

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Daíse Raquel Maldaner

**A INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA E DO GUARANÁ (*Paullinia cupana* Kunth) NOS
MARCADORES OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS, FATORES DE
CRESCIMENTO E NA PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS *IN*
*VITRO***

Santa Maria, RS
2018

Daíse Raquel Maldaner

**A INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA E DO
GUARANÁ (*Paullinia cupana kunth*) NOS MARCADORES OXIDATIVOS,
INFLAMATÓRIOS, FATORES DE CRESCIMENTO E NA PROLIFERAÇÃO DE
FIBROBLASTOS *IN VITRO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marta Maria Medeiros Frescura Duarte
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbisan

Santa Maria, RS
2018

Daíse Raquel Maldaner

**A INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA E DO
GUARANÁ (*Paullinia cupana kunth*) NOS MARCADORES OXIDATIVOS,
INFLAMATÓRIOS, FATORES DE CRESCIMENTO E NA PROLIFERAÇÃO DE
FIBROBLASTOS *IN VITRO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 10 de agosto de 2018:

Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Dr^a.
(Presidente/orientadora)

Melissa Orlandin Premaor, Dr^a. (UFSM)

Jonatas Zeni Kafkle, Dr. (ICCA/RS)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Não foi fácil chegar até aqui. Do processo seletivo, passando pela aprovação até a conclusão do Mestrado, foi um longo caminho percorrido, e por isso, preciso agradecer a todos que confiaram em mim, participaram ativamente das minhas atividades acadêmicas, me apoiaram e fizeram com que este desafio fosse superado de forma mais leve e gratificante.

Em primeiro lugar ao Ser Superior que nos guia, nos mostra os caminhos certos a seguir e nos dá condições para concluir nossa jornada.

Aos meus pais que são meus maiores incentivadores, nunca mediram esforços para que eu pudesse ter acesso a educação de qualidade, com uma frase clássica que sempre levei como lema: “Minha filha, vamos te dar a oportunidade de estudar, porque o estudo é a único bem que não poderá ser tirado de ti.”

À minha Irmã Daiane que foi minha primeira “aluna”, e sempre me dizia: Mana, você precisa ser professora !! mesmo enquanto eu ainda estava no ensino médio. Hoje é também uma amiga com quem sei que posso contar sempre, que sempre me ajuda a enxergar meus potenciais e me incentiva a aceitar os desafios.

Ao meu marido Fabrício que com muita compreensão alterou sua rotina e com muito carinho e amor me deu todo apoio necessário para que nossa família pudesse superar esta etapa de muito estudo, muitas horas em frente ao computador, muitas preocupações extras. Sei que nossas atividades de lazer e descanso foram reduzidas neste período final, mas em nenhum momento você deixou isso abalar nossa convivência e principalmente a atenção e cuidado com nosso filho, muito obrigada por tudo.

Ao meu filho Carlos, que hoje com 3 anos já aprendeu que mestrado é difícil e que a “mamãe precisa estudar muito”... sei que um dia ele vai ler isso e vai entender que minha “ausência” em alguns momentos foi necessária e que o meu desafio foi vencido com a ajuda e compreensão dele.

À Lucia, “mãe de coração” do Carlos, que me deu o suporte em casa para que eu conseguisse ter tranquilidade para escrever, estudar e me ausentar em alguns momentos, sem a presença dela com certeza tudo teria sido ainda mais difícil.

Bom, é claro que um agradecimento especial precisa ser feito neste momento à minha orientadora, amiga, colega, Marta Duarte que é meu exemplo profissional e pessoal deste que

conheci na ULBRA e que passou a ser minha incentivadora. Sem ela, com certeza eu não teria vencido. Agradeço todos os dias por ter a oportunidade de conviver com essa pessoa maravilhosa que não mede esforços para ajudar e que distribui alegria e bom humor por onde passa. Por isso eu sempre digo: “Quando eu crescer, quero ser como você, Marta”.

À minha coorientadora Fernanda Barbisan que teve muita paciência comigo, me explicando a temida bioquímica me deu suporte para que meu estudo fosse além das minhas expectativas, e que juntamente com a Prof Ivana da Cruz me ajudaram a desvendar as metodologias e estatísticas complexas desta área, principalmente para mim que sou uma mera Fisioterapeuta... Muito obrigada por tudo mesmo!!

Meu agradecimento para toda equipe do laboratório de Biogenômica, principalmente a Veronica Azzolin, o Thiago Duarte e o Moises Mastela que me auxiliaram no desenvolvimento dos experimentos. Tenho orgulho em dizer que faço parte deste grupo que é reconhecido por sua competência e seriedade de trabalho.

Minha gratidão também aos meus amigos(as) pelo apoio e palavras de incentivo, aos meus colegas da ULBRA que foram meus exemplos e meu suporte, sendo compreensivos com minhas ausências e me passando tranquilidade para encarar este desafio.

Às minhas amigas e colegas Fisioterapeutas, Danielle que foi minha “fada madrinha” e me apresentou o mundo da docência pelo qual me apaixonei. A Láutia, minha comadre e exemplo de amiga e profissional dedicada, e à Marlove que também encarou o desafio do mestrado e serviu como incentivo para mim.

Enfim, ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia e professores pela preparação e suporte para que esta titulação fosse conquistada. E aos professores Melissa Orlandin Premaour e Jonatas Zeni Kafkle, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

MUITO OBRIGADA

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Maria

A INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA E DO GUARANÁ (*Paullinia cupana kunth*) NOS MARCADORES OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS, FATORES DE CRESCIMENTO E NA PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS *IN VITRO*

AUTORA: Daíse Raquel Maldaner
ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte
COORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Barbisan

Introdução: O envelhecimento cutâneo em humanos é um processo complexo e pode ser induzido por fatores intrínsecos e extrínsecos. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são as principais responsáveis pelas alterações na pele especialmente à nível dos fibroblastos. O acúmulo de EROs no organismo e a ineficiência das defesas antioxidantes instauram o estresse oxidativo, condição capaz de gerar danos no lipídios e proteínas de membrana e no ácido desoxirribonucleico (DNA) celular. Investigações prévias têm demonstrado que o guaraná (*Paullinia cupana var. sorbilis* Mart Kunth) por sua ação antioxidante, anti-inflamatória pode ser capaz de reparar danos celulares. Além disso, o tratamento eletroterápico com o laser de baixa potência (LBP) destaca-se por apresentar ação anti-inflamatória, cicatrizante e biomoduladora tecidual. A associação destas duas terapias pode ser coadjuvante aos tratamentos tradicionais para reparar os danos celulares cutâneos, justificando a relevância desta pesquisa, pois ