
4.9 Análise ultraestrutural de fibroblastos em microscopia eletrônica de varredura.....	102
5 DISCUSSÃO.....	111

6 CONCLUSÕES.....	135
7 REFERÊNCIAS.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
ALA	Ácido aminolevulínico
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
CDK	Kinases dependentes de ciclinas
CKI	Inibidores das kinases dependentes de ciclinas
CO₂	Dióxido de carbono
$\Delta\psi$	Potencial de membrana
DCA	DNase caspase-ativada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FACScalibur	<i>Fluorescence activated cell analyser</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FN1	Fibroblastos humanos normais
FPCM	<i>Fibroblast Populated Collagen Matrix</i>
FRTA	<i>Free radicals theory aging</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
HE	Hematoxilina Eosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio

HSP	<i>Heat Shock Proteins</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
LASER	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LIP	Luz Intensa Pulsada
LLL	<i>Low Level Laser</i>
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz Extra Celular
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MMP	Metaloproteinase
mRNA	RNA mensageiro
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MTT	Brometo de dimetil difenil tetrazolium
Nd: YAG	<i>Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet</i>
NO	Óxido nítrico
O₂⁻	Radical superóxido
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDL	<i>Pulsed Dye Laser</i>
PE	Ficoeritrina
PGDF	Fatores de crescimento derivado de plaquetas
PI	Iodeto de Propídeo

Rh-123	Rodamina-123
RRLs	Reação de produção de Radicais livres
rTNF	Receptores de fatores de necrose tumoral
RT- PCR	<i>Real Time - Polymerase Chain Reaction</i>
SRATB	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
SSC	<i>Side Scatter</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
YAG	<i>Yttrium Aluminium Garnet</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Escala de fotoenvelhecimento de Glogau	9
Tabela 2:	Vantagens e desvantagens da LIP	18
Tabela 3:	Porcentagem de FN1 distribuídos nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de irradiação com LIP	58
Tabela 4:	Porcentagem de FN1 distribuídos nas diferentes fases do ciclo celular após 48 horas de irradiação com LIP	58
Tabela 5:	Porcentagem de HUVEC distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de irradiação com LIP	64
Tabela 6:	Porcentagem de HUVEC distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular após 48 horas de irradiação com LIP	65
Tabela 7:	Porcentagem de incorporação do PI em FN1 24 e 48 horas pós LIP	70
Tabela 8:	Porcentagem de expressão do Ki-67 em FN1 24 e 48 horas pós LIP	72
Tabela 9:	Porcentagem de expressão de caspase 3 fosforilada em FN1 24 e 48 horas pós LIP	75
Tabela 10:	Porcentagem de expressão da ciclina D1 em FN1 24 e 48 horas pós LIP	79
Tabela 11:	Porcentagem de incorporação do PI em HUVEC 24 e 48 horas pós LIP	80
Tabela 12:	Porcentagem de expressão do Ki- 67 em HUVEC 24 e 48 horas pós LIP	83
Tabela 13:	Porcentagem de expressão de caspase 3 fosforilada em HUVEC 24 e 48 horas pós LIP	86
Tabela 14:	Porcentagem de expressão da ciclina D1 em FN1 24 e 48 horas pós LIP	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura química e tridimensional do colágeno humano	3
Figura 2:	Fotomicrografia de pele jovem de área coberta (abdome) com epiderme e derme de aspecto histológico normal. Hematoxilina eosina, original x 100	10
Figura 3:	Fotomicrografias de pele foto envelhecida com graus crescentes (da esquerda para a direita) de dano histológico causado pelo sol. Fotos superiores: Hematoxilina eosina, original x 100. Fotos inferiores: Hematoxilina eosina, original x 400	11
Figura 4:	Espectro eletromagnético	17
Figura 5:	Curvas de absorção demonstrando os comprimentos de onda dos principais cromóforos da pele	19
Figura 6:	Demonstração da aplicação da luz intensa pulsada (Active Record® 618) em culturas celulares em capela de fluxo laminar	28
Figura 7:	Demonstração da aplicação da LIP sobre as culturas celulares	29
Figura 8:	Foto ilustrativa da proteção com o anteparo físico utilizado nas placas de cultura dos grupos não irradiados	29
Figura 9:	Distribuição dos grupos controle e irradiado na placa de cultura fundo chato de 96 orifícios	30
Figura 10:	Coloração violácea das amostras após método colorimétrico MTT	31
Figura 11:	Fotomicrografias adquiridas em microscópio invertido de FN1 do grupo controle após 24 horas (A) e 48 horas de cultura (B). As setas evidenciam células fusiformes, com núcleo único e central sem a presença de vacuolizações ou perda de adesão ao substrato. Aumento 40X	44
Figura 12:	Fotomicrografias adquiridas em microscópio invertido de FN1 do grupo irradiado com LIP na intensidade de 20 J/cm ² após 24 horas (A) e 48 horas de cultura (B). Em A, células fusiformes, com núcleo único e central sem a presença de vacuolizações ou perda de adesão; em B, aumento significativo da densidade celular, no detalhe observa-se grupos de células arredondadas, com perda dos prolongamentos citoplasmáticos, cromatina condensada e nucléolos evidentes. Aumento 40 X	45

- Figura 13:** Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido das HUVEC do grupo controle após 24horas (A) e 48 horas de cultura (B). Notam-se células endoteliais dispostas em monocamada com formato arredondado e com núcleo central. Aumento de 10X em A e 40X em B 47
- Figura 14:** Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido das HUVEC do grupo irradiado com 20 J/cm² após 24horas (A) e 48 horas de cultura (B). Notam-se células endoteliais dispostas em monocamada com formato arredondado e com núcleo central. Aumento de 40X 48
- Figura 15:** Gráfico das médias das porcentagens de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT em culturas de FN1 24 horas após irradiação com LIP no grupo controle e nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²). *Diferenças estatísticas, (Teste de Variância de ANOVA 49
- Figura 16:** Gráfico das médias das porcentagens de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT em culturas de FN1 48 horas após irradiação com LIP no grupo controle e nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²). ns - não significativo; *Diferenças estatísticas (teste de variância de ANOVA 50
- Figura 17:** Gráfico das médias das porcentagens de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT em culturas de HUVEC 24 horas após irradiação com LIP no grupo controle e nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²). ns - não significativo (teste de variância de ANOVA 51
- Figura 18:** Gráfico das médias das porcentagens de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT em culturas de HUVEC 48 horas após irradiação com LIP no grupo controle e nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²). ns - não significativo (teste de variância de ANOVA 52
- Figura 19:** Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (expressos em nmoles/mL) em sobrenadante de culturas de FN1 24 horas após irradiação com LIP nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²) e no grupo controle. ns - não significativo (Teste de Variância de ANOVA) 53
- Figura 20:** Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (expressos em nmoles/mL) em sobrenadante de culturas de FN1 48 horas após irradiação com LIP nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²) e no grupo controle. ns - não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 54

Figura 21:	Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (expressos em nmoles/mL) em sobrenadante de culturas de HUVEC 24 horas após irradiação com LIP nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm ² , 16 J/cm ² e 20 J/cm ²) e no grupo controle. *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)	55
Figura 22:	Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (expressos em nmoles/mL) em sobrenadante de culturas de HUVEC 48 horas após irradiação com LIP nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm ² , 16 J/cm ² e 20 J/cm ²) e no grupo controle. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)	56
Figura 23:	Histograma representativo das fases do ciclo celular em cultura de FN1 do grupo controle 24 horas após irradiação com LIP, obtido pelo citômetro de fluxo FACScalibur	57
Figura 24:	Gráficos das médias das porcentagens de FN1 que se apresentaram com DNA fragmentado no ciclo celular detectados por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)	59
Figura 25:	Gráficos das médias das porcentagens de FN1 que se apresentaram na fase G0/G1 do ciclo celular detectados por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)	60
Figura 26:	Gráficos das médias das porcentagens de FN1 que se apresentaram na fase S do ciclo celular detectadas por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)	61
Figura 27:	Gráficos das médias das porcentagens de FN1 que se apresentaram na fase G2/M do ciclo celular detectadas por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)	62
Figura 28:	Histograma representativo das fases do ciclo celular em cultura de HUVEC do grupo controle 24 horas após irradiação com LIP, obtido pelo citômetro de fluxo FACScalibur	63
Figura 29:	Gráficos das médias das porcentagens das HUVEC que apresentaram DNA fragmentado no ciclo celular detectados por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)	65

- Figura 30:** Gráficos das médias das porcentagens das HUVEC que se apresentaram na fase G0/G1 do ciclo celular detectados por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 66
- Figura 31:** Gráficos das médias das porcentagens das HUVEC que se apresentaram na fase S do ciclo celular detectadas por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 67
- Figura 32:** Gráficos das médias das porcentagens das HUVEC que se apresentaram na fase G2/M do ciclo celular detectadas por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 68
- Figura 33:** Histogramas representativos da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de FN1 por citometria de fluxo. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm², 24 h; em C - grupo controle, 48 h e D - 20 J/cm² 48 h 70
- Figura 34:** Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da viabilidade celular pelo método de difusão de PI pela membrana celular de FN1 mantidos em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP analisados por citometria de fluxo. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 71
- Figura 35:** Histogramas representativos adquiridos em citômetro de fluxo e analisados pelo programa WinMDI do marcador Ki-67 em FN1. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm², 24 h, em C - grupo controle, 48 h e D - 20 J/cm², 48 horas 73
- Figura 36:** Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Ki-67 de FN1 mantidos em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP obtidos em citometria de fluxo. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 74
- Figura 37:** Histogramas representativos da expressão dos marcadores Ciclina D1 e Caspase 3 fosforilada em FN1. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm² 24 h, em C - grupo controle 48 h e D - 20 J/cm² 48 horas 76
- Figura 38:** Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador caspase 3 de FN1 mantidos em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP, obtidos por citometria de fluxo. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 77

- Figura 39:** Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Ciclina D1 de FN1 mantidos em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP. *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 79
- Figura 40:** Histogramas representativos da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de HUVEC. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm² 24 h, em C - grupo controle 48 h e D - 20 J/cm² 48 horas, obtidos por citometria de fluxo 81
- Figura 41:** Gráficos de barras representativos das médias $\pm$ desvio padrão da viabilidade celular pelo método de difusão de iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de HUVEC mantidas em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP. ns – não significativo; * diferenças estatísticas (Teste de variância de ANOVA) 82
- Figura 42:** Histogramas representativos da proliferação celular pelo marcador Ki-67 de HUVEC. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm² 24 h, em C - grupo controle 48 h e D - 20 J/cm² 48 horas 84
- Figura 43:** Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão de Ki-67 em HUVEC mantidas em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP, obtidos por citometria de fluxo. ns – não significativo; * diferenças estatísticas (Teste de variância de ANOVA) 84
- Figura 44:** Histogramas representativos das expressões dos marcadores Ciclina D1 e Caspase 3 fosforilada de HUVEC. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm² 24 h, em C - grupo controle 48 h e D - 20 J/cm² 48 horas 87
- Figura 45:** Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão da caspase 3 fosforilada em HUVEC mantidas em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP, obtidos por citometria de fluxo. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 88
- Figura 46:** Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão da caspase 3 fosforilada em HUVEC mantidas em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP, obtidos por citometria de fluxo. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA) 90
- Figura 47:** Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial em FN1 obtido por citometria de fluxo, grupo controle 48 horas 93
- Figura 48:** Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial de FN1 do grupo controle e dos grupos irradiados com LIP nas intensidades de 10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm² após 24 horas (A) e 48 horas (B) de cultura obtidos por citometria de fluxo. ns - não significativo (teste de variância de ANOVA) 92

Figura 49:	Histograma representativo do potencial elétrico mitocondrial em HUVEC controle 24 horas, obtidos por citometria de fluxo	94
Figura 50:	Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial de HUVEC do grupo controle e dos grupos irradiados com LIP nas intensidades de 10 J/cm ² , 16 J/cm ² e 20 J/cm ² após 24 horas (A) e 48 horas (B) de cultura obtidos por citometria de fluxo. ns- não significativo (teste de variância de ANOVA)	95
Figura 51:	Fotomicrografia adquirida em microscopia confocal de FN1 do grupo controle. Notam-se células apresentando núcleo esférico centralmente localizado (seta tracejada) e mitocôndrias dispersas difusamente no citoplasma marcadas pela sonda fluorescente Rh-123 (seta contínua). Aumento 1000 X	97
Figura 52:	Fotomicrografia adquirida em microscopia confocal de FN1 do grupo irradiado com 20 J/cm ² . Notam-se células apresentando núcleo esférico único e centralmente localizado (seta tracejada) e mitocôndrias ativas dispersas difusamente e agregadas no citoplasma marcadas pela sonda fluorescente Rh-123 (seta contínua). Aumento 1000 X	98
Figura 53:	Curva padrão e equação da reta do colágeno tipo I humano obtido pelo método colorimétrico de Picrosirius – red nas concentrações de 0 – 300 µg/mL (A) e 0 – 160 µg/mL (B)	99
Figura 54:	Representação da concentração de colágeno total produzido pelos FN1 dos grupos controle e irradiado com LIP após 24 horas de cultura avaliada pelo método Picrosirius - Red. *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)	100
Figura 55:	Representação da concentração de colágeno total produzido pelos FN1 dos grupos controle e irradiado com LIP após 48 horas de cultura. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)	101
Figura 56:	Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo controle, após 48 horas. Notam-se fibroblastos apresentando em sua superfície celular a presença de fibrilas colágenas dispostas perpendicularmente à superfície (seta)	103
Figura 57:	Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo controle, após 48 horas. Notam-se fibroblastos apresentando fibrilas colágenas dispostas perpendicularmente à superfície (seta)	104

- Figura 58:** Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com LIP na intensidade de energia de 10 J/cm^2 , após 48 horas. Nota-se aumento da síntese e projeção de fibras colágenas mais espessas na superfície celular formando uma rede (seta) 105
- Figura 59:** Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com 16 J/cm^2 , após 48 horas. Nota-se aumento da projeção e organização de fibras colágenas mais espessas (círculo) 106
- Figura 60:** Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com luz intensa pulsada na energia de 20 J/cm^2 , após 48 horas. Nota-se a organização da matriz extracelular produzida pelos fibroblastos 107
- Figura 61:** Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com 20 J/cm^2 . Notam-se detalhes da organização das fibras da matriz extracelular recém sintetizada por fibroblastos 48 horas após a aplicação da LIP 108
- Figura 62:** Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com 20 J/cm^2 , 48 horas após a LIP. Pode-se observar estrutura arredondada representando fibroblasto com perda dos prolongamentos citoplasmáticos, adquirindo aspecto esférico, compatível com célula em processo de morte (seta) 109

RESUMO

Faucz LRL. *Avaliação dos efeitos proliferativos e de síntese induzidos pela luz intensa pulsada em fibroblastos e células endoteliais humanas* [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

A luz intensa pulsada é amplamente utilizada para o tratamento do fotoenvelhecimento e de lesões vasculares congênitas e adquiridas, porém, seus efeitos biológicos ainda não são completamente esclarecidos. Neste estudo, foram avaliadas as respostas proliferativas e de síntese em fibroblastos e células endoteliais humanas após a irradiação com a luz intensa pulsada. As culturas de fibroblastos e células endoteliais foram irradiadas com luz intensa pulsada com variação de comprimento de onda entre 420 e 1110 nm e fluências de 10, 16 e 20 J/cm². Os experimentos foram realizados após 24 e 48 horas da irradiação e analisados os seguintes parâmetros: 1- alterações morfológicas; 2- determinação da capacidade proliferativa e citotóxica; 3- produção de radicais livres; 4- fases do ciclo celular; 5- expressão dos marcadores do ciclo celular e apoptose; 6- avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial; 7- análise da atividade mitocondrial por microscopia confocal; 8- biossíntese de colágeno e 9- microscopia eletrônica de varredura dos fibroblastos e matriz extracelular. Os resultados demonstraram que, nos fibroblastos, a luz intensa pulsada promoveu aumento da densidade celular e da capacidade proliferativa; aumento na produção de radicais livres diretamente proporcional à intensidade de energia; estímulo na fase de síntese; estímulo na síntese de colágeno mais significativo em 10 e 16 J/cm²; induziu apoptose pela via extrínseca, dependente da intensidade de energia; a microscopia eletrônica de varredura demonstrou detalhes da organização e síntese da matriz extracelular, bem como o colágeno recém sintetizado. Nas células endoteliais a luz intensa pulsada não provocou mudanças morfológicas; promoveu aumento na produção de radicais livres, induziu citotoxicidade e apoptose pela via extrínseca e diminuiu a capacidade proliferativa, proporcional à intensidade de energia. Este estudo permitiu a determinação *in vitro* dos mecanismos biológicos envolvidos após a interação da luz intensa pulsada com os fibroblastos e células endoteliais humanas.

Descritores: 1.Lasers 2.Colágeno 3.Células endoteliais 4.Luz intensa pulsada 5.Fotoenvelhecimento 6.Lesões vasculares

SUMMARY

Faucz LRL. *Evaluation of the proliferative and synthesis effects induced by intense pulsed light in human fibroblasts and endothelial cells*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Intense pulsed light is widespread used in the treatment of intrinsic and extrinsic photo damaged skin and congenital or acquired vascular diseases but its biological effects have not yet been clearly demonstrated. This study assessed the proliferative and synthesis responses of fibroblasts and endothelial cells. The fibroblasts and endothelial cells cultures were irradiated with intense pulsed light, with wavelength ranging from 420 to 1110 nm, fluencies of 10, 16 e 20 J/cm² and pulse delay 10 ms. Experiments were performed 24 and 48 hours after irradiation and the following parameters were analyzed: 1- morphological changes; 2- measurement of proliferative capacity and cytotoxicity; 3- free radical production; 4- cell cycle phases; 5- expression of cell cycle and apoptosis markers; 6- electrical potential of mitochondrial membrane; 7- mitochondrial activity by confocal microscopy; 8- collagen synthesis; 9- Scanning electron microscopy of fibroblasts and extracellular matrix. The results evidenced that intense pulsed light on fibroblasts increased cell density and proliferative capacity; stimulus on synthesis phase and collagen synthesis more significant at fluences of in 10 and 16 J/cm²; increase of free radical formation, cytotoxicity and apoptosis through the extrinsic pathway proportional to the energy intensity. The scanning electron microscopy evidenced the organization details of extracellular matrix and new collagen fibers. Regarding the endothelial cells, intense pulsed light did not cause morphological changes; increased free radicals formation, induced cytotoxicity and apoptosis through the extrinsic pathway and decreased the proliferative capacity proportionally to the intensity of energy. This study allowed the *in vitro* determination of the biological mechanisms involved after the interaction of intense pulsed light and human fibroblasts and endothelial cells.

Descriptors: Intense pulsed light; Collagen fibers; Fibroblasts; Endothelial cells; Photo aging; Vascular diseases.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Matriz extracelular

Os tecidos são constituídos por células e uma rede de proteínas fibrilares, reticuladas e globulares formando a matriz extracelular (MEC). A MEC consiste de fibras protéicas resistentes embebidas em uma substância em forma de gel constituída por polissacarídeos que são secretados localmente e distribuídos em uma malha organizada mantendo íntima associação com a superfície das células que os produzem. Além destes componentes, a MEC contém proteínas de adesão que ligam os seus componentes entre si (Cooper, 2000; Alberts et al., 2010).

Até pouco tempo, acreditava-se que a MEC exercia apenas a função de base para estabilizar fisicamente as estruturas dos tecidos. No entanto, já se sabe que a MEC exerce um papel mais ativo e complexo na regulação do comportamento das células com as quais estão em contato, influenciando a sua sobrevivência, desenvolvimento, migração, proliferação, formato e função (Alberts et al., 2010).

As duas principais classes de macromoléculas que constituem a MEC são: (1) cadeias de polissacarídeos denominados glicosaminoglicanos (GAGs), que são encontrados ligados covalentemente à proteína na forma de proteoglicanos, e (2) fibras protéicas, incluindo colágeno, elastina, fibronectina e laminina que têm função tanto estrutural quanto de adesão (Alberts et al., 2010). Essas macromoléculas reúnem-se em duas organizações gerais: matriz intersticial e membrana basal. A matriz intersticial é encontrada nos espaços intercelulares epiteliais, endoteliais e das células musculares lisas, assim como no tecido conjuntivo. Consiste em colágeno fibrilar (tipos I, III e V) e colágeno não-fibrilar, elastina, fibronectina, proteoglicanos, hialuronato e outros componentes. As membranas basais são

produzidas por células epiteliais e mesenquimatosas e estão estreitamente associadas à superfície celular. São constituídas por uma rede de colágeno fibrilar amorfo (principalmente do tipo IV), laminina, heparan-sulfato, proteoglicanos e outras glicoproteínas (Cotran et al., 2000).

A maior proteína estrutural da MEC é o colágeno, proteína mais abundante nos tecidos animais. As fibras colágenas constituem uma grande família de proteínas contendo pelo menos 19 diferentes membros. Elas são caracterizadas pela formação de três hélices nas quais três cadeias de polipeptídeos formados pela hidroxiprolina, prolina e glicina, se entrelaçam entre si, formando uma estrutura em formato de corda, como demonstrado na figura 1. Na derme, 80% do colágeno são compostos por colágeno tipo I e 10 % por colágeno tipo III. As fibras colágenas são as principais responsáveis pelo aspecto saudável da pele, pois mantêm o tônus e a elasticidade da mesma (Luo et al., 2009).

Figura 1: Estrutura química e tridimensional do colágeno humano

As macromoléculas que constituem a MEC são produzidas localmente por suas próprias células. Na maioria dos tecidos conectivos, estas macromoléculas são produzidas por células denominadas fibroblastos (Alberts et al., 2010).

Os fibroblastos dérmicos representam um componente essencial da pele; eles não apenas produzem e organizam a matriz extracelular da derme, mas também se comunicam entre si e com outros tipos celulares desenvolvendo um papel crucial na regulação da fisiologia cutânea. Duas subpopulações de fibroblastos estão localizadas em duas camadas distintas da derme: a derme papilar e a derme reticular. Uma terceira subpopulação de fibroblastos está localizada em torno dos folículos pilosos (Sorrell; Caplan, 2004; Sorrell et al., 2008). Fibroblastos “maduros” com uma menor capacidade de transformação podem, por exemplo, existir lado a lado com fibroblastos “imatuross” (frequentemente denominados células mesenquimais) que podem desenvolver uma variedade de tipos celulares (Alberts et al., 2010).

A família de células do tecido conectivo compreende os fibroblastos, células ósseas (osteócitos e osteoblastos), condrócitos, adipócitos e células musculares lisas. Os fibroblastos são as células menos diferenciadas desta família. Eles estão dispersos no tecido conectivo corporal onde secretam a MEC, rica em fibras colágenas tipo I e III (Alberts et al., 2010). O fibroblasto é considerado a mais versátil das células do tecido conectivo, demonstrando uma importante capacidade de se transformar em outros membros da família de células do tecido conectivo. Lorenz et al (2008) demonstraram que os fibroblastos dérmicos preenchem as três principais características das células tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells*-MSC): expressam de forma homogênea todos os antígenos de superfície relacionados às

MSC; apresentam citoesqueleto e composição da matriz semelhantes aos das MSC; e se diferenciam em linhagens de células adipogênicas e osteogênicas.

Estudos em culturas celulares tridimensionais demonstraram que os fibroblastos dérmicos, assim como os queratinócitos, apresentam um papel fundamental na expressão dos componentes da membrana basal e na formação da zona de membrana basal, sugerindo que os fibroblastos dérmicos produzem laminina e colágenos do tipo IV e VII, ou influenciam os efeitos dos queratinócitos na formação da membrana basal (Lee; Cho, 2005; Lee; Yang, 2009).

Quando ocorre uma injúria tecidual os fibroblastos desempenham um papel central na cicatrização de feridas devido à sua capacidade de migração para o local da injúria, produção e remodelamento de componentes da MEC, como o colágeno, assim como estímulo parácrino no processo de cicatrização de feridas, incluindo angiogênese. Os fibroblastos são importantes produtores de imunomoduladores e podem exacerbar a resposta inflamatória. Sua habilidade em migrar para os tecidos lesionados tornou os fibroblastos elementos celulares facilmente passíveis de serem mantidos em cultura. Estas características têm tornado os fibroblastos células de escolha para estudos biológicos celulares (Alberts et al., 2010; Almqvist et al., 2009).

A *fibroblast populated collagen matrix* (FPCM) representada por colágeno tipo I, adicionada de culturas de fibroblastos em pH e temperatura fisiológica e acrescidas com soro ou fatores de crescimento, tem sido estudada como modelo substituto aos tecidos de granulação no processo de cicatrização de feridas. Comparações em relação aos aspectos macroscópicos, microscópicos, componentes da matriz extracelular, comportamento biológico e resposta a agentes exógenos entre FPCM e modelo de cicatrização *in vivo* demonstraram que os modelos FPCM podem

substituir com eficiência os modelos *in vivo* em estudos que avaliam o processo de cicatrização de feridas (Carlson; Longaker, 2004).

Nestes modelos de cultura, diversas estratégias de pesquisa podem ser abordadas como por exemplo, a influência de fatores exógenos adicionados ao meio de cultura sobre a capacidade de síntese e proliferação de fibroblastos.

1.2 Sistema vascular

A derme humana representa um tecido complexo que promove suporte mecânico e sustento da epiderme avascular que a sobrepõe, promovendo distribuição de nutrientes e regulação térmica das células epidérmicas. Isto é possível graças a uma elaborada microvascularização na derme papilar. Esta microvascularização é fisicamente suportada por elementos do tecido conectivo sintetizados pelos fibroblastos locais. Estes mesmos fibroblastos apresentam um papel importante na restauração do plexo vascular no processo de reparação de feridas, através da produção de fatores angiogênicos (Sorrell et al., 2008).

O sistema vascular é uma complexa rede de vasos conectando o coração com diversos órgãos e tecidos para manter a sua homeostase em resposta a mudanças fisiológicas e patológicas. As células endoteliais constituem a chamada camada íntima da parede arterial e desempenham um papel muito importante no remodelamento do sistema vascular, na manutenção do tônus, fluidez sanguínea, coagulação, troca de nutrientes e desenvolvimento de órgãos (Flavahan, 1992). Anormalidades na estrutura e função das células endoteliais podem contribuir

significativamente para o surgimento de doenças da parede dos vasos sanguíneos como trombose, aterosclerose e vasculites (Stemerman; Spaet, 1972).

Além disso, de maneira similar às células musculares lisas, as células endoteliais são muito importantes em processos inflamatórios. Estas células, sob estímulo físico, químico ou hormonal, produzem uma variedade de fatores como o óxido nítrico (NO), o ânion superóxido (O_2^-), prostaciclina, endotelina, fator ativador de plaquetas, fator de hiperpolarização derivado do endotélio, interleucinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDF) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (Flavahan, 1992). O papel das células endoteliais nestes importantes eventos biológicos pode ser mais bem definido se for possível isolar e cultivar estas células para estudos *in vitro* (Jaffe et al., 1973).

1.3 Envelhecimento

O envelhecimento compreende um processo progressivo e aleatório com acúmulo de alterações deletérias, iniciadas durante a formação dos gametas femininos e masculinos, em seguida nos zigotos desenvolvidos a partir destes gametas e, finalmente, nas células e tecidos dos indivíduos formados, aumentando as chances do surgimento de doenças e morte com o avançar da idade. Alterações do envelhecimento são comumente atribuídas ao desenvolvimento, defeitos genéticos, meio ambiente, doenças, e a um processo de envelhecimento intrínseco. Estas alterações limitam a expectativa de vida, que representa uma medida aproximada do tempo de vida saudável, a no máximo 85 anos (Harman, 2006).

Existem dois mecanismos primários de envelhecimento da pele: extrínseco e intrínseco. O envelhecimento intrínseco é determinado por variações genéticas individuais. Neste processo o envelhecimento é inevitável e aparentemente não está susceptível às alterações comportamentais do indivíduo. Observam-se alterações como afinamento da epiderme e da derme, achatamento da junção dermo-epidérmica e perda da elasticidade. Além disso, ocorre diminuição das células de Langerhans, melanócitos, fibroblastos, capilares e terminações nervosas. Inversamente, o envelhecimento extrínseco é influenciado por fatores originados externamente e são expostos ao corpo humano como fumo, consumo excessivo de álcool, nutrição deficiente e exposição solar crônica (Holck; Ng, 2003; Baumann, 2007). Clinicamente a pele com envelhecimento intrínseco apresenta-se pálida e com rugas finas, diminuição da elasticidade, maior fragilidade epidérmica, ressecamento e diminuição na capacidade de cicatrização de feridas. A pele com envelhecimento extrínseco, ou foto envelhecida, apresenta enrugamento grosseiro com perda da elasticidade, alterações na textura e na pigmentação, ceratoses actínicas, telangiectasias e aspecto amarelado (Holck; Ng, 2003; Chung; Eun, 2007). A classificação clínica do grau de foto envelhecimento pode ser realizada pela escala de Glogau como descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Escala de fotoenvelhecimento de Glogau

TIPO	DESCRIÇÃO	ALTERAÇÕES
I (leve)	Sem rugas ou mínimas rugas	Fotoenvelhecimento leve Sem ceratoses ou alterações pigmentares Idade: 20- 30 anos
II (moderado)	Rugas em movimento	Fotoenvelhecimento leve a moderado Ceratoses actínicas iniciais Coloração amarelada Linhas do sorriso iniciais Idade: 30 – 40 anos
III (avanzado)	Rugas em repouso	Fotoenvelhecimento avançado Discromias, telangiectasias Ceratoses actínicas Rugas persistentes Idade: acima de 50 anos
IV (grave)	Predomínio de rugas	Fotoenvelhecimento intenso Pele amarelo-acinzentada Rugas dinâmicas e gravitacionais em toda a pele Ceratoses actínicas ± lesões malignas cutâneas Idade: acima de 60 anos

Fonte: (Holck; Ng, 2003).

As principais alterações histopatológicas no envelhecimento ocorrem na epiderme e na derme. Ocorre diminuição dos componentes da MEC, diminuição das fibras colágenas e deposição anormal das fibras elásticas (Luo et al., 2009). A pele marcada por extremo fotoenvelhecimento apresenta afinamento da epiderme e derme, achatamento da junção dermo-epidérmica, fibras colágenas fragmentadas, aumento dos espaços entre as bandas de fibras do tecido conectivo e uma maior desorganização destas fibras em comparação com a pele que apresenta envelhecimento intrínseco (Figura 3). As fibras elásticas também estão fragmentadas e podem exibir intercruzamentos e calcificações (Holck; Ng, 2003; Baumann, 2007; Chung; Eun, 2007). Nas Figuras 2 e 3 pode-se observar as diferenças histopatológicas entre a pele jovem e a pele fotoenvelhecida.

Figura 2: Fotomicrografia de pele jovem de área coberta (abdome) com epiderme e derme de aspecto histológico normal. Hematoxilina eosina, original x 100

Figura 3: Fotomicrografias de pele foto envelhecida com graus crescentes (da esquerda para a direita) de dano histológico causado pelo sol. Fotos superiores: Hematoxilina eosina, original x 100. Fotos inferiores: Hematoxilina eosina, original x 400

O processo químico básico subjacente ao envelhecimento baseia-se na liberação de radicais livres postulados pela *Free radicals theory aging* (FRTA). A reação dos radicais livres, normalmente produzidos, com os constituintes celulares inicia as alterações relacionadas ao processo de envelhecimento (Harman, 2006). A FRTA postula que o processo comum de envelhecimento é iniciado pelas reações de produção de radicais livres (RRLs). Essas reações, uma vez iniciadas, seriam responsáveis pela deterioração progressiva dos sistemas biológicos de reparo ao longo do tempo devido à sua capacidade inata em produzir alterações aleatórias e persistentes. Esta teoria foi extendida em 1972 com a sugestão de que a maioria das RRLs foi iniciada pela mitocôndria em uma taxa crescente com a idade, e que o tempo de vida desta organela é determinado pelo grau de dano causado pelos radicais livres (Harman, 2001).

Já está bem demonstrado que o estresse oxidativo de longa duração causado pela superprodução de radicais livres pode induzir necrose. Por exemplo, a alta reatividade do radical hidroxila tem sido considerada como um dos mais potentes indutores de morte celular por necrose. Na apoptose, os radicais livres têm um papel maior na determinação do status redox e muitas formas de indução de apoptose envolvem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Alguns antioxidantes como o tocoferol e carotenos, peroxidases contendo heme como a catalase, glutathione-peroxidase, superóxido dismutase, e mecanismos reparadores de DNA são algumas das defesas que têm sido utilizadas para minimizar os efeitos deletérios dos radicais livres e atenuar o processo de apoptose (Harman, 2001; Pollack; Leeuwenburgh, 2001).

1.4 Morte celular

O processo de morte celular é importante na manutenção dos sistemas celulares. Células que morrem por injúria aguda tipicamente incham e estouram, espalham seu conteúdo por toda a vizinhança, promovendo resposta inflamatória adjacente. Este tipo de morte celular é chamado de necrose celular. A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória local (Ziegler; Groscurth, 2004). As células em apoptose sofrem morte celular programada sem acometer estruturas vizinhas. A célula encolhe e condensa, o seu citoesqueleto sofre colapso, o envoltório nuclear torna-se desestruturado e o DNA sofre fragmentação. A superfície celular sofre alterações revelando propriedades que cursam com a sua morte e posterior fagocitose por células vizinhas ou por macrófagos (Alberts et al., 2002).

Muitas evidências sugerem que a mitocôndria é a organela mais envolvida no processo de transdução de sinal e execução de morte celular. O mecanismo dependente da mitocôndria (ou intrínseco) para a morte celular é ativado por diversos estímulos incluindo diminuição de fatores de crescimento, dano ao DNA, choque térmico, radiação ultravioleta, radiação gama e drogas quimioterápicas (Pradelli et al., 2010). Danos ao DNA, especialmente ao DNA mitocondrial têm um importante papel no processo de envelhecimento (Gredilla et al., 2010). Os mecanismos de sinalização ativados por esses agentes culminam com a permeabilização da

membrana mitocondrial externa e liberação de proteínas apoptóticas solúveis do espaço intermembrana da mitocôndria (Pradelli et al., 2010). Membros pro-apoptóticos como Bax e Bak estimulam a liberação dessas proteínas, em contrapartida proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a sua liberação. A citocromo C, uma das proteínas liberadas pela mitocôndria, promove a ativação da pro-caspase-9 em caspase-9 que ativará outras caspases, culminando com o processo de morte celular por apoptose (Orrenius, 2004). A ativação das caspases não produz uma destruição protéica generalizada. As caspases quando ativadas têm como alvo específico as proteínas que mantêm a estrutura celular, levando à desestruturação do citoesqueleto e, conseqüentemente, perda da integridade celular (Berg et al., 2002).

1.5 Radical livre

Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (Halliwell; Gutteridge, 1989). A presença de um ou mais elétrons não pareados determina uma atração para um campo magnético e, algumas vezes, torna a substância altamente reativa (Halliwell et al., 1992). A maior reatividade exibida pelos radicais livres, comparativamente aos não radicais, pode ser evidenciada pelo menor tempo de vida média que possuem. O tempo de vida extremamente curto apresentado pelos radicais livres é devido á maior instabilidade eletrônica que apresentam, resultando na maior possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com as quais venham colidir, promovendo formação de outros radicais livres (Halliwell; Gutteridge, 1989).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas ou íons formados pela redução incompleta de um elétron de oxigênio. Elas contribuem para a atividade microbicida dos fagócitos, regulação de transdução de sinais e expressão de genes, e indução de dano oxidativo de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Pan et al., 2009).

Os efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos já são conhecidos desde o final do século XIX. Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), medidos por espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (ERN). A reação destas espécies com os AGPI, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre lipídios insaturados das membranas celulares gerando principalmente radicais alquila, alcoxila e peroxila, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, a morte celular. A LPO pode ser avaliada e utilizada como um indicador do estresse oxidativo celular (Benzie, 1996).

A despeito de vários antioxidantes como ubiquinona e vitamina E e enzimas antioxidantes, a mitocôndria representa a mais importante fonte intracelular de EROs. Estima-se que a concentração de O_2^- na matriz mitocondrial é aproximadamente 5 a 10 vezes maior do que a encontrada no núcleo ou citoplasma (Cadenas; Davies, 2000). Portanto a mitocôndria pode também ser o alvo primário para os efeitos lesivos das EROs. A interação de diversas macromoléculas com espécies reativas de oxigênio pode prejudicar a função destas organelas e pode

influenciar diretamente a viabilidade celular e culminar com morte celular (Ott et al., 2007).

Nos sistemas biológicos a interação entre os constituintes celulares, organelas e o meio externo constituem uma rede complexa de vias de sinalização que potencializam ou nutrem respostas celulares específicas. Os fatores exógenos podem influenciar de diversas maneiras estes sistemas, a aplicação de agentes físicos, como por exemplo, o laser e a luz intensa pulsada, têm se mostrado instrumentos inovadores para potencializar as respostas biológicas.

1.6 Laser e luz intensa pulsada

Anteriormente ao surgimento das tecnologias de LASER (*light amplification by stimulated emission of radiation*) e luzes intensas pulsadas (LIP), que são denominadas tecnologias de fotorejuvenescimento, o rejuvenescimento da pele era realizado com técnicas como peelings químicos, criocirurgias e dermoabrasão (Waibel, 2009). O uso de agentes tópicos como a associação de tretinoína e hidroquinona também são eficientes no rejuvenescimento tanto isoladamente como associado a outros métodos como LIP, peelings químicos e dermoabrasão. A associação de tretinoína e hidroquinona promove uma diminuição dos efeitos colaterais como hiperpigmentação e aumenta o potencial de atuação das modalidades combinadas (Woodhall et al., 2009).

As primeiras técnicas desenvolvidas para o fotorejuvenescimento facial eram procedimentos ablativos completos que promoviam grande impacto no fotodano

oferecendo melhora dramática no aspecto da pele, porém ofereciam mais riscos e longo período de recuperação. Os resultados dos métodos ablativos são proporcionais à profundidade de penetração na pele, assim como os efeitos colaterais e o tempo de recuperação do paciente (Doherty et al., 2009).

Métodos não ablativos de fotorejuvenescimento, como a LIP, tem atraído médicos e pacientes porque reduzem os riscos e efeitos colaterais, assim como reduzem substancialmente o tempo de recuperação pós procedimento quando comparados aos métodos ablativos, proporcionando um tratamento com respostas semelhantes (Alam et al., 2003).

Recentemente a LIP tem sido utilizada no tratamento de diferentes condições clínicas incluindo varizes, fotoepilação, e remoção de lesões pigmentadas e vasculares (Prieto et al., 2002). Bjerring et al. (2004) relataram em um estudo que, após quatro a seis sessões de tratamentos com LIP em toda a face, 90% dos pacientes obtiveram melhora visível como redução de telangiectasias, lesões pigmentadas, melhora da textura e elasticidade da pele.

O uso do laser tem otimizado significativamente o tratamento de lesões vasculares cutâneas nos últimos 20 anos. A luz aplicada sobre a pele é absorvida pela oxihemoglobina contida dentro dos vasos sanguíneos e é então transformada em calor. Temperaturas acima de 70° C causam coagulação do sangue dentro dos vasos (Black; Barton, 2004).

O termo fotorejuvenescimento está relacionado ao tratamento com aproximadamente seis sessões de LIP e tem sido recentemente popularizado e amplamente utilizado na prática dermatológica (Ciocon et al., 2009). Na LIP, semelhante ao laser, o princípio básico de ação é a absorção de fótons por

cromóforos endógenos ou exógenos da pele e a transferência de energia para estes cromóforos com o objetivo de gerar aquecimento e conseqüentemente destruição das estruturas alvo. Os cromóforos que predominam na pele são a hemoglobina, a melanina e a água e estes apresentam um amplo espectro de absorção. Como a radiação emitida pela LIP varia em torno de 500 a 1300 nm dentro do espectro eletromagnético, conforme demonstrado na Figura 5, os três cromóforos chaves da pele são ativados em uma única emissão de luz (Babilas et al., 2010).

Figura 4: Curvas de absorção demonstrando os comprimentos de onda dos principais cromóforos da pele

Esta versatilidade da LIP em comparação ao laser tem sido considerada uma grande vantagem desta tecnologia, porém, existem algumas desvantagens no uso da LIP na prática clínica. O maior tamanho da ponteira em contato com a pele (*spot size*) pode ser considerado tanto uma vantagem quanto uma desvantagem. Devido ao

maior *spot size* o tempo de tratamento pode ser reduzido, já que uma área maior é tratada em um único disparo, entretanto, quando o objetivo é aplicar a LIP em superfícies menores e mais delicadas, como asa do nariz, o *spot size* grande pode representar uma desvantagem. A necessidade de aplicação do gel pode representar um atraso no tempo de tratamento, assim como a necessidade do contato direto do *hand piece* com a pele. Entretanto, a grande versatilidade da LIP, o menor custo para compra, , quando comparado aos aparelhos de laser, assim como a robustez de sua tecnologia, representam vantagens que a tornam de grande utilidade na prática clínica. A Tabela 2 resume as vantagens e desvantagens da LIP.

Tabela 2: Vantagens e desvantagens da LIP

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Menor preço de compra	Inconsistência do espectro de emissão e da fluência
<i>Spot size</i> largo	Peso do <i>hand piece</i>
Maior cobertura da superfície cutânea	<i>Spot size</i> largo
Maior versatilidade	A luz pode não ser focada
Tecnologia robusta	Necessário aplicação de gel*
	Necessário contato direto do <i>hand piece</i> com a pele*

*Bloqueia a observação da resposta local imediata

Fonte: Babilas et al., 2010.

A luz intensa pulsada é um sistema físico produzido a partir da emissão de fótons de luz em diferentes espectros.

O espectro eletromagnético engloba vários fenômenos conhecidos, como as ondas de TV e rádio, o microondas, a ultrassonografia e, do outro lado do espectro, o ultravioleta e os raios X. Porém os olhos possuem uma sensibilidade apenas para

uma faixa muito estreita do espectro, formando a luz visível desde o violeta até o vermelho. Cada cor visível ou cada emissão de espectro está associada a uma frequência ou a um comprimento de onda, como ilustrado na Figura 5 (Boechat, 2002).

Fonte: www.uff.br/geoden/figuras/espectro.jpg

Figura 5: Espectro eletromagnético

Os sistemas de LIP são fontes de alta intensidade que emitem luz policromática em um espectro de comprimento de onda que varia de 515 a 1200 nm (Raulin et al., 2003).

O mecanismo de atuação da LIP é baseado no princípio da fototermólise seletiva descrito por Anderson e Parrish em 1983. Este princípio baseia-se na absorção seletiva de um curto pulso de radiação que gera um aquecimento confinado a determinados pigmentos alvos.

Um pré-requisito necessário é que o alvo tenha uma maior absorção óptica da radiação

em um determinado comprimento de onda do que os tecidos circunjacentes. Muitas enzimas são termolábeis. Acima de 60° a 70° C proteínas estruturais incluindo fibras colágenas são desnaturadas. Acima de 70° a 80° C os ácidos nucleicos são desnaturados e as membranas celulares tornam-se permeáveis (Anderson; Parrish, 1983).

O aumento da temperatura de um tecido depende da quantidade de energia que lhe é entregue. A energia, a potência e a fluência (densidade de energia) são parâmetros físicos que determinam o eventual aumento de temperatura. A energia é medida em joules (J) e a potência em Watts (W). A energia é calculada pela seguinte relação: Energia (J) = potência (W) x tempo (s). Portanto a energia é a quantidade de potência entregue ao tecido em um determinado intervalo de tempo. O efeito térmico do laser é extremamente localizado. Assim, a quantidade física que governa a resposta térmica do tecido é a quantidade de energia entregue a uma determinada área, em geral o tamanho da área de aplicação ou *spot size* produzido pela peça de mão. Assim, a densidade de energia ou fluência do laser é medida em J/cm², como representado pela seguinte relação: Fluência (J/cm²) = energia (J) / área (cm²) (Boechat, 2002).

Os sistemas de LIP utilizam lâmpada de *flash* de xenon controlada por computador e filtros para gerar pulsos de luz de duração, intensidade e espectro de distribuição controlados. Lâmpadas de *flash* são lâmpadas de descarga de gás de alta intensidade preenchidas de gás xenon que produzem uma luz brilhante quando uma corrente elétrica atravessa o gás (Waibel, 2009).

Diferentes modalidades de tratamento usando laser e LIP apresentam variáveis graus de efeitos clínicos. Os sistemas usados incluem lasers emitindo luz em comprimentos de onda de 532, 578, 585, 810, 900 e 1.064 nm assim como luzes brancas filtradas geradas por sistemas de LIP equipados com diferentes filtros de corte (Bjerring et al., 2004).

Complicações causadas pelo uso do laser e da LIP podem ser diminuídas pelo treinamento e experiência do operador. A dor pode ser amenizada por aplicação de cremes anestésicos, mas é um importante parâmetro no controle de possíveis efeitos colaterais. Púrpura e hematomas podem ocorrer imediatamente após a aplicação e tendem a desaparecer em 7 a 10 dias. Descoloração, bolhas e cicatrizes são geralmente causadas por altas energias e podem ocorrer de imediato ou tardiamente. Outros efeitos colaterais são Infecções, reativação de herpes simples, hipo ou hiperpigmentação e cicatrizes inestéticas (Adamic et al., 2007).

Por ser uma tecnologia relativamente nova, efeitos colaterais de longo prazo causados pelo tratamento com LIP são ainda desconhecidos e muitos pesquisadores recomendam avaliações relacionadas aos efeitos biológicos da LIP e a sua relação com lesões malignas (Ash et al., 2010). Faltam trabalhos que estudem os mecanismos envolvidos na ação da LIP e as alterações moleculares nos fibroblastos dérmicos e células endoteliais (Wong et al., 2008).

Embora existam evidências claras dos benefícios da LIP no tratamento do foto envelhecimento, tanto intrínseco quanto extrínseco, bem como no tratamento de diversas condições vasculares congênitas ou adquiridas, os trabalhos se mostram superficiais e demonstram apenas os resultados clínicos, sem elucidação dos mecanismos biológicos e celulares que levam aos resultados encontrados na prática

clínica. Portanto este estudo tem como objetivo demonstrar os fenômenos que ocorrem, *in vitro*, após a interação da luz intensa pulsada com as células, especialmente na capacidade proliferativa e de síntese de fibroblastos e células endoteliais humanas.

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos biológicos da interação da luz intensa pulsada em diferentes intensidades de energia em culturas primárias de fibroblastos e células endoteliais humanas. Para tanto foram utilizadas as seguintes metodologias:

- Análise da capacidade proliferativa, toxicidade celular, fases do ciclo celular e síntese de colágeno;
- Caracterização dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular e das vias de morte celular programada por citometria de fluxo;
- Análise do potencial elétrico e da integridade da membrana mitocondrial por citometria de fluxo;
- Análise estrutural e funcional das mitocôndrias por microscopia confocal e da organização ultraestrutural da matriz extracelular e fibras colágenas por microscopia eletrônica de varredura.

3 MÉTODOS

Os ensaios realizados neste projeto foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, São Paulo, SP.

3.1 Cultura de fibroblastos humanos

As amostras utilizadas neste estudo são provenientes de fragmentos de pele de blefaroplastia realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP obtidos do projeto de pesquisa número 921/06, já aprovado pela CAPPesq e os fibroblastos foram denominados FN1. Os frascos de cultura foram transferidos para uma estufa umidificada de cultura com temperatura de 37° C e 5% de concentração de CO₂. As culturas foram examinadas ao microscópio invertido 3 vezes por semana. Todas as células cresceram em meio RPMI 1640 completo, em frascos de cultura (Nunc) com superfície ventilada de 7,5 cm². Ao atingirem a subconfluência as células foram tripsinizadas (0,05% de tripsina, Gibco, EUA) e plaqueadas em garrafas de 25 cm² para a detecção de marcadores de linhagem de fibroblastos por citometria de fluxo e alíquotas desta suspensão celular foram congeladas em nitrogênio líquido. Os fibroblastos utilizados no estudo foram obtidos através de 1^a, 2^a e 3^a passagens. Todos os fibroblastos do trabalho foram semeados em placas de 96 orifícios com fundo chato ou subcultivadas em placas de Petri.

3.2 Cultura de células endoteliais humanas

As culturas de células endoteliais – HUVEC foram isoladas a partir da veia de cordões umbilicais humanos provenientes de uma linhagem comercial adquirida da ATCC número CRL-1730/HUVEC cujos padrões de coleta e preparo seguem os mesmos descritos por Jaffe et al. (1973). No preparo dos subcultivos, o descolamento do tapete celular foi realizado, através de tripsinização. Para isto, a monocamada celular foi lavada com 1mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz) e, após a lavagem, esta foi desprezada e acrescentado mais 1 mL de ATV. Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variáveis de meio 199 acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Nesta etapa, a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo soro fetal bovino presente no meio de cultura; o volume total da suspensão celular foi diluído em meio 199 acrescido de 10% de soro fetal bovino, e transferido para outras garrafas, de modo a se obter concentração celular de 10^6 células/mL.

3.3 Irradiação das culturas celulares com Luz Intensa Pulsada

As culturas de FN1 e HUVEC foram irradiadas com luz intensa pulsada (Active Record® 618, Israel) com variação de comprimento de onda entre 420 e 1110 nm, fluências de 10, 16 e 20 J/cm², duração de pulso 10 ms, *spot size* 7,5 cm², banda larga. (Figura 6).

Figura 6: Demonstração da aplicação da luz intensa pulsada em culturas celulares em capela de fluxo laminar

As culturas de FN1 e HUVEC foram irradiadas com três disparos consecutivos de Luz Intensa Pulsada (LIP). Cada placa de 96 orifícios foi irradiada seguindo o mesmo padrão, sendo que cada duas colunas de orifícios da placa recebeu um tipo de energia. Duas colunas consecutivas da placa correspondem ao mesmo tamanho do *hand piece* do aparelho de LIP. Das oito colunas de orifícios foi possível dividir 4 grupos e enquanto, um grupo recebeu a irradiação, os demais grupos foram protegidos por meio de um anteparo físico (Figuras 7 e 8).

Figura 7: Demonstração da aplicação da LIP sobre as culturas celulares

Figura 8: Foto ilustrativa da proteção com o anteparo físico utilizado nas placas de cultura dos grupos não irradiados

O delineamento experimental foi realizado nos seguintes esquemas de tratamento, conforme ilustrado na Figura 9:

Grupo controle – FN1 e HUVEC não tratados com LIP;

Grupo tratado com 10 J/cm^2 e analisados após 24 e 48 horas de cultura;

Grupo tratado com 16 J/cm^2 e analisados após 24 e 48 horas de cultura;

Grupo tratado com 20 J/cm^2 e analisados após 24 e 48 horas de cultura.

Figura 9: Distribuição dos grupos controle e irradiados na placa de cultura fundo chato de 96 orifícios

3.4 Análise da capacidade proliferativa pelo método colorimétrico MTT

A análise da capacidade proliferativa foi realizada nos FN1 e HUVEC nos períodos de 24 e 48 horas de cultura no grupo controle e após a irradiação com LIP. Para esta análise foi empregado o método de MTT descrito por Mosmann em 1983. Este método baseia-se na medida da atividade da enzima succinato - desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), que depois de ativada, é capaz de reduzir o reagente MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide)], composto de coloração amarela, em cristais de formazan, de coloração violácea (Figura 10), portanto, ocorrendo apenas em células viáveis (Hansen et al., 1989). O teste MTT avalia a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas capazes de reduzir o MTT por desidrogenases mitocondriais a cristais de formazan.

Figura 10: Coloração violácea obtida após aplicação da LIP em FN1 pelo método colorimétrico MTT

Foram diluídos 3 mL da solução estoque de MTT (5mg/mL) em 12 mL de PBS (tampão fosfato de sódio) totalizando 15 mL de solução. Alíquotas de 100 µL da solução MTT foram distribuídas em cada orifício das placas contendo as amostras. Em seguida as placas foram embaladas em papel alumínio e mantidas durante 3 horas em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Após esta etapa o sobrenadante foi removido e foram acrescentados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% para dissolução dos cristais de formazan que foram formados e precipitados.

Os resultados foram adquiridos em espectofotômetro (Thermo Plate – TR-Reader) para a obtenção da densidade óptica determinada a uma absorbância no comprimento de onda de 535 nm. Os resultados expressaram a porcentagem média de células viáveis. O valor da média da densidade óptica do grupo controle foi considerado 100% de viabilidade celular e os resultados dos demais grupos experimentais foram comparados a este valor.

3.5 Determinação da formação de peróxidos lipídicos

A avaliação da peroxidação lipídica (LPO) foi realizada nas culturas de FN1 e HUVEC 24 horas e 48 horas após a irradiação com LIP. Para a avaliação da peroxidação lipídica foi utilizada a técnica de Ohkawa et al. (1979) baseada na formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (SRATB), predominantemente o malondialdeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares.

Uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a oxidação de lipídeos é o teste do MDA. O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão beta dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. O MDA é volátil, possui baixo peso molecular ($C_3H_4O_2$, P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1, 3-dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco (pK_a - 4,46). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (Janero, 1990; Benzie, 1996). A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos de coloração rosa que podem ser determinados espectrofotometricamente no comprimento de onda de 535 nm. Através desta técnica foi possível avaliar a degradação oxidativa de ácidos graxos presentes em sobrenadantes das culturas de FN1 e HUVEC nos grupos controle e nos grupos irradiados com LIP.

Alíquotas de 20 μ L do sobrenadante das amostras de FN1 e HUVEC dos grupos controle e irradiados com LIP foram transferidas para tubos Eppendorf com 100 μ L de ácido tricloroacético 20% (TCA). Em outra série, alíquotas de 20 μ L das mesmas amostras citadas foram transferidas para tubos Eppendorf com 100 μ L de TBA 0,86% e TCA 20%. As amostras foram mantidas em banho-maria a 100° C durante 20 minutos. Em seguida os tubos foram retirados da fervura e imediatamente imersos em banho de gelo por mais 20 minutos. Após esta etapa os tubos foram centrifugados durante 4 minutos a 8000 rpm (Spin VI - Incibrás). Foram retirados 100 μ L do sobrenadante e distribuídos em placas de 96 orifícios de fundo chato, conforme delineamento

experimental, para leitura e obtenção da densidade óptica no espectofotômetro (Thermo Plate – TR-Reader) com comprimento de onda de 535 nm.

O cálculo da medida da peroxidação lipídica foi realizado subtraindo-se os valores do branco de cada série, e a absorbância média da série TCA é obtida pela diferença da absorbância TBA/TCA dividida pelo coeficiente molar do malondialdeído.

$$\text{LPO} = \frac{(\text{média da absorbância TBA/TCA}) - (\text{média da absorbância TCA}) \times 5}{0,0312 \text{ (coeficiente molar do malondialdeído)}}$$

Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/mL de sobrenadante (nmoles/mL).

3.6 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Neste projeto foi utilizada a metodologia descrita por Vindelov et al. (1983) 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 de FN1 ou HUVEC na concentração de 1 x 10⁶ células/mL e incubadas em estufa de cultura a 37° C e 5% de CO₂, durante a noite. Após este período e confluência de 70%, as células foram submetidas a diferentes densidades de energia da luz intensa pulsada. Após 24 horas, o sobrenadante foi aspirado com o

auxílio de uma bomba de vácuo e após o período de incubação de 24 ou 48 horas, as suspensões celulares aderidas foram removidas pelo tratamento 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 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 Caracterização dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular e nas vias de morte celular programada por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é utilizada para a identificação de tipos celulares em suspensão, promovendo a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (Roitt et al., 1999). A avaliação do tamanho relativo da célula *Forward scatter* –

Side Scatter – permite a sua classificação (Grindem, 1996). A avaliação da intensidade de fluorescência ocorre para detecção de receptores de superfície diferentes marcados com anticorpos monoclonais específicos ligados a compostos fluorescentes (Grindem, 1996).

A avaliação de receptores intracelulares (nuclear e citoplasmático) por citometria de fluxo é essencial durante o estudo de marcadores de diferenciação ou de vias de sinalização, como por exemplo, a fosforilação de kinases da via apoptótica (Koester; Bolton, 2000). A utilização de saponina para permeabilização celular tem se mostrado eficaz já que suas propriedades detergentes permeabilizam a membrana citoplasmática sem danificá-la ou alterar a expressão dos receptores de membrana, permitindo a detecção simultânea de marcadores intracelulares e de superfície. A saponina é um agente detergente que interage com o colesterol da membrana citoplasmática em pequenas concentrações preservando a morfologia normal da célula (Jacob et al., 1991).

A determinação dos marcadores de citotoxicidade (Iodeto de Propídeo - PI), de proliferação (ciclina D1), e de apoptose (caspase 3 fosforilada) foi realizada em citômetro de fluxo em alíquotas de 100 µL contendo 10^6 células de FN1 e HUVEC dos grupos controle e irradiados com LIP nos períodos de 24 e 48 horas após irradiação. As células foram incubadas na presença de saponina 0,1% para a permeabilização da membrana celular durante 1 hora a 4°C. Após este período, as células foram lavadas em tampão *FACS flow* e ressuspensas em tampão contendo 1 µg de anticorpo específico marcados com os fluorocromos verde (FITC – isotiocianato de fluoresceína) ou vermelho (PE - ficoeritrina). Após a ligação específica do anticorpo, as células foram

centrifugadas, lavadas em PBS gelado, o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspenso em PBS contendo 0,1% de paraformaldeído e albumina sérica bovina.

A aquisição dos histogramas e *dot plots* dos respectivos marcadores foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (*Fluorescence Activated Cell Analyser* – Becton & Dickinson, USA), seguida da análise pelo programa Cell Quest (BD), com aquisição de 10.000 eventos tendo como parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade/complexidade) em escala linear e FL1 e FL2 em escalas logarítmicas que detectam respectivamente FITC e PE.

Para a determinação da expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 por citometria de fluxo, após o crescimento e a aplicação da LIP, as células dos diferentes grupos de irradiação e controle foram tripsinizadas e sua membrana celular permeabilizada com detergente aniônico Triton X-100 na concentração de 0,1% durante 1 hora em temperatura de - 4°C, permitindo a sua identificação como marcador nuclear. O anticorpo monoclonal utilizado marcado com o fluorocromo ficoeritrina (PE) específico para o marcador Ki-67 foi adquirido e a sua intensidade analisada no canal FL-2.

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

Para a análise das mitocondriais e seu potencial proto-iônico, as culturas de FN1 e HUVEC dos grupos controle e irradiados 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.

3.9 Análise da atividade mitocondrial por microscopia confocal

Os fibroblastos foram observados utilizando-se o sistema confocal da Zeiss (MRC 1024 UV) equipado com lasers Argônio-Kriptônio (Ar-Kr) e Ultra-Violeta (UV), acoplado a um microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 100 Zeiss). No sistema confocal foi utilizada a objetiva de 40 X. Para a microscopia confocal, a linha de 568 nm foi utilizada para excitar a rodamina-123. A observação da Rh-123 foi realizada com a utilização dos filtros de emissão HQ 598/40, HQ 522/35 e filtros barreira T1/E2, supridos pelo fabricante. O brilho e o contraste foram mantidos constantes para todos os grupos. Imagens de um único plano focal ou de um grupo de imagens de vários planos focais foram adquiridas com auxílio do software do fabricante e salvas em um disco óptico.

3.10 Quantificação da biossíntese de colágeno pelos Fibroblastos

As moléculas de colágeno, ricas em aminoácidos básicos, reagem fortemente com corantes aniônicos. O picrosirius - red é um corante com molécula alongada que reage com o colágeno e promove aumento da sua birrefringência normal devido ao fato de que muitas moléculas do corante são alinhadas paralelamente ao maior eixo da molécula de colágeno (Borges et al., 2007). O corante picrosirius - red tem se tornado cada vez mais útil entre as técnicas de coloração devido à simplicidade do procedimento e a consistência dos resultados. A coloração obtida é permanente e quase sempre garantida. Os produtos químicos necessários são relativamente baratos e de longa durabilidade. As soluções para estoque apresentam modo de preparo simples e longa durabilidade e todos os procedimentos são realizados em temperatura ambiente (Coleman, 2010).

As placas contendo os FN1 fixados foram colocadas em estufa a 37° C *overnight* sem a tampa. Em seguida o material foi fixado com 200 µL de solução de Bouin durante 1 hora. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes com água destilada e secas em temperatura ambiente por 2 horas. Após a secagem as placas foram coradas com 200 µL em cada poço de solução vermelho sirius (0,5 g vermelho sirius F3B Gurr BDH, Germany, em 500 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico) durante 1 hora, sob leve agitação, à temperatura ambiente, protegido da luz. Após a coloração o sobrenadante foi removido por aspiração em bomba de vácuo, as placas foram lavadas com 250 µL por poço de ácido clorídrico 0,01 mol/L para a remoção do corante não

fixado. As fibras colágenas coradas foram solubilizadas pela adição de 150 μL de hidróxido de sódio 0,01 mol/L durante 1 hora, sob agitação.

Os resultados foram adquiridos em espectofotômetro (Thermo Plate – TR-Reader) para a obtenção da densidade óptica determinada a uma absorbância no comprimento de onda de 535 nm. Os dados obtidos foram expressos em porcentagem média da síntese de colágeno. Os resultados obtidos foram comparados com as curvas padrão de colágeno tipo I humano (Sigma, Alemanha).

3.11 Microscopia eletrônica de varredura em fibroblastos

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.

Após o crescimento dos FN1 e a aplicação da LIP, 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.

O preparo e as análises das amostras foram realizados 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 - EDAX 20 KV). As imagens foram gravadas em arquivo digital.

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi obtida pelo método de variância – ANOVA com teste comparativo múltiplo de Tukey. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de cada experimento. Os valores significantes foram considerados com $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

4 RESULTADOS

4.1 Análise das alterações morfológicas causadas pela irradiação com LIP em FN1 e HUVEC

4.1.1 FN1

Os FN1 em fase exponencial de crescimento foram submetidos à irradiação com LIP nas intensidades de energia de 10, 16 e 20 J/cm² e analisados nos períodos de 24 e 48 horas após a irradiação. Foram capturadas imagens em microscópio invertido para a avaliação das alterações celulares causadas após a irradiação com LIP. Os fibroblastos humanos, quando em cultura, são células fusiformes aderentes, uninucleadas, que se dispõem em monocamada.

Nos grupos de células irradiadas, após 24 horas não foram observados desprendimentos, perda dos prolongamentos citoplasmáticos ou vacuolizações citoplasmáticas em nenhuma das intensidades de energia utilizadas. Após 48 horas, entretanto, no grupo tratado com LIP na intensidade de energia de 20 J/cm², houve aumento na densidade celular, além da formação de pequeno grupo de células com alterações morfológicas que se assemelham a células em injúria, caracterizadas pelas retrações dos prolongamentos citoplasmáticos fazendo com que estas células assumam um formato arredondado, cromatina condensada e nucléolos evidentes; possivelmente um processo de morte celular. As fotomicrografias dos grupos controle, 24 e 48 horas,

estão apresentadas nas Figuras 11A e B, respectivamente e dos grupos irradiados com 20 J/cm^2 , 24 e 48 horas, nas Figuras 12A e B, respectivamente.

Figura 11: Fotomicrografias adquiridas em microscópio invertido de FN1 do grupo controle após 24 horas (A) e 48 horas de cultura (B). As setas evidenciam células fusiformes, com núcleo único e central sem a presença de vacuolizações ou perda de adesão ao substrato. Aumento 40X

Figura 12: Fotomicrografias adquiridas em microscópio invertido de FN1 do grupo irradiado com LIP na intensidade de 20 J/cm^2 após 24 horas (A) e 48 horas de cultura (B). Em A, células fusiformes, com núcleo único e central sem a presença de vacuolizações ou perda de adesão; em B, aumento significativo da densidade celular, no detalhe observa-se grupos de células arredondadas, com perda dos prolongamentos citoplasmáticos, cromatina condensada e nucléolos evidentes. Aumento 40 X

4.1.2 HUVEC

As HUVEC, em fase exponencial de crescimento, foram submetidas à irradiação com LIP nas intensidades de energia de 10, 16 e 20 J/cm² e analisadas nos períodos de 24 e 48 horas após a irradiação. Foram capturadas imagens em microscópio invertido para a avaliação das alterações causadas após a irradiação com LIP. As HUVEC apresentaram-se como células uniformes, arredondadas, aderentes, uninucleadas com disposição em monocamada. Os resultados de 24 e 48 horas após a aplicação da LIP não evidenciaram alterações celulares morfológicas entre os grupos controle e irradiado. Não foram observados desprendimento, formação de debris ou vacúolos.

As fotomicrografias adquiridas em microscopia invertida estão apresentadas nas Figuras 13A e B do grupo controle 24 e 48 horas, respectivamente e Figuras 14A e B do grupo irradiado com 20 J/cm² 24 e 48 horas, respectivamente.

Figura 13: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido das HUVEC do grupo controle após 24 horas (A) e 48 horas de cultura (B). Notam-se células endoteliais dispostas em monocamada com formato arredondado e com núcleo central. Aumento de 10X em A e 40X em B

Figura 14: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido das HUVEC do grupo irradiado com 20 J/cm² após 24horas (A) e 48 horas de cultura (B). Notam-se células endoteliais dispostas em monocamada com formato arredondado e com núcleo central. Aumento de 40X

4.2 Análise da capacidade proliferativa pelo método colorimétrico MTT

4.2.1 FN1

4.2.1.1 Determinação da capacidade proliferativa em culturas de FN1 24 horas após irradiação com LIP

O teste colorimétrico MTT é amplamente utilizado para quantificar a capacidade proliferativa e viabilidade celular. Permite analisar a atividade da cadeia respiratória mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular pela medida da enzima succinato desidrogenase. Analisando os resultados no período de 24 horas apresentados no gráfico da Figura 15 foi possível observar o aumento da resposta proliferativa do grupo de FN1 após a irradiação com LIP nas diferentes intensidades de energia comparado com o grupo controle. Essas diferenças mostraram-se intensificadas na intensidade de energia de 20 J/cm² ($127,6 \pm 9,3\%$) em comparação às intensidades de 10 J/cm² ($107,9 \pm 8,4\%$) e de 16 J/cm² ($107,7 \pm 6,0\%$) ($p < 0,001$).

Figura 15: Gráfico das médias das porcentagens de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT em culturas de FN1 24 horas após irradiação com LIP no grupo controle e nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²). *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.2.1.2 Determinação da capacidade proliferativa em culturas de FN1 48 horas após irradiação com LIP

Após 48 horas de tratamento com LIP os FN1 mostraram aumento significativo na resposta proliferativa na intensidade de 20 J/cm² comparado ao grupo controle. A resposta proliferativa se manteve aumentada cerca de 1,5 vezes nas intensidades de 10 e 16 J/cm² apesar de não haver diferenças significativas. Os valores das médias e desvio padrão no período de 48 horas estão apresentados no gráfico da Figura 16.

Figura 16: Gráfico das médias das porcentagens de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT em culturas de FN1 48 horas após irradiação com LIP no grupo controle e nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²). ns - não significativo; *Diferenças estatísticas (teste de variância de ANOVA)

4.2.2 HUVEC

4.2.2.1 Determinação da capacidade proliferativa em culturas de HUVEC 24 e 48 horas após irradiação com LIP.

As HUVEC não mostraram diferenças significativas na capacidade proliferativa avaliada pelo método MTT após a irradiação das diferentes intensidades de LIP nos períodos de 24 e 48 horas. Os resultados das médias e desvio padrão estão apresentados nos gráficos das Figuras 17 e 18.

Figura 17: Gráfico das médias das porcentagens de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT em culturas de HUVEC 24 horas após irradiação com LIP no grupo controle e nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²). ns - não significativo (teste de variância de ANOVA)

Figura 18: Gráfico das médias das porcentagens de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT em culturas de HUVEC 48 horas após irradiação com LIP no grupo controle e nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²). ns - não significativo (teste de variância de ANOVA)

4.3 Determinação da formação de peróxidos lipídicos (LPO)

4.3.1 FN1

4.3.1.1 Determinação da formação de peróxidos lipídicos em cultura de FN1 24 horas após a irradiação com LIP

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada pela técnica descrita por Ohkawa et al. (1979), baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB), predominantemente o malondialdeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Alíquotas de 20 µL do sobrenadante das culturas de FN1 dos grupos controle e irradiado com LIP foram avaliadas nos períodos de 24 e 48 horas. Os resultados em FN1 após 24 horas da irradiação com LIP não mostraram diferenças significativas na quantidade de radicais livres formados reativos

com o ácido tiobarbitúrico quando comparados ao grupo controle. Os valores das médias expressas em nmoles/mL estão apresentados no gráfico da Figura 19.

Figura 19: Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (expressos em nmoles/mL) em sobrenadante de culturas de FN1 24 horas após irradiação com LIP nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²) e no grupo controle. ns - não significativo (Teste de Variância de ANOVA)

4.3.1.2 Determinação da formação dos peróxidos lipídicos em cultura de FN1 48 horas após irradiação com LIP

A produção de radicais livres derivados de lipídeos poliinsaturados em FN1 após 48 horas mostrou diferenças significativas nas intensidades de 16 e 20 J/cm². No grupo irradiado com 16 J/cm² o aumento na síntese de peróxidos lipídicos foi cerca de 2 vezes (30,5 ± 11 nmoles/mL) e na intensidade de 20 J/cm² este aumento foi de aproximadamente 3 vezes (44,7 ± 11,5 nmoles/mL) em relação ao grupo controle (15,4 ± 6 nmoles/mL). Os dados estão representados no gráfico da Figura 20.

Figura 20: Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (expressos em nmoles/mL) em sobrenadante de culturas de FN1 48 horas após irradiação com LIP nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²) e no grupo controle. ns - não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.3.2 HUVEC

4.3.2.1 Determinação da formação de peróxidos lipídicos em cultura de HUVEC 24 horas após irradiação com LIP

A determinação dos radicais livres em HUVEC no grupo controle mostrou quantidades diferentes aos encontrados nos FN1 avaliados após 24 horas de irradiação. Nas HUVEC houve um aumento significativo dos níveis de peróxidos lipídicos poliinsaturados dependentes da intensidade aplicada. No grupo controle a produção de radicais livres foi de $5,5 \pm 2,3$ nmoles/mL. Na intensidade de 10 J/cm² houve uma

produção de $26,4 \pm 10,7$ nmoles/mL; com 16 J/cm^2 houve uma produção de $30,7 \pm 8,9$ nmoles/mL e no grupo tratado com 20 J/cm^2 a produção foi de $37,8 \pm 7,5$ nmoles/mL. Os dados estão apresentados no gráfico da Figura 21.

Figura 21: Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (expressos em nmoles/mL) em sobrenadante de culturas de HUVEC 24 horas após irradiação com LIP nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm^2 , 16 J/cm^2 e 20 J/cm^2) e no grupo controle. *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.3.2.2 Determinação da formação de peróxidos lipídicos em cultura de HUVEC 48 horas após irradiação com LIP

Nos experimentos realizados após 48 horas, conforme apresentados no gráfico da Figura 22, não houve diferenças estatísticas na produção de peróxidos lipídicos entre os grupos irradiados com 10 e 16 J/cm^2 comparado ao grupo controle. Entretanto, no grupo irradiado com 20 J/cm^2 houve diferença significativa com aumento de aproximadamente 4 vezes na produção de radicais livres.

Figura 22: Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (expressos em nmoles/mL) em sobrenadante de culturas de HUVEC 48 horas após irradiação com LIP nas diferentes intensidades de energia (10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm²) e no grupo controle. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.4 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Neste projeto foram avaliadas separadamente as populações de células contidas no ciclo celular e as células mortas que apresentaram DNA fragmentado, conforme descrito no item métodos. Os dados estão representados como o número de células versus intensidade de fluorescência, que é proporcional a quantidade de DNA.

4.4.1 FN1

O histograma da Figura 23 representa a distribuição das fases do ciclo celular em FN1, grupo controle, obtido por citometria de fluxo. Os quadrantes obtidos pelo programa de análise destacados na figura representam respectivamente as seguintes fases do ciclo: M1= fase G2/M; M2 = Fase S; M3 = fase G0/G1 e M4 = DNA fragmentado.

Figura 23: Histograma representativo das fases do ciclo celular em cultura de FN1 do grupo controle 24 horas após irradiação com LIP, obtido pelo citômetro de fluxo FACScalibur

4.4.1.1 Determinação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo de FN1 24 e 48 horas após irradiação com LIP

A análise da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular dos grupos de FN1 irradiados após 24 e 48 horas em comparação ao grupo controle evidenciou alterações significativas em todos os grupos nas diferentes fases do ciclo celular, exceto nos valores representativos do DNA fragmentado. As médias $\pm$ desvio padrão nos intervalos de 24 e 48 horas estão evidenciados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de FN1 nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de irradiação com LIP

Fases do ciclo celular	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
DNA fragmentado	0,79 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,04	1,5 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2
G0/G1	2,68 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 1,7	4,4 $\pm$ 0,9	12,7 $\pm$ 2,4
S	47,6 $\pm$ 0,4	50,7 $\pm$ 0,3	73,8 $\pm$ 1,3	36,6 $\pm$ 0,5
G2/M	49,14 $\pm$ 0,3	44,3 $\pm$ 2,0	21,5 $\pm$ 2,1	21,9 $\pm$ 0,8

Tabela 4: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de FN1 nas diferentes fases do ciclo celular após 48 horas de irradiação com LIP

Fases do ciclo celular	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
DNA fragmentado	1,1 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1
G0/G1	5,7 $\pm$ 2,3	5,9 $\pm$ 1,3	10,2 $\pm$ 1,2	7,4 $\pm$ 2,5
S	72,9 $\pm$ 1,6	42,6 $\pm$ 11,7	65,9 $\pm$ 0,1	68,4 $\pm$ 0,2
G2/M	25,6 $\pm$ 2,6	43,8 $\pm$ 2,9	23,9 $\pm$ 1,3	24,3 $\pm$ 2,8

Os FN1 irradiados com LIP não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle na quantidade de DNA fragmentado em 24 e 48 horas. Na fase G0/G1 as diferenças significativas só ocorreram após 24 horas com aumento de aproximadamente 6 vezes na porcentagem de FN1 na fase de quiescência (G0/G1) na intensidade de 20 J/cm².

Na fase S as células irradiadas com 16 J/cm² apresentaram aumento significativo de aproximadamente 54% e, no grupo irradiado com 20 J/cm², ocorreu diminuição de cerca de 23% após 24 horas, enquanto que, após 48 horas, os FN1 apresentaram diminuição de suas células na fase S apenas na intensidade de 10 J/cm² ($p < 0,05$).

Os fibroblastos apresentaram diferenças significativas na sua porcentagem na fase G2/M tanto em 24 horas quanto em 48 horas. Houve diminuição de cerca de 2 vezes nas intensidades de 16 e 20 J/cm² em 24 horas e aumento de aproximadamente 43% destas células na fase G2/M na intensidade de 10 J/cm² em 48 horas (Figuras 24 e 25).

Figura 24: Gráficos das médias das porcentagens de FN1 que se apresentaram com DNA fragmentado no ciclo celular detectados por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

Figura 25: Gráficos das médias das porcentagens de FN1 que se apresentaram na fase G0/G1 do ciclo celular detectados por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

Figura 26: Gráficos das médias das porcentagens de FN1 que se apresentaram na fase S do ciclo celular detectadas por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

Figura 27: Gráficos das médias das porcentagens de FN1 que se apresentaram na fase G2/M do ciclo celular detectadas por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.4.2 Determinação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo das HUVEC 24 e 48 horas após a irradiação com LIP

A Figura 28 representa o histograma das fases do ciclo celular obtido por citometria de fluxo em HUVEC no grupo controle 24 horas após LIP.

Figura 28: Histograma representativo das fases do ciclo celular em cultura de HUVEC do grupo controle 24 horas após irradiação com LIP, obtido pelo citômetro de fluxo FACScalibur

Decorridas 24 horas após irradiação com LIP as HUVEC apresentaram aumento significativo no DNA fragmentado diretamente proporcional à intensidade de energia. O aumento na porcentagem de DNA fragmentado foi de 2,7, 3 e 3,7 vezes nas intensidades

de 10, 16 e 20 J/cm² respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, após 48 horas de cultura, as HUVEC não alteraram o percentual de DNA fragmentado quando comparados ao grupo controle.

O percentual de HUVEC na fase de quiescência (G0/G1) sofreu aumento significativo em 24 horas, porém o mesmo não se manteve após 48 horas de irradiação com LIP. As células distribuídas na fase S do ciclo celular sofreram diminuição em 24 horas em aproximadamente 60%, 40% e 44%, nas intensidades de 10, 16 e 20 J/cm² respectivamente. Entretanto, após 48 horas os resultados não foram significativos.

Os percentuais de HUVEC distribuídos na fase G2/M não sofreram alterações significativas nos intervalos de 24 e 48 horas após a irradiação com LIP. Os dados estão representados nos gráficos das Figuras 29, 30, 31 e 32. As médias $\pm$ desvio padrão nos intervalos de 24 e 48 horas estão evidenciados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de HUVEC nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de irradiação com LIP

Fases do ciclo celular	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
DNA fragmentado	1,45 $\pm$ 0,15	3,9 $\pm$ 0,07	4,5 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 0,2
G0/G1	5,4 $\pm$ 1,1	7,6 $\pm$ 1,7	15,1 $\pm$ 1,8	14,5 $\pm$ 3,0
S	81,0 $\pm$ 0,5	38,9 $\pm$ 7,0	48,2 $\pm$ 1,4	45,1 $\pm$ 4,6
G2/M	14,4 $\pm$ 2,1	21,9 $\pm$ 3,6	16,1 $\pm$ 3,2	17,6 $\pm$ 2,7

Tabela 6: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de HUVEC nas diferentes fases do ciclo celular após 48 horas de irradiação com LIP

Fases do ciclo celular	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
DNA fragmentado	1,45 $\pm$ 0,1	1,67 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,4
G0/G1	3,1 $\pm$ 0,1	1,84 $\pm$ 0,05	1,38 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,2
S	71,4 $\pm$ 1,3	71,2 $\pm$ 2,5	75,1 $\pm$ 2,3	72,9 $\pm$ 0,2
G2/M	24,1 $\pm$ 1,2	26,6 $\pm$ 1,6	22,7 $\pm$ 1,4	23,6 $\pm$ 0,4

Figura 29: Gráficos das médias das porcentagens das HUVEC que apresentaram DNA fragmentado no ciclo celular detectados por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

Figura 30: Gráficos das médias das porcentagens das HUVEC que se apresentaram na fase G0/G1 do ciclo celular detectados por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

Figura 31: Gráficos das médias das porcentagens das HUVEC que se apresentaram na fase S do ciclo celular detectadas por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

Figura 32: Gráficos das médias das porcentagens das HUVEC que se apresentaram na fase G2/M do ciclo celular detectadas por citometria de fluxo após a aplicação de LIP após 24 horas (A) e 48 horas (B). ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.5 Caracterização dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular e das vias de morte celular programada por citometria de fluxo

4.5.1 FN1

4.5.1.1 Toxicidade pela incorporação de Iodeto de Propídeo 24 e 48 horas após a irradiação com LIP

Os efeitos na toxicidade celular foram avaliados pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de FN1. Após 24 horas de cultura não houve alteração na toxicidade celular nos grupos irradiados quando comparados ao grupo controle. Porém, após 48 horas, os grupos irradiados com LIP apresentaram diferenças significativas na toxicidade celular quando comparados ao controle. Houve aumento de aproximadamente 3 vezes no percentual de mortalidade celular no grupo irradiado com 10 J/cm². No grupo irradiado com 16 J/cm² o aumento da toxicidade foi cerca de 6 vezes e no grupo com 20 J/cm² o aumento da toxicidade foi de 7,5 vezes, quando comparado ao controle, conforme representado no gráfico da Figura 34. Os histogramas representativos da viabilidade celular adquiridos pelo citômetro de fluxo e analisados no programa WinMDI 2.8 dos grupos controle e irradiado com 20 J/cm² com 24 horas e 48 horas de cultura após irradiação com LIP estão ilustrados na Figura 33. As porcentagens de incorporação do PI pelos FN1 $\pm$ desvio padrão estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de incorporação do PI em FN1 24 e 48 horas pós LIP

Intervalo pós LIP	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
24 horas	4,1 $\pm$ 0,5	7,9 $\pm$ 2,2	6,5 $\pm$ 1,2	12,1 $\pm$ 3,0
48 horas	2,2 $\pm$ 0,6	6,8 $\pm$ 0,6	12,9 $\pm$ 0,9	16,5 $\pm$ 0,7

Figura 33: Histogramas representativos da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de FN1 por citometria de fluxo. Em A - grupo controle 24h; B - 20 J/cm², 24h; em C - grupo controle, 48h e D - 20 J/cm² 48 h

Figura 34: Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da viabilidade celular pelo método de difusão de PI pela membrana celular de FN1 mantidos em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP analisados por citometria de fluxo. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.5.1.2 Expressão do marcador Ki-67 em FN1 após 24 e 48 horas de cultura

O anticorpo Ki-67 reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular e que, em células contidas no ciclo celular, é expresso em todas as fases, exceto em G0 (Gerdes et al., 1984).

Os histogramas representativos da expressão do marcador Ki-67 adquiridos pelo citômetro de fluxo e analisados no programa WinMDI 2.8 dos grupos controle e irradiado com 20 J/cm² com 24 horas e 48 horas de cultura após irradiação com LIP estão ilustrados na Figura 35. Os valores da média obtidos da expressão do marcador Ki-67 em FN1 mostraram-se diferencialmente expressos após a irradiação nos períodos de 24 horas e 48 horas. Após 24 horas de cultura os resultados mostraram diminuição significativa dependente da intensidade de energia. Houve diminuição de cerca de 3 vezes na intensidade de energia de 20 J/cm² em relação ao grupo controle. Os resultados da irradiação após 48 horas mostraram uma inversão em sua expressão. Portanto, após a irradiação com 20 J/cm² houve aumento significativo na expressão deste marcador cerca de 1,5 vezes em relação ao grupo controle. Os valores da média $\pm$ desvio padrão estão representados no gráfico da Figura 36 e Tabela 8.

Tabela 8: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de expressão do marcador Ki-67 em FN1 24 e 48 horas pós LIP

Intervalo pós LIP	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
24 horas	71,5 $\pm$ 4,9	48,8 $\pm$ 2,6	41,9 $\pm$ 1,6	25,4 $\pm$ 0,6
48 horas	41,5 $\pm$ 7,6	46,4 $\pm$ 1,8	54,6 $\pm$ 2,4	67,8 $\pm$ 5,7

Figura 35: Histogramas representativos adquiridos em citômetro de fluxo e analisados pelo programa WinMDI do marcador Ki-67 em FN1. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm², 24 h, em C - grupo controle, 48 h e D - 20 J/cm², 48 horas

Figura 36: Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Ki-67 de FN1 mantidos em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP obtidos por citometria de fluxo. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.5.1.3 Expressão dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular e nas vias de morte celular em FN1 após 24 e 48 horas de cultura

4.5.1.3.1 Caspase 3

A ativação da caspase 3 tem um papel fundamental nas vias centrais da apoptose. A caspase 3 é uma cisteína protease responsável pela quebra e empacotamento de componentes celulares para a regulação e reparo do DNA. O anticorpo específico utilizado para a determinação da caspase 3 ativada ou fosforilada foi conjugado com o fluorocromo ficoeritrina (PE). A aquisição da quantidade ou expressão dos receptores na superfície celular dos fibroblastos foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur e analisadas no programa WinMDI 2,8.

A expressão da caspase 3 fosforilada em FN1 após 24 horas da irradiação com LIP mostrou não haver diferenças significativas entre as intensidades de energia utilizadas e o grupo controle. Entretanto, após 48 horas, as diferenças foram significativas, ocorrendo aumento na expressão da caspase 3 em todas as intensidades de energia, principalmente na intensidade de 20 J/cm², em comparação ao grupo controle (Tabela 9). Os dados estão apresentados nos histogramas da Figura 37 e gráfico da Figura 38.

Tabela 9: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de expressão de caspase 3 fosforilada em FN1 24 e 48 horas pós LIP

Intervalo pós LIP	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
24 horas	1,8 $\pm$ 1,3	4,4 $\pm$ 4,0	3,9 $\pm$ 3,5	5,0 $\pm$ 3,9
48 horas	11,6 $\pm$ 1,7	26,8 $\pm$ 4,2	32,7 $\pm$ 2,9	54,2 $\pm$ 1,4

Figura 37: Histogramas representativos da expressão dos marcadores Ciclina D1 e Caspase 3 fosforilada em FN1. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm² 24 h, em C - grupo controle 48 h e D - 20 J/cm² 48 horas

Figura 38: Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador caspase 3 de FN1 mantidos em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP, obtidos por citometria de fluxo. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.5.1.3.2 Ciclina D1

O ciclo celular é controlado pela fosforilação de várias proteínas realizadas por uma família de enzimas que desempenham papel específico durante determinadas fases do ciclo e são denominadas ciclinas dependentes de kinases (CDK). Estas kinases são ativadas por ciclinas específicas nomeadas de acordo com a sua variação na concentração dentro das diferentes fases do ciclo celular (Morgan, 1997). A ciclina D1 é um regulador positivo da progressão da fase G1 para S e diversos relatos mostram que a super expressão de ciclina D1 leva ao encurtamento da fase G1, causando aumento da proliferação celular.

A expressão da ciclina D1 foi diferencialmente apresentada pelos FN1 após a irradiação com LIP. Após 24 horas os fibroblastos submetidos às intensidades de energia de 10 J/cm² e 16 J/cm² apresentaram aumento significativo na expressão do marcador ciclina D1 em relação ao grupo controle. Entretanto, apesar do aumento da expressão da ciclina D1 na intensidade de 20 J/cm² em relação ao controle, houve diminuição significativa na expressão deste marcador em relação às demais intensidades de energia (Figura 39A).

Os resultados dos experimentos realizados após 48 horas mostraram aumento na expressão da ciclina D1 nas intensidades de energia de 10 J/cm² e 16 J/cm². Embora a irradiação com 20 J/cm² tenha apresentado aumento significativo na expressão da ciclina D1 neste grupo em relação ao grupo controle, houve diminuição significativa em relação às demais intensidades de energia utilizadas, como demonstrado no gráfico da Figura

39B. As médias $\pm$ desvio padrão estão demonstrados na Tabela 10. Os histogramas representativos estão apresentados na Figura 37.

Figura 39: Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Ciclina D1 de FN1 mantidos em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP
*Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

Tabela 10: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de expressão da ciclina D1 em FN1 24 e 48 horas pós LIP

Intervalo pós LIP	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
24 horas	35,1 $\pm$ 7,3	71,1 $\pm$ 2,7	87,3 $\pm$ 0,6	58,7 $\pm$ 0,8
48 horas	19,9 $\pm$ 4,0	62,1 $\pm$ 3,2	62,2 $\pm$ 0,3	42,7 $\pm$ 1,1

4.5.2 HUVEC

4.5.2.1 Toxicidade pela incorporação de Iodeto de Propídeo após 24 e 48 horas de cultura analisados por citometria de fluxo

Os efeitos da viabilidade celular foram avaliados pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de HUVEC. Após 24 horas de cultura não houve alteração significativa na viabilidade celular nos grupos irradiados quando comparados ao grupo controle (Figura 41A). Porém, após 48 horas, os grupos irradiados com LIP apresentaram diferenças significativas na toxicidade celular quando comparados ao controle. Houve aumento de aproximadamente 5,5 vezes no percentual de mortalidade celular no grupo irradiado com 10 J/cm^2 . No grupo irradiado com 16 J/cm^2 o aumento da toxicidade foi cerca de 6 vezes e no grupo com 20 J/cm^2 o aumento da toxicidade foi de 8 vezes, quando comparado ao controle, conforme representado no gráfico da Figura 41B. As porcentagens de incorporação $\pm$ desvio padrão estão demonstrados na Tabela 11. Os histogramas representativos da viabilidade celular em HUVEC foram adquiridos pelo citômetro de fluxo e analisados pelos programas *Cell-Quest* e *WinMDI 2.8* dos grupos controle e irradiado com 20 J/cm^2 com 24 horas e 48 horas de cultura após irradiação com LIP e estão ilustrados na Figura 40.

Tabela 11: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de incorporação do PI em HUVEC 24 e 48 horas pós LIP

Intervalo pós LIP	Controle	10 J/cm^2	16 J/cm^2	20 J/cm^2
24 horas	$2,5 \pm 0,4$	$4,0 \pm 2,9$	$2,8 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,1$
48 horas	$5,5 \pm 0,9$	$30,2 \pm 2,6$	$33,4 \pm 1,5$	$43,5 \pm 7,8$

Figura 40: Histogramas representativos da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de HUVEC. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm² 24 h, em C - grupo controle 48 h e D - 20 J/cm² 48 horas, obtidos por citometria de fluxo

Figura 41: Gráficos de barras representativos das médias $\pm$ desvio padrão da viabilidade celular pelo método de difusão de iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de HUVEC mantidas em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP

ns – não significativo; * diferenças estatísticas (Teste de variância de ANOVA)

.5.2.2 Expressão do marcador Ki-67 em HUVEC após 24 e 48 horas de cultura analisados por citometria de fluxo

A aplicação da LIP em HUVEC mostrou aumento significativo na expressão do marcador Ki-67 em todas as intensidades de energia em relação ao grupo controle após 24 horas de cultura, enquanto que os experimentos realizados após 48 horas não evidenciaram aumento significativo na expressão deste anticorpo (Figura 43A e B). Os histogramas representativos estão demonstrados na Figura 42. As porcentagens de expressão $\pm$ desvio padrão do marcador Ki-67 estão representadas na Tabela 12.

Tabela 12: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de expressão do Ki-67 em HUVEC 24 e 48 horas pós LIP

Intervalo pós LIP	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
24 horas	65 $\pm$ 2,1	82,9 $\pm$ 6,6	83,3 $\pm$ 5,1	94,6 $\pm$ 1,6
48 horas	43,5 $\pm$ 3,6	46,2 $\pm$ 3,3	45,0 $\pm$ 0,4	53,1 $\pm$ 1,5

Figura 42: Histogramas representativos da proliferação celular pelo marcador Ki-67 de HUVEC. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm² 24 h, em C - grupo controle 48 h e D - 20 J/cm² 48 h.

Figura 43: Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão de Ki-67 em HUVEC mantidas em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP, obtidos por citometria de fluxo. ns – não significativo; * diferenças estatísticas (Teste de variância de ANOVA)

4.5.2.3 Expressão dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular e nas vias de morte celular em HUVEC após 24 e 48 horas de cultura

4.5.2.3.1 Caspase 3

A expressão da caspase 3 fosforilada em células endoteliais após 24 horas da irradiação com LIP mostrou não haver diferenças significativas entre as intensidades de energia utilizadas e o grupo controle. No entanto, após 48 horas, as diferenças significativas ocorreram nas intensidades de 16 J/cm² e 20 J/cm² quando comparados ao grupo controle. O aumento na expressão da caspase 3 com 16 J/cm² foi cerca de 7 vezes e com 20 J/cm² foi de aproximadamente 5 vezes em comparação ao grupo controle. Os dados estão apresentados nos histogramas da Figura 44 e no gráfico da Figura 45A e B. As porcentagens $\pm$ desvio padrão da expressão da caspase 3 fosforilada em HUVEC estão representadas na Tabela 13.

Tabela 13: Média $\pm$ desvio padrão das porcentagens de expressão de caspase 3 fosforilada em HUVEC 24 e 48 horas pós LIP

Intervalo pós LIP	Controle	10 J/cm ²	16 J/cm ²	20 J/cm ²
24 horas	7,2 $\pm$ 1,1	5,0 $\pm$ 1,4	11,5 $\pm$ 2,1	7,4 $\pm$ 0,8
48 horas	7,3 $\pm$ 1,6	3,0 $\pm$ 0,3	51,0 $\pm$ 1,8	33,8 $\pm$ 2,7

Figura 44: Histogramas representativos das expressões dos marcadores Ciclina D1 e Caspase 3 fosforilada de HUVEC. Em A - grupo controle 24 h; B - 20 J/cm² 24 h, em C - grupo controle 48 h e D - 20 J/cm² 48 horas

Figura 45: Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da expressão da caspase 3 fosforilada em HUVEC mantidas em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP, obtidos por citometria de fluxo. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.5.2.3.2 Ciclina D1

A expressão da Ciclina D1 em HUVEC após 24 horas da irradiação com LIP evidenciou aumento significativo na intensidade de energia de 10 J/cm^2 em comparação ao grupo controle. Porém, nas demais intensidades, o aumento da expressão do marcador não foi significativo. Os resultados dos experimentos realizados após 48 horas mostraram diminuição significativa na expressão da Ciclina D1 apenas na intensidade de energia de 20 J/cm^2 comparado ao grupo controle (Tabela 14). Os dados dos histogramas e gráficos das médias $\pm$ desvio padrão estão representados na Figura 44 e no gráfico da Figura 46A e B.

Tabela 14: Médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de expressão da ciclina D1 em HUVEC 24 e 48 horas pós LIP

Intervalo pós LIP	Controle	10 J/cm^2	16 J/cm^2	20 J/cm^2
24 horas	$67,7 \pm 0,8$	$88,4 \pm 0,9$	$76,0 \pm 6,4$	$64,4 \pm 4,6$
48 horas	$54,1 \pm 2,1$	$64,3 \pm 4,2$	$49,6 \pm 4,5$	$33,6 \pm 1,8$

Figura 46: Gráficos de barras representativos das médias $\pm$ desvio padrão da expressão da Ciclina D1 em HUVEC mantidas em cultura por 24 horas (A) e 48 horas (B) após irradiação com LIP
ns – não significativo; * diferenças estatísticas (Teste de variância de ANOVA)

4.6 Potencial elétrico e funcional da membrana mitocondrial

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 (Johnson et al., 1980). A Rh-123 é um componente catiônico que excita a 488 nm e emite fluorescência verde a 515-575 nm (Johnson et al., 1981). 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.

4.6.1 FN1

Os resultados obtidos em 24 e 48 horas após irradiação com LIP não evidenciaram diferenças significativas na atividade do potencial elétrico mitocondrial dos FN1 entre os grupos controle e os grupos irradiados com 10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm² (Figura 48A e B). A Figura 47 ilustra o histograma representativo do potencial elétrico mitocondrial do grupo controle obtido por citometria de fluxo dos FN1.

Figura 48: Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial de FN1 do grupo controle e dos grupos irradiados com LIP nas intensidades de 10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm² após 24 horas (A) e 48 horas (B) de cultura obtidos por citometria de fluxo. ns - não significativo (teste de variância de ANOVA)

Figura 47: Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial em FN1 obtido por citometria de fluxo, grupo controle 48 horas

4.6.2 HUVEC

Os resultados obtidos em 24 e 48 horas após irradiação com LIP não evidenciaram diferenças significativas na atividade do potencial elétrico mitocondrial das HUVEC entre os grupos controle e os grupos irradiados com 10 J/cm^2 , 16 J/cm^2 e 20 J/cm^2 como demonstrado no gráfico da Figura 50A e B. A Figura 49 ilustra o histograma representativo do potencial elétrico mitocondrial do grupo controle obtido por citometria de fluxo das HUVEC.

Figura 49: Histograma representativo do potencial elétrico mitocondrial em HUVEC controle 24 horas, obtidos por citometria de fluxo

Figura 50: Gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial de HUVEC do grupo controle e dos grupos irradiados com LIP nas intensidades de 10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm² após 24 horas (A) e 48 horas (B) de cultura obtidos por citometria de fluxo. ns- não significativo (teste de variância de ANOVA)

4.7 Análise da atividade mitocondrial por microscopia confocal nos fibroblastos humanos

A integridade mitocondrial dos FN1 dos grupos controle e irradiado foi avaliada pela técnica de microscopia confocal de fluorescência, em microscópio Nikon PCM 2000 (Nikon, Japão), pela incorporação e distribuição da sonda fluorescente Rodamina-123 nas mitocôndrias viáveis. Os fibroblastos dos grupos controle e irradiados mostraram estruturas citoplasmáticas marcadas e fluorescentes que apresentaram uma distribuição uniforme como mostra a análise tridimensional. Foi observado alto padrão de marcação fluorescente o que demonstra que a atividade respiratória mitocondrial mostrou-se íntegra e funcional, como indicado pela fluorescência verde brilhante uniformemente distribuída em seu interior. As fotomicrografias adquiridas no microscópio confocal ilustrando os grupos controle e irradiado com 20 J/cm^2 estão apresentadas na Figuras 51 e 52.

Figura 51: Fotomicrografia adquirida em microscopia confocal de FN1 do grupo controle. Notam-se células apresentando núcleo esférico centralmente localizado (seta tracejada) e mitocôndrias dispersas difusamente no citoplasma marcadas pela sonda fluorescente Rh-123 (seta contínua). Aumento 1000 X

Figura 52: Fotomicrografia adquirida em microscopia confocal de FN1 do grupo irradiado com 20 J/cm^2 . Notam-se células apresentando núcleo esférico único e centralmente localizado (seta tracejada) e mitocôndrias ativas dispersas difusamente e agregadas no citoplasma marcadas pela sonda fluorescente Rh-123 (seta contínua). Aumento 1000 X

4.8 Quantificação da produção de colágeno total pelos fibroblastos

4.8.1 Quantificação da biossíntese de colágeno pelo método colorimétrico de Picrosirius - Red em FN1 do grupo controle e dos grupos irradiados 24 e 48 horas após a irradiação com LIP

Os resultados da quantificação de colágeno tipo I produzidos nas culturas primárias de FN1 foram adquiridos na forma de densidade óptica (D.O.) e a quantidade total de colágeno foi calculada a partir das equações da reta obtida de concentrações conhecidas e padronizadas de colágeno tipo I humano da Sigma, apresentada na Figura 53: A: 0-300 µg/mL e B : 0- 160 µg/mL.

Figura 53: Curva padrão e equação da reta do colágeno tipo I humano obtido pelo método colorimétrico de Picrosirius – red nas concentrações de 0 – 300 µg/mL (A) e 0 – 160 µg/mL (B)

Após 24 horas foi possível observar alterações altamente significativas na indução da síntese de colágeno nos grupos controle e irradiados com LIP. Comparando o grupo de FN1 irradiados com a intensidade de energia de 10 J/cm^2 com o grupo controle houve aumento de aproximadamente 64% na biossíntese de colágeno ($212,5 \pm 71,2 \text{ µg/mL}$ no grupo controle e $347,0 \pm 50,1 \text{ µg/mL}$ com 10 J/cm^2). No grupo irradiado com a intensidade de energia de 16 J/cm^2 os valores aumentaram de $212,5 \pm 71,2 \text{ µg/mL}$ no grupo controle para $302,5 \pm 31,6 \text{ µg/mL}$. Na intensidade de 20 J/cm^2 o aumento na biossíntese de colágeno ocorreu em torno de 34% ($284,4 \pm 48,1 \text{ µg/mL}$) quando comparado ao grupo controle ($212,5 \pm 71,2 \text{ µg/mL}$) no intervalo de 24 horas de cultura após a irradiação com LIP (Figura 54).

Figura 54: Representação da concentração de colágeno total produzido pelos FN1 dos grupos controle e irradiado com LIP após 24 horas de cultura avaliada pelo método Picrosirius - Red

*Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

Após 48 horas de cultura, a biossíntese de colágeno pelos FN1 sofreu redução significativa nos grupos irradiados com as intensidades de 16 e 20 J/cm² quando comparados ao grupo controle. Na intensidade de 16 J/cm² houve diminuição de aproximadamente 25% em relação ao grupo controle ($47,4 \pm 12,1$ µg/mL no grupo controle e $35,2 \pm 10,6$ µg/mL com 16 J/cm²) e no grupo irradiado com 20 J/cm² a redução na biossíntese de colágeno em relação ao grupo controle foi de aproximadamente 38% ($47,4 \pm 12,1$ µg/mL no grupo controle e $28,9 \pm 11,8$ µg/mL com 20 J/cm²) como ilustrado no gráfico da Figura 55.

Figura 55: Representação da concentração de colágeno total produzido pelos FN1 dos grupos controle e irradiados com LIP após 48 horas de cultura. ns – não significativo; *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA)

4.9 Análise ultraestrutural de fibroblastos em microscopia eletrônica de varredura

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação, acima de 300.000 x de resolução. As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz. O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos mesmos atingirem a amostra analisada.

As imagens dos fibroblastos dos grupos controle e irradiado com LIP nas intensidades de 10 J/cm², 16 J/cm² e 20 J/cm² foram adquiridas em cultura em lamínulas após 48 horas de cultivo em microscópio eletrônico de varredura (Philips - Edax 20 KV). Os resultados das análises de imagens adquiridas em MEV mostraram aumento da capacidade de síntese de colágeno e elementos fibrilares da matriz extracelular. As Figuras 56 e 57 evidenciam a presença de fibrilas colágenas dispostas perpendicularmente à superfície dos FN1 do grupo controle. As Figuras 58, 59 e 62 demonstram as fibras colágenas apresentando aumento da sua espessura nos grupos

irradiados, se dispendo perpendicularmente à superfície dos FN1, e em algumas situações é possível observar o arranjo destas fibras de calibre mais espesso formando estruturas em forma de rede. Nas Figuras 60 e 61 observa-se detalhe da organização da matriz extracelular recém sintetizada após o estímulo da LIP. A Figura 62 evidencia estrutura arredondada representando fibroblasto com perda dos prolongamentos citoplasmáticos, adquirindo aspecto esférico, compatível com célula em processo de morte.

Figura 56: Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo controle, após 48 horas. Notam-se fibroblastos apresentando em sua superfície celular a presença de fibrilas colágenas dispostas perpendicularmente à sua superfície (seta)

Figura 57: Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo controle, após 48 horas. Notam-se fibroblastos apresentando fibrilas colágenas dispostas perpendicularmente à sua superfície (seta)

Figura 58: Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com LIP na intensidade de energia de 10 J/cm^2 , após 48 horas. Nota-se aumento da síntese e projeção de fibras colágenas mais espessas na superfície celular formando uma rede (seta)

Figura 59: Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com 16 J/cm², após 48 horas. Nota-se aumento da projeção e organização de fibras colágenas mais espessas (círculo)

Figura 60: Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com luz intensa pulsada na energia de 20 J/cm^2 , após 48 horas. Nota-se a organização da matriz extracelular produzida pelos fibroblastos

Figura 61: Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com 20 J/cm^2 . Notam-se detalhes da organização das fibras da matriz extracelular recém sintetizada por fibroblastos 48 horas após a aplicação da LIP

Figura 62: Fotomicrografia adquirida em microscopia eletrônica de varredura de FN1 do grupo irradiado com 20 J/cm^2 , 48 horas após a LIP. Pode-se observar estrutura arredondada representando fibroblasto com perda dos prolongamentos citoplasmáticos, adquirindo aspecto esférico, compatível com célula em processo de morte (seta)

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados os efeitos biológicos da irradiação com a luz intensa pulsada em culturas de FN1 e HUVEC, em diferentes intensidades de energia analisados nos períodos de 24 e 48 horas de cultura.

Tratamentos com luzes e lasers não ablativos vêm sendo utilizados por muitos anos para promover a melhora estética da pele fotodanificada, particularmente da região facial (Alster; Tanzi, 2002). Como o rejuvenescimento ablativo pode cursar com longos períodos de recuperação e eritema persistente pós tratamento, tecnologias não ablativas, sem interrupção da integridade epidérmica, e apenas mínimo eritema pós tratamento têm ganhado destaque (Prietto et al., 2005). Estes tratamentos são uma alternativa ao tradicional rejuvenescimento com os lasers de CO₂ (dióxido de carbono) e Erbium – YAG (*yttrium aluminium garnet*) que removem toda a epiderme e porção da derme. Os métodos de rejuvenescimento não ablativos têm se tornado atrativos aos médicos e pacientes porque reduzem os inconvenientes, como afastamento das atividades, e os riscos do laser ablativo, porém com resultados clínicos finais semelhantes (Alam et al., 2003).

Prietto et al. (2005) estudaram cinco pacientes com pele fotoenvelhecida com LIP utilizando o filtro de 560 nm, fluência de 28 a 35 J/cm² em quatro pacientes com o laser Nd:YAG (*Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet*) no comprimento de onda de 1.064 nm e fluência de 130 J/cm². Todos os pacientes foram submetidos a 5 aplicações de cada fonte de luz. Biópsias de pele foram realizadas no pré tratamento, 3 meses e 6 meses após o tratamento. Tanto na LIP quanto no Nd:YAG 1.064 nm, os resultados demonstraram melhora clínica e histológica com aumento na deposição de colágeno na

derme papilar e derme reticular superior, bem como aumento na espessura das fibras colágenas. Técnicas de imunohistoquímica demonstraram aumento na expressão de HSP 70 (*Heat Shock Proteins*) e procolágeno I por células dendríticas dérmicas. As diferenças entre os resultados da LIP e do laser Nd:YAG não foram estatisticamente significativas. Estes dados corroboraram os resultados de estudo prévio comparando a eficácia da LIP utilizando os filtros de corte de 590 e 750 nm como laser Nd:YAG 1.064 nm no tratamento de ríides faciais em 15 pacientes onde foi observada melhora clínica em todos os grupos, porém o grupo do laser Nd:YAG apresentou maior tolerância e menos efeitos colaterais. Neste trabalho os autores não realizaram avaliação histológica (Goldberg; Samady, 2001).

O principal mecanismo de ação das HSP é o de atuarem como "chaperonas" moleculares. Chaperonas são moléculas que, sem fazer parte da estrutura final de proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliam na montagem final das mesmas, bem como em sua síntese, dobramento e degradação. O dobramento de proteínas é um processo importante que converte cadeias lineares de polipeptídios em estruturas tridimensionais, as quais possibilitam que as proteínas exerçam todas as suas atividades vitais. As proteínas funcionais intracelulares estão normalmente presentes em suas formas nativas, completamente dobradas. Entretanto, processos vitais da biogênese protéica, tais como a sua síntese e transmigração para os compartimentos intracelulares, requerem que a proteína exista, temporariamente, em conformação desdobrada ou parcialmente dobrada e esta alteração na conformação protéica ocorre com o auxílio das chaperonas (Feige; Polla, 1994; Ellis, 1987; Ellis; Hartl, 1996).

Souil et al. (2001) avaliaram a expressão das HSP 70 após a aplicação de laser diodo 815 nm no dorso de ratos. Anteriormente à aplicação da irradiação, métodos de imunohistoquímica evidenciaram a expressão da proteína apenas na epiderme superior. Os autores observaram que, após a irradiação, ocorreu aumento da expressão das HSP 70 na derme, principalmente em torno dos vasos sanguíneos, folículos pilosos e glândulas sebáceas sugerindo a participação destas moléculas no processo de remodelamento e reparação tecidual.

Luo et al. (2009) avaliaram a ação da LIP com comprimentos de onda variando de 560 a 1200 nm e fluência 15 J/cm^2 em camundongos BALB/c e demonstraram, na derme, espessamento e aumento das fibras colágenas coradas com hematoxilina eosina bem como uma melhor distribuição destas fibras paralelamente à epiderme duas semanas após a irradiação. Os resultados mostraram-se mais evidentes 8 semanas após a irradiação com LIP, demonstrando um efeito tempo dependente. Os autores também evidenciaram ausência de alterações epidérmicas durante as 8 semanas de avaliação. A marcação por imunohistoquímica evidenciou acentuação na marcação de proteínas de colágeno tipo I e tipo III, mais distribuídas na derme papilar superior e em torno dos apêndices como folículos pilosos e glândulas sebáceas. Além disso, após a irradiação, houve diminuição na expressão de mRNA das metaloproteinases (MMP -1 e 2) proporcional ao tempo de avaliação. Os autores observaram que não houve aumento na expressão de mRNA do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) ao final do experimento. O VEGF é o único fator de crescimento que apresenta efeito específico na angiogênese. Quando lesionados por algum estímulo, células do endotélio vascular, ceratinócitos e fibroblastos, entre outras, podem secretar mais VEGF para atuar no

processo de inflamação, reparação tecidual e carcinogênese. Wong et al. (2008) demonstraram, pelos métodos de Western Blot e RT – PCR, diminuição da expressão do mRNA e dos níveis protéicos da MMP-2 em culturas tridimensionais de fibroblastos dérmicos humanos, com efeito dose dependente, 24 e 72 horas após irradiação com LIP com o filtro de 570 nm e fluências de 20, 50 e 75 J/cm².

As MMP-1 e MMP-2 são as principais proteases dérmicas envolvidas no processo de degradação da MEC incluindo colágeno, elastina, proteoglicanos e fibronectina. As MMP-1 e 2 apresentam papel importante no envelhecimento cutâneo, tanto intrínseco quanto extrínseco. O aumento da expressão das MMP 1 (colagenase 1) e MMP 2 (gelatinase A), está implicado na lise das fibras elásticas e colágenas da derme durante o processo de envelhecimento (Ohnishi et al., 2002). A radiação UV pode induzir o aumento da expressão das MMPs originadas dos ceratinócitos e fibroblastos participando do processo de envelhecimento cutâneo pela degradação dos componentes da MEC (Luo et al., 2009).

Outros estudos também demonstraram a ação da LIP no estímulo do colágeno e melhora da sua distribuição em relação à epiderme tanto em modelos animais quanto em humanos. Goldberg (2000) irradiou 5 pacientes com LIP e demonstrou remodelamento do colágeno e formação de novas fibras associadas à melhora clínica 6 meses após o tratamento. Iyer et al. (2007) aplicaram LIP na pele de porcos com filtro de 590 nm e fluências de 30 e 40 J/cm² e realizaram biópsias nos intervalos de 1, 7, 14, 21 e 42 dias após a irradiação. Os resultados evidenciaram aumento nos níveis de procolágeno tipo I nos dias 21 e 42, mas não antes deste intervalo. Os autores não observaram diferenças na quantidade de procolágeno entre as fluências de 30 e 40 J/cm².

Estudo recente realizado por De Sica (2009) avaliou em 25 pacientes a resposta a irradiação com o mesmo aparelho de LIP utilizado no presente estudo. As pacientes foram submetidas a 5 tratamentos mensais com LIP (fluência de 20 J/cm^2) e biópsias de pele foram realizadas pré e após 6 meses da irradiação com LIP, e em 8 pacientes a biópsia foi realizada após 12 meses. Neste estudo as fibras colágenas foram evidenciadas pela coloração de picosirius e quantificadas por sistema analisador de imagens Kontron-Zeiss 300. Foi evidenciado aumento de cerca de 51% na fração de área de colágeno e melhor distribuição destas fibras dentro da derme paralelamente a epiderme após 6 meses e cerca de 30% após 12 meses.

Estes dados são semelhantes aos resultados obtidos no presente estudo pelo método colorimétrico de picosirius - red para avaliação da síntese de colágeno produzido pelos fibroblastos humanos após irradiação com LIP que mostraram intenso estímulo na síntese de colágeno nas primeiras 24 horas, sendo mais significativo nas intensidades de 10 e 16 J/cm^2 do que na intensidade de 20 J/cm^2 . A microscopia eletrônica de varredura evidenciou as projeções de colágeno recém sintetizado na superfície dos fibroblastos, bem como a organização da MEC (Figuras 28 a 34). Entretanto, diferentemente dos estudos anteriores *in vivo*, em que o estímulo na síntese de colágeno era observado nas avaliações subsequentes, após 48 horas observou-se diminuição na quantidade de colágeno sintetizada. Esta diminuição na quantidade de colágeno após 48 horas pode ser explicada pelo intenso estímulo proliferativo causado pela LIP nas primeiras 24 horas e, pelo fato de os fibroblastos estarem em meio de cultura na forma de monocamada, após 48 horas de cultura, algumas células podem ter

entrado em um processo de morte programada que controla a cinética de crescimento e diferenciação celular.

Segundo Jaffe et al. (1973) as culturas de fibroblastos humanos apresentam células longas, delgadas e fusiformes, distribuídas paralelamente, e às vezes distribuídas em camadas sobrepostas. As células FN1 apresentadas neste trabalho apresentaram-se como uma cultura de células homogêneas, aderentes, fusiformes, com núcleo pequeno e central e poucos nucléolos evidentes (Figura 11). Após a irradiação com LIP os FN1 mostraram efeitos visíveis ao microscópio. As culturas apresentavam células fusiformes, com núcleo único e central sem a presença de vacuolizações ou perda de adesão em 24 horas (Figura 12A) e em 48 horas observa-se aumento significativo da densidade celular, presença de grupos de células arredondadas, cromatina condensada e nucléolos evidentes, podendo ser compatíveis com células em processo de morte celular (Figura 12B).

A avaliação da capacidade proliferativa realizada pelo método colorimétrico MTT nos FN1 após 24 horas de cultura evidenciou aumento significativo em todos os grupos irradiados, sendo que a diferença foi maior no grupo irradiado com 20 J/cm^2 onde foi possível observar aumento de cerca de 35% na capacidade proliferativa. Porém, após 48 horas de cultura, houve uma parada neste estímulo proliferativo com significância estatística apenas no grupo irradiado com 20 J/cm^2 que evidenciou aumento de aproximadamente 28% na resposta proliferativa. Estes dados evidenciam o aumento da capacidade proliferativa dos FN1 irradiados com LIP em todas as intensidades de energia, porém este aumento da proliferação não se manteve nos períodos comparativos entre 24 e 48 horas. Estes resultados são concordantes com os descritos por Vinck et al.

em 2003 onde foi analisada a proliferação celular dos fibroblastos originados de embriões de galinha, porém, ao invés de LIP estas células foram irradiadas com laser de baixa intensidade – LLL (*Low Level Laser*) com comprimento de onda de 830 nm e fluência de 1 J/cm^2 e Diodo Emissor de Luz – LED (*Light Emitting Diode*) que consiste de 3 diferentes tipos de comprimentos de ondas em diferentes sondas; a luz verde com comprimento de onda de 570 nm e fluência de $0,1 \text{ J/cm}^2$, a luz vermelha com 660 nm e fluência de $0,53 \text{ J/cm}^2$ e a terceira sonda com comprimento de onda de 950 nm e fluência de $0,53 \text{ J/cm}^2$ representada pela luz infravermelha. As culturas celulares foram submetidas a 3 aplicações dos diferentes tipos de luz em 3 dias consecutivos. O método de redução do MTT avaliado por Vinck et al. (2003) evidenciou aumento da capacidade proliferativa em todos os grupos irradiados no período de 24 horas, porém os fibroblastos analisados 72 horas após a irradiação apresentaram diminuição da capacidade proliferativa em todos os grupos. Estes dados são semelhantes aos encontrados no presente estudo onde houve aumento da resposta proliferativa nas primeiras 24 horas, e uma tendência à diminuição da resposta proliferativa após 48 horas. Uma possível explicação para a diminuição no estímulo proliferativo em 48 horas seria a confluência das células quando mantidas em cultura. As células que apresentam crescimento em monocamada quando confluentes apresentam uma tendência em inibir o seu crescimento e finalmente morrer, se não subcultivadas em tempo. Isto justificaria a diminuição na capacidade proliferativa após 72 horas obtida no estudo de Vinck et al. (2003).

Wong et al. em 2009 irradiaram culturas celulares de fibroblastos dérmicos humanos com triplo pulso de LIP com filtro 570 nm e fluências de 20, 50 e 75 J/cm^2 .

Após o período de 24 horas realizaram avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão azul de Tripan. Os resultados demonstraram aumento significativo dependente da dose na viabilidade celular dos fibroblastos em 24 horas após irradiação com LIP. Os números de fibroblastos viáveis tratados com 20, 50 e 75 J/cm² aumentaram em 107%, 115% e 127%, respectivamente. Estes autores não avaliaram os efeitos na viabilidade celular após 48 horas de cultura. Não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando capacidade proliferativa de FN1 pelo MTT após irradiação com LIP.

Além do fotorejuvenescimento, a luz intensa pulsada também é amplamente utilizada na prática clínica para o tratamento de malformações vasculares. O seu mecanismo de ação é baseado na absorção seletiva da LIP pela hemoglobina contida dentro dos vasos sanguíneos que apresenta um pico máximo de absorção em torno de 540 e 580 nm. Há relatos na literatura confirmando a eficácia da LIP em telangiectasias faciais, mancha vinho do porto, nevos rubis, aranhas vasculares e rosácea (Adamic et al., 2007; Babilas et al., 2010). Os variados comprimentos de onda presentes na LIP permitem a sua aplicação em lesões vasculares de diferentes profundidades na pele e o resfriamento da ponteira, presente em alguns aparelhos, permite a proteção epidérmica atuando mais seletivamente nos vasos sanguíneos. As telangiectasias da face são as lesões vasculares mais amplamente tratadas com a LIP na prática clínica (Railan et al., 2006).

As culturas de HUVEC utilizadas neste trabalho apresentam-se como células arredondadas aderentes, uninucleadas que dispostas em monocamada. A irradiação com LIP não desencadeou alterações morfológicas visíveis neste grupo celular em 24 e 48 horas de cultura (Figuras 13 e 14). Jaffe et al. (1973) demonstraram em microscopia

eletrônica que as células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano quando cultivadas apresentavam características morfológicas como crescimento homogêneo em monocamada de grandes células poligonais, com núcleo central e bordas celulares indistinguíveis, contendo inclusões citoplasmáticas com formato de cilindro, típicas de células endoteliais *in situ* denominadas corpos de Weibel-Palade e abundantes filamentos de actomiosina tipo músculo liso. Além destas características morfológicas, estes autores demonstraram que as HUVEC apresentavam características imunológicas como a marcação de antígenos do sistema ABO usado na identificação do tipo sanguíneo de doadores de sangue e tecidos, justificando a semelhança destas células com as células endoteliais humanas.

A avaliação das HUVEC pelo método colorimétrico MTT não evidenciou alterações na capacidade proliferativa em 24 e 48 horas após a irradiação com LIP, ou seja, este grupo celular mostrou-se indiferente ao estímulo proliferativo avaliado por este método. Os dados encontrados na literatura referem-se à aplicação do laser de baixa intensidade (laser diodo 670 nm; potência: 10-65 mW) sobre HUVEC e demonstraram, pelo teste do azul de Tripan, um estímulo proliferativo dose dependente desta fonte de luz sobre estas células (Schindl et al., 2003). Porém os autores utilizaram fonte de luz e método de avaliação de viabilidade celular diferente do empregado no presente estudo. Não foram encontrados estudos que avaliassem a capacidade proliferativa das HUVEC pelo método MTT após a irradiação com LIP.

Entre as transformações enzimáticas e químicas que compõem o metabolismo normal dos organismos vivos, encontram-se a formação dos radicais livres e os mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que combatem estas espécies altamente

reativas. A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis à oxidação (Halliwell; Gutteridge, 1989). Para se protegerem contra oxidações os organismos dispõem de mecanismos químicos e enzimáticos. Os mecanismos químicos utilizam várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como alfa-tocoferol, beta-caroteno, selênio, ácido ascórbico e glutathione reduzida para diminuir a ação tóxica dos radicais livres produzidos intra e extracelularmente. Os mecanismos enzimáticos utilizam proteínas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase para decomporem o ânion O_2^- , H_2O_2 e lipoperóxidos, respectivamente (Yu, 1994).

Sob condições normais, aproximadamente 1% das espécies reativas de oxigênio escapam diariamente do controle das defesas dos antioxidantes endógenos e contribuem para o dano oxidativo dos tecidos adjacentes, conseqüentemente influenciando no processo de envelhecimento. Espécies reativas de oxigênio podem atacar qualquer componente bioquímico da célula. Se a capacidade da célula de neutralizar as espécies reativas de oxigênio for alterada, poderá ocorrer dano agudo a proteínas vitais, lipídeos e DNA. Em humanos, o desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes endógenos tem sido envolvido na geração ou piora de mais de uma centena de condições patológicas (Fusco et al., 2007).

A produção de radicais livres determinada neste estudo foi avaliada pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico resultantes da lipoperoxidação das membranas celulares nos sobrenadantes de culturas de FN1 e HUVEC. Nos experimentos realizados no período de 24 horas os fibroblastos irradiados

com LIP não evidenciaram aumento significativo na produção dos peróxidos lipídicos insaturados, porém após 48 horas o aumento foi significativo e diretamente proporcional à intensidade de energia utilizada. O grupo irradiado com 20 J/cm^2 apresentou aumento de aproximadamente 3 vezes nos níveis de radicais livres. Estes dados podem ser justificados pelo estímulo proliferativo induzido pela LIP nos fibroblastos humanos, como demonstrado nos ensaios de proliferação celular pelo método MTT, com conseqüente geração de radicais livres após 48 horas de cultura. Nas HUVEC a ação da LIP causou aumento da geração de radicais livres já nas primeiras 24 horas após a irradiação com aumento significativo na produção de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico em todas as energias aplicadas, diretamente proporcional à intensidade de energia utilizada. Após 48 horas de cultura os grupos irradiados ainda apresentaram aumento na produção de radicais livres, porém, observa-se diminuição importante em todos os grupos estudados quando comparados aos grupos de 24 horas. Estes dados podem ser justificados pelo pico de produção de peróxidos lipídicos em 24 horas, com esgotamento da produção após 48 horas, neste tipo celular específico.

Estudo *in vivo* realizado em humanos onde foi comparada a ação da radiação ultravioleta A (UV-A) e da LIP na indução da formação de peróxidos lipídicos, demonstrou que a LIP aumentou em 6 vezes e a radiação UV-A aumentou em 3 vezes a produção de peróxidos lipídicos pela pele. A fluência da LIP utilizada neste estudo foi de 9 J/cm^2 e o comprimento de onda variando de 520 a 750 nm. A biópsia de pele foi realizada apenas 15 minutos após a irradiação não tendo sido realizadas avaliações em tempos posteriores (Sorg et al., 2007). Estes dados corroboram os obtidos no presente estudo onde é possível detectar a intensa liberação de peróxidos lipídicos tanto nos FN1

quanto nas HUVEC indicando importante stress oxidativo provocado pela LIP quando utilizadas energias mais elevadas. Applegate et al. (2000) demonstraram que a luz infravermelha (700 - 4000 nm) não induziu dano ao DNA ou o aumento de proteínas de stress oxidativo como heme oxigenase, óxido nítrico e superóxido dismutase em fibroblastos humanos *in vitro*, avaliados por ELISA. Este dado indica que o pequeno componente infravermelho do aparelho de LIP utilizado no presente trabalho (700 – 1110 nm) pode não ter sido o responsável pela indução do stress oxidativo, podendo atribuir este estímulo, semelhante ao observado por Sorg et al. (2007), ao componente de luz visível (420-700 nm) emitido em alta intensidade pelo feixe de luz irradiado pela LIP. Estes dados abrem uma nova janela para o estudo dos efeitos adversos da LIP, que até o presente momento eram conhecidos apenas como eritema, edema e dor. O presente estudo demonstrou que o aumento na geração de radicais livres após doses mais altas de LIP pode ser considerado um efeito adverso, visto que, em altas concentrações, os radicais livres podem ser lesivos aos tecidos e células. As doses menores e intermediárias levaram à menor produção de radicais livres tanto nos FN1 quanto nas HUVEC. Na prática clínica, além de edema e dor, efeitos adversos como bolhas, crostas e cicatrizes inestéticas também podem ser atribuídos à doses exageradas de LIP. Porém, quando o objetivo é o tratamento das lesões vasculares, doses maiores de LIP podem ser necessárias para levar à lesão do endotélio vascular e consequentemente o desaparecimento do vaso sanguíneo.

O crescimento celular pode ser considerado como fases sucessivas denominadas “ciclo celular” que são caracterizadas por processos bioquímicos específicos (Baserga, 1984). O ciclo celular é um processo complexo e organizado que garante que ocorra uma

replicação completa e eficaz do conteúdo celular antes da divisão. Há três principais proteínas que regulam o ciclo celular: as CDKs (quinasas dependentes de ciclina), as ciclinas e os inibidores das CDKs (CKIs). As CDKs, uma vez ativadas, fosforilam outras proteínas permitindo a sua participação em fases específicas do ciclo celular. As CDKs são reguladas pelas ciclinas e as CKIs controlam a ativação do complexo ciclina- CDKs, inibindo a sua formação (Gillert; Barnes, 1998). As ciclinas são proteínas que ocorrem ciclicamente sendo ativadas e degradadas durante o ciclo celular. As ciclinas podem ser classificadas em pelo menos dois tipos: as mitóticas, que em conjunto com as CDKs formam o fator promotor de maturação (MPF), e as ciclinas G1 (ciclina D e E), necessárias para a entrada da célula na fase S (Hall; Coates, 1995; Gillert; Barnes, 1998).

As ciclinas são importantes mediadores da atividade das CDKs e seus níveis são variáveis durante o ciclo celular. O nível de ciclina é regulado pela expressão gênica e degradação protéica. Atualmente existem 14 tipos de ciclinas: ciclina A – J; e algumas ciclinas são subdivididas em três tipos; por exemplo, a ciclina D em ciclina D1, D2 e D3 presentes em diferentes fases do ciclo celular, ativando suas kinases específicas que, através da fosforilação, são então capazes de induzir a continuidade do ciclo celular (Chellapan et al., 1998; Gillett; Barnes, 1998). A ciclina D1 é uma das proteínas envolvidas na transição celular da fase do ciclo de G1 (repouso), para a fase S (síntese) tanto em células normais como em células neoplásicas.

O ciclo celular pode ser dividido em 4 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 re-estimuladas. A fase mitótica é diferenciada das demais fases do ciclo, que são em conjunto denominadas interfase (Jayat; Ratinaud, 1993; Gillert; Barnes, 1998).

A análise das fases do ciclo celular exige a identificação de células e ou populações de células que se distribuem morfológicamente 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. (1983) 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.

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 (Porter et al., 1996). Desta forma, dados “discretos” representando subpopulações diferentes podem fornecer uma imagem mais detalhada e real da complexidade e heterogeneidade que ocorre num determinado bioprocessos (Porter et al., 1996; Rieseberg et al., 2001). Por estes motivos, esta técnica tem tido cada vez mais impacto na comunidade científica.

Nos FN1 a aplicação da LIP não induziu aumento de células com DNA fragmentado em 24 e 48 horas (Figura 24). Os FN1 apresentaram estímulo proliferativo

após 24 horas de irradiação com LIP em 24 horas observado pelo aumento do percentual das células nas fases G0/G1 e S neste período, corroborando a demonstração do estímulo proliferativo evidenciado no método colorimétrico MTT. Porém em 48 horas este aumento não se manteve (Figuras 25 e 26), o que pode ser explicado pela cinética de resposta da proliferação ocorrida em 24 horas e o estado funcional destas células após 48 horas, ou então a liberação de fatores pró-inflamatórios ou fatores de crescimento em resposta à irradiação aplicada. O estímulo proliferativo da LIP também foi evidenciado pelo aumento da expressão do marcador ciclina D1 que indica o aumento na transição das células da fase G1 para a fase S nas primeiras 24 horas, porém, diferente das fases do ciclo celular, após 48 horas a expressão da ciclina D1 se manteve ascendente (Figura 39A e B).

Nas HUVEC a LIP induziu importante aumento na porcentagem de DNA fragmentado diretamente proporcional à intensidade de energia em 24 horas, demonstrando um efeito citotóxico da LIP nestas células (Figura 29). Além disto, pode-se perceber um aumento na porcentagem de HUVEC em fase de quiescência (fase G0/G1) e diminuição média de 45% na fase de síntese em todas as intensidades de energia utilizadas no intervalo de 24 horas após a irradiação com LIP. Entretanto, após 48 horas não foram observadas alterações nas distribuições das HUVEC nas diferentes fases do ciclo celular (Figuras 30 e 31). Além disso, o marcador de proliferação celular ciclina D1 sofreu diminuição na sua expressão nos intervalos de 24 e 48 horas após a LIP (Figura 46A e B). Estes dados podem ser justificados pela toxicidade da LIP sobre este tipo celular já nas primeiras 24 horas de irradiação. Não foram encontrados na

literatura trabalhos que avaliassem as diferentes fases do ciclo celular após aplicação de LIP tanto em fibroblastos quanto em células endoteliais.

A análise da capacidade proliferativa também foi realizada pela expressão do marcador Ki - 67 por citometria de fluxo nos FN1 e nas HUVEC submetidos à LIP. Em 1983, Gerdes et al. descreveram em ratos um anticorpo monoclonal denominado Ki - 67, que estava presente em células em proliferação mas ausente em células em repouso. Segundo estes autores quando células em repouso eram transformadas em células proliferativas, como por exemplo, linfócitos estimulados pela fitohemaglutinina A, o antígeno reconhecido pelo Ki - 67 era evidenciado no núcleo destas células em proliferação. Por outro lado, este antígeno desaparecia quando células em proliferação eram induzidas a se diferenciarem em células em repouso ou quiescentes, como exemplo, quando células HL- 60 eram tratadas com ésteres de forbol. O antígeno nuclear Ki - 67 reconhecido por anticorpos monoclonais específicos é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 e representa um marcador cuja expressão é indicativa de células em proliferação (Gerdes et al., 1984). O marcador Ki- 67 apresenta uma vida média de menos de uma hora (Bruno; Darzynkiewikz, 1992), e sua expressão antigênica aumenta com a progressão do ciclo celular, alcançando um pico nas fases G2 e M (Sasaki et al., 1987).

Nos FN1 a marcação do antígeno Ki - 67 foi diferentemente expressa nos intervalos de 24 e 48 horas após irradiação com LIP. Em 24 horas houve diminuição gradativa, na expressão do marcador, e em 48 horas, houve aumento na intensidade de 20 J/cm² (Figura 36). Estes dados são divergentes do observado quando foi analisado o estímulo proliferativo pela avaliação das fases do ciclo celular e pelo método

colorimétrico MTT que demonstraram o aumento da proliferação das FN1 em 24 horas após a irradiação com LIP e a diminuição do estímulo após 48 horas. Assim como nas células FN1, as HUVEC também expressaram diferentemente o estímulo proliferativo quando comparados com o estudo das fases do ciclo celular e do método colorimétrico MTT. Neste tipo celular o marcador Ki- 67 evidenciou aumento na sua expressão em 24 horas após a LIP e ausência de alterações em 48 horas de irradiação (Figura 43). Sorg et al. (2007) avaliaram 9 pacientes com uma única sessão de LIP na fluência de 9 J/cm^2 , comprimento de onda variando de 520 a 750 nm e realizaram biópsia 2 horas após a irradiação. A análise imunohistoquímica com o marcador Ki - 67 não evidenciou alterações na proliferação celular neste experimento. Orringer et al. (2008) utilizaram terapia fotodinâmica com aplicação de 5- ALA (ácido aminolevulínico) por 3 horas seguido da irradiação com *Pulsed Dye Laser* (PDL), comprimento de onda de 595 nm e fluência de $7,5 \text{ J/cm}^2$, em 25 pacientes. Foram realizadas 4 a 5 biópsias de pele em um intervalo de 6 meses. Foi demonstrado aumento do marcador Ki - 67 nos queratinócitos cerca de 5 vezes no segundo dia após a irradiação e este aumento foi mantido no sétimo dia. Não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem os efeitos *in vitro* da LIP sobre a expressão do marcador Ki - 67 nos FN1 e nas HUVEC.

A avaliação da toxicidade induzida pela LIP pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular, obtida por citometria de fluxo foi realizada nos FN1 e nas HUVEC. O PI é um marcador que é excluído de células saudáveis, sendo capaz de penetrar em membranas não íntegras e se ligar a ácidos nucleicos, tornando-se assim fluorescente e podendo ser observado nos compartimentos celulares (Macklis; Madison, 1990). O PI é um agente que, ao ser intercalado à molécula de DNA, emite uma

fluorescência amarela e/ou vermelha. A exclusão do PI é assim um método eficiente para detecção da integridade da membrana celular (Silva et al., 2001). Nos FN1 não houve toxicidade no período de 24 horas, porém, após 48 horas de cultura ocorreu aumento da mortalidade deste tipo celular diretamente proporcional à intensidade de energia utilizada (Figura 34). O grupo irradiado com 20 J/cm^2 apresentou um aumento de aproximadamente 7 vezes e o grupo tratado com 10 J/cm^2 apresentou um aumento de cerca de 3 vezes em relação ao grupo controle. Estes dados demonstram um efeito tóxico da LIP sobre os FN1 diretamente proporcional à intensidade de energia utilizada.

Resposta semelhante ao que ocorreu com os FN1 foi observada com as HUVEC na avaliação da toxicidade celular pelo método de difusão do PI. Em 24 horas não houve alteração significativa na toxicidade deste grupo celular, porém após 48 horas houve aumento na toxicidade diretamente proporcional à intensidade de energia utilizada (Figura 41). No grupo irradiado com 20 J/cm^2 houve aumento de cerca de 8 vezes na toxicidade em relação ao controle. Assim como nos FN1, as HUVEC apresentaram aumento da toxicidade celular quando foram irradiadas com doses mais altas de LIP.

A morte celular é um processo fisiológico necessário para remover células indesejadas ou danificadas. Existem duas formas de morte celular com características bioquímicas e morfológicas distintas; a apoptose e a morte celular por necrose. A apoptose é um processo ativo de morte celular e pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido; ocorre uma retração da célula levando à uma perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar

ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório significativo (Ziegler; Groscurth, 2004). Já a necrose é uma forma passiva de morte celular associada com inflamação resultante de um inchaço das organelas, ruptura da membrana celular e derramamento do conteúdo celular no meio extracelular, induzindo resposta inflamatória (Orrenius et al., 2004). Várias evidências demonstram que a mitocôndria é a principal organela envolvida nos sinais de transdução e execução do processo de morte celular (Pradelli et al., 2010).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (Hengartner, 2000). A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pela união de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (Budihardjo et al., 1999). As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear,

externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (Boatright; Salvesen, 2003). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (Hengartner, 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo à permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró apoptóticas nela presentes (Desagher; Martinou, 2000).

Analisando os dados da expressão da caspase 3 fosforilada, importante marcador de morte celular por apoptose, foi possível observar o aumento da morte celular por apoptose em 48 horas tanto nos FN1 quanto nas HUVEC (Figuras 38 e 45). Para determinar se a apoptose induzida pela LIP ocorreu pela via mitocondrial ou citoplasmática, foi realizada a avaliação da integridade do potencial elétrico da membrana mitocondrial que permite a mensuração da viabilidade da atividade metabólica da mitocôndria.

O potencial de membrana ($\Delta\psi$) é o parâmetro de viabilidade da atividade metabólica mais utilizado em citometria de fluxo. É gerado pela diferença de concentrações de íons no interior e no exterior da membrana citoplasmática e, como componente do gradiente eletroquímico, está intimamente relacionado com a formação de ATP na célula (Shapiro, 2000). A despolarização da membrana ocorre quando o valor de $\Delta\psi$ se desloca para valores menos negativos, portanto, mais próximos de zero e, a hiperpolarização ocorre quando a alteração dos valores de $\Delta\psi$ se dá na direção oposta,

ou seja, para valores mais negativos. O valor de $\Delta\psi$ é nulo quando a membrana apresenta danos estruturais tais que permite a livre passagem de íons, o que pode suceder quando a célula sofre, por exemplo, um tratamento térmico, ou um tratamento com antibióticos da família dos beta lactâmicos, entre outros. O potencial de membrana pode ser medido diretamente através de microeletrodos, mas esta técnica torna-se tanto mais difícil de aplicar quanto menor for o tamanho da célula. A medida do $\Delta\psi$ por citometria de fluxo é normalmente realizada utilizando sondas lipofílicas de distribuição/partição. Estas sondas, devido à sua natureza lipofílica, conseguem atravessar facilmente a membrana e ali acumulam de acordo com a sua carga (Silva et al., 2001).

A avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial analisados por citometria de fluxo com a sonda fluorescente rodamina 123 (Rh-123) permitiu o estudo do acúmulo seletivo deste fluorocromo pelas células viáveis. A Rh- 123 é um corante indicado para a avaliação do potencial da membrana mitocondrial. Apresenta-se com um componente lipofílico fluorescente carregado positivamente e numerosos estudos têm confirmado que o potencial elétrico da membrana mitocondrial é a força motriz para a absorção da Rh- 123. Portanto, a integridade do potencial elétrico da membrana mitocondrial é avaliada pela difusão da Rh- 123 por esta membrana, visto que alterações na membrana mitocondrial não permitem o influxo deste fluorocromo através da mesma.

Tanto os FN1 quanto as HUVEC demonstraram um potencial elétrico ativo da mitocôndria independente da energia aplicada e do tempo analisado. Portanto, a apoptose, evidenciada pela expressão da caspase 3 fosforilada, induzida pela LIP não ocorreu pela via intrínseca ou mitocondrial. Com a constatação da integridade do potencial elétrico da membrana mitocondrial, provavelmente a apoptose ocorreu pela via

extrínseca ou citoplasmática com a liberação de fatores pró inflamatórios como interleucina 1 beta e IL-8 ou TNF modulados pela expressão dos rTNF (rTNFR-1, Fas/CD95, TRAIL) produzidos por estas células.

As análises obtidas por microscopia confocal nos FN1 demonstraram a atividade funcional e de fosforilação das membranas mitocondriais pela observação da distribuição do corante Rh- 123 no interior das mitocôndrias distribuídas no citoplasma (Figuras 51 e 52). Estes dados corroboram os resultados do potencial elétrico da membrana mitocondrial obtidos por citometria de fluxo, onde foi constatada a integridade da membrana mitocondrial após a irradiação com LIP em todas as intensidades de energia e no grupo controle.

Correlacionando os resultados obtidos nos experimentos realizados *in vitro* no presente estudo com a aplicação da LIP na prática clínica para o tratamento do fotoenvelhecimento, onde é desejável o estímulo proliferativo e aumento da síntese de fibras colágenas pelos fibroblastos, a LIP promoveu mais estímulo proliferativo e maior estímulo na síntese de colágeno após a aplicação de doses intermediárias (10 e 16 J/cm²), e energias mais elevadas (20 J/cm²) promoveram mais efeitos indesejados como maior geração de radicais livres e mais indução de morte celular.

Uma vez que o tratamento das lesões vasculares necessita de doses de LIP suficientes para a destruição dos vasos sanguíneos, os resultados deste estudo demonstraram que as doses maiores de LIP apresentaram os efeitos de indução de morte celular, toxicidade e efeito antiproliferativo nas HUVEC, o que justificaria o emprego de doses elevadas de LIP para o tratamento das lesões vasculares *in vivo*.

Embora diversos estudos tenham demonstrado o efeito de foto rejuvenescimento e tratamento de lesões vasculares com a LIP, os mecanismos moleculares relacionados a estes efeitos permanecem não muito claros. Os dados apresentados neste estudo representam parte da explicação dos mecanismos biológicos e moleculares induzidos pela LIP que justificam as respostas clínicas observadas na prática.

6 CONCLUSÕES

A irradiação dos diferentes tipos celulares em culturas com LIP nas intensidades de energia de 10, 16 e 20 J/cm² permitiram as seguintes conclusões:

Em fibroblastos humanos normais:

- Nas intensidades de energia de 10 e 16 J/cm² ocorreu maior estímulo proliferativo, com menor toxicidade, maior indução na síntese de colágeno, menor indução de apoptose e menor geração de radicais livres quando comparadas à intensidade de 20 J/cm². Estruturalmente a LIP induziu síntese e reorganização da matriz extracelular em todas as intensidades de energia.

Em células endoteliais humanas:

- Os efeitos induzidos pela LIP foram diretamente proporcionais à intensidade de energia utilizada. Quanto maior a energia aplicada, maior foi a inibição da proliferação celular e maior a toxicidade, a indução de apoptose e a geração de radicais livres.

7 REFERÊNCIAS

Adamic M, Troilius A, Adatto M, Drosner M, Dahmane R. Vascular lasers and IPLS: guidelines for care from the European Society for Laser Dermatology (ESLD). *J Cosmetic Laser Ther.* 2007;9:113-24.

Alam M, Hsu T, Dover JS, Wrone DA, Arndt KA. Nonablative laser and light treatments: Histology and tissue effects – a review. *Lasers Surg Med.* v.33 p.30-39 2003.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The extracellular matrix of animals. In: Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science; 2010.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. In: Fibroblasts and their transformations: the connective - tissue cell family. Molecular biology of the cell. 5 ed. New York: Garland Science; 2010.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The cell cycle and programmed cell death. In: Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science; 2010.

Almqvist S, Werthén M, Johansson A, Törnqvist T, Ågren MS, Thomsen P. Evaluation of a near-senescent human dermal fibroblast cell line and effect of amelogenin. *Br J Dermatol.* 2009;160(6):1163-1171.

Alster TS, Tanzi EL. Treatment of transverse neck lines with a nonablative 1450 nm diode laser. *Lasers Surg Med.* 2002;Suppl 14:33.

Anderson RR, Parrish RR. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science.* 1983;220:524-7.

Applegate LA, Scaletta C, Panizzon R, Frenk E, Hohlfield P, Schwarzkopf S. Induction of the putative protective protein ferritin by infrared radiation: implications in skin repair. *Int J Mol Med.* 2000;5:247-51.

Ash C, Town G, Clement M. Confirmation of spectral jitter: a measured shift in the spectral distribution of intense pulsed light systems using a time- resolved spectrometer during exposure and increased fluence. *J Med Eng Technol.* 2010;34(2):97-107.

Babilas P, Schreml S, Szeimies R-M, Landthaler M. Intense pulsed light (IPL): a review. *Lasers Surg Med.* 2010;42:93-104.

Baserga R. Recombinant DNA approaches to studying control proliferation: an overview. In: Stein GS, Stein JL, editors. *Recombinant DNA and cell proliferation.* Orlando: Academic Press; 1984. p.337-60.

- Baumann L. Skin age and its treatment. *J Pathol.* 2007;211:241-51.
- Benzie IFF. Lipid peroxidation: a review of causes consequences measurements and dietary influences. *Int J Food Sci Nutrition.* 1996;47:233-61.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. The regulation of cellular respiration is governed primarily by the need for ATP. In: *Biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Co; 2002.
- Bjerring P, Christiansen K, Troilius A, Dierickx C. Facial photo rejuvenation using two different intense pulsed light (IPL) wavelength bands. *Lasers Surg Med.* 2004;34:120-6, 2004.
- Black JF, Barton JK. Chemical and structural changes in blood undergoing laser photocoagulation. *Photochem Photobiol.* 2004;80:89-97.
- Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Cur Opin Cell Biol.* 2003;15:725-31.
- Boechat A. Laser: princípios efeitos e aplicações. In: *Laser em dermatologia*. São Paulo: Rocca; 2002.
- Borges LF, Gutierrez PS, Marana HRC, Taboga SR. Picrosirius - polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron.* 2007;38:580-58.
- Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cell. *Cell Proliferation.* 1992;25:31-40.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Develop Biol.* 1999;15:269-90.
- Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation oxidative stress and aging. *Free Radical Biol Med.* 2000;29:222-30.
- Carlson MA, Longaker MT. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Repair Regeneration.* 2004;12:134-47.
- Chellappan SP, Giordano A, Fisher PB. Role of cyclindependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development. In: Vogt PK Reed SI, editors. *Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors*. Berlin: Springer-Verlag; 1998. p. 57-103.
- Chung JO, Eun HC. Angiogenesis in skin aging and photoaging. *J Dermatol.* 2007;34:593-600.

- Ciocon DH, Boker A, Goldberg DJ. Intense pulsed light: what works what's new what's next. *Facial Plast Surg*. 2009;25:290-300.
- Coleman R. Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochem*. 2010; Feb 24. Epub ahead of print.
- Cooper GM. Cell walls and the extracellular matrix. In: *The cell - a molecular approach*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins-patologia estrutural e funcional*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.87.
- De Sica RCP. *Estudo comparativo pré e pós luz intensa pulsada no tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo: avaliação química histopatológica e imunoistoquímica*. (Dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
- Desagher S, Martinou JC. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2000;10:369-76.
- Doherty SD, Doherty CB, Markus JS, Markus RF. A paradigm for facial skin rejuvenation. *Facial Plast Surg*. 2009;25:245-51 2009.
- Ellis RJ. Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 1987;328:378-9.
- Ellis RJ, Hartl FU. Protein folding in the cell: competing models for chaperonin function. *FASEB J*. 1996;10:20-6.
- Feige U, Polla BS. Hsp70 - a multi-gene multi-structure multi-function family with potential clinical applications. *Experientia*. 1994;50:979-86.
- Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation*. 1992;85:1927-38.
- Fusco D, Colloca G, Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidants supplementation on the aging process. *Clin Intervent Aging*. 2007;2:377-87.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31:13.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody ki-67. *J Immunol*. 1984;133:1710-5.

- Gillett GE, Barnes DM. Cell cycle. *Mol Pathol*. 1998;51:310-6.
- Gredilla R, Bohr VA, Stevnsner T. Mitochondrial DNA repair and association with aging – An update. *Exp Gerontol*. 2010;45(7-8):478-88.
- Goldberg DJ. New collagen formation after dermal remodeling with an intense pulsed light source. *J Cutan Laser Ther*. 2000;2:59-61.
- Goldberg DJ, Samady JA. Intense pulsed light and Nd:YAG laser non ablative treatment of facial rhytids. *Lasers Surg Med*. 2001;28:141-4.
- Hall PA, Coates PJ. Assessment of cell proliferation in pathology-what next? *Histopathology*. 1995;26:105-12.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: University Press; 1989. p. 543.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992;119:568-620.
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*. 1989;119:203-10.
- Harman D. Aging: overview. *Ann NY Acad Sci*. 2001;928:1-21.
- Harman D. Free radical theory of aging: an update. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1067:10-21.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770-6.
- Hernández-Pérez E, Colombo-Charrier E, Valencia-Ibiett E. Intense pulsed light in the treatment of striae distensae. *Dermatol Surg*. 2002;28:1124-30.
- Holck DEE, Ng JD. Facial skin rejuvenation. *Cur Opin Ophthalmol*. 2003;14:246-52.
- Iyer S, Carranza D, Kolodney M, MacGregor D, Chipps L, Soriano T. Evaluation of procollagen deposition after intense pulsed light treatments at varying parameters in a porcine model. *J Cosmetic Laser Ther*. 2007;9:75-8.
- Jacob MC, Favre M, Bensa JC. Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry*. 1991;12:550-8.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Ninick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52:2745-56.

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biol Med*. 1990;9:515-40.

Jayat C, Ratinaud MH. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. *Biol Cell*. 1993;78:15-25.

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.

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.

Koester SK, Bolton WE. Intracellular markers. *J Immunol Methods*. 2000;243:99-106.

Lee DY, Cho KH. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. *Arch Dermatol Res*. 2005;296:296-302.

Lee DY, Yang JM. Dermal fibroblasts delay epidermal differentiation in three-dimensional culture models. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23:1346-7.

Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Sigmund M, Bader A. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2008;17:925-32.

Luo D, Cao Y, Wu D, Xu Y, Bin C, Xue Z. Impact of intense pulse light irradiation on BALB/c mouse skin- in vivo study on collagens matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor. *Lasers Med Sci*. 2009;24:101-8.

Macklis JD, Madison RD. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci Methods*. 1990;31:43-6.

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines clocks and microprocessors. *Annu Rev Cell Develop Biol*. 1997;13:261-91.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-8.

- Ohnishi Y, Tajima S, Akiyama M, Ishibashi A, Kobayashi R, Horii I. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin. *Arch Dermatol Res*. 2000;292:27-31.
- Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett*. 2004;149:19-23.
- Orringer JS, Hammerberg C, Hamilton T. Molecular effects of photodynamic therapy for photoaging. *Arch Dermatol*. 2008;144:1296-1302.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12:913-22.
- Pan JS, Hong MZ, Ren JL. Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol*. 2009;15:1702-7.
- Pollack M, Leeuwenburgh C. Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J Gerontol Biol Sci*. 2001;56A:B475-B482.
- Porter J, Deere D, Pickup R, Edwards C. Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. *Cytometry*. 1996;23:91-6.
- Pradelli LA, Bénéteau M, Ricci J-E. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci*. 2010[in press].
- Prietto VG, Diwan AH, Shea CR, Zhang P, Sadick NS. Effects of intense pulsed light and the 1.064 nm Nd:YAG laser on Sun-damaged human skin: histologic and immunohistochemical analysis. *Dermatol Surg*. 2005;31:522-5.
- Prietto VG, Sadick NS, Lloreta J, Nicholson J, Shea CR. Effects of intense pulsed light on sun-damaged human skin routine and ultra structural analysis. *Lasers Surg Med*. 2002;30:82-5.
- Railan D, Parlette EC, Uebelhoer NS, Rohrer TE. Laser treatment of vascular lesions. *Clin Dermatol*. 2006;24:8-15.
- Raulin C, Greve B, Grema H. (2003). IPL technology: a review. *Lasers Surg Med*. 2003;32:78-87.
- Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;56:350-60.
- Sasaki K, Murukami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki- 67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol*. 1987;33:579-84.

Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol*. 2003;148:334-6.

Shapiro HM. Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods*. 2000;21:271-9.

Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Bol Biotechnol*. 2001:32-40.

Stemerman MB, Spaet TH. The subendothelium and thrombogenesis. *Bull N Y Acad Med*. 1972;48:289-301.

sorg O, Janer V, Antille C, Carraux P, Leemans E, Masgrau E, Saurat J-H, Salomon D. Effect of intense pulsed-light exposure on lipid peroxides and thymine dimers in human skin in vivo. *Arch Dermatol*. 2007;143:363-6.

Sorrel JM, Baber MA, Caplan AI. Human dermal fibroblast subpopulation; differential interactions with vascular endothelial cells in coculture: nonsoluble factors in the extracellular matrix influence interactions. *Wound Repair Regeneration*. 2008;16:300-9.

Sorrel JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*. 2004;117:667-75.

Souil E, Capon A, Mordon S, Dinh-Xuan AT, Polla BS, Bachelet M. Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin. *Br J Dermatol*. 2001;144:260-6.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994;74:139-61.

Waibel JS. Photorejuvenation. *Dermatol Clin*. 2009;27:445-57.

Wong WR, Shyu WL, Tsai JW, Hsu KH, Pang JHS. Intense pulsed light modulates the expressions of MMP-2 MMP-14 and MMP-2 in skin dermal fibroblasts cultured within contracted collagen lattices. *J Dermatol Sci*. 2008;51:70-3.

Wong WR, Shyu WL, Tsai JW, Hsu KH, Pang JHS. Intense pulsed light effects on the expression of extracellular matrix proteins and transforming growth factor beta-1 in skin dermal fibroblasts cultured within contracted collagen lattices. *Dermatol Surg*. 2009;35:816-25.

Woodhall KE, Goldman MP, Gold MH, Biron J. Benefits of using a hydroquinone/tretinoine skin care system in patients undergoing intense pulsed light

therapy for photorejuvenation: a placebo-controlled study. *J Drugs Dermatol*. 2009;8:862-7.

Vannucchi H, Moreira EAM, Cunha DF, Junqueira-Franco MVM, Bernardes MM, Jordão-Jr AA. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina* (Ribeirão Preto). 1998;31:31-44.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2003;18:95-9.

Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry*. 1983;3:328-31.

Vitellaro-Zuccarello L, Cappelletti S. Stereological analysis of collagen and elastic fibers in the normal human dermis: variability with age sex and body region. *Anat Record*. 1994;238:153-62.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004;19:124-28.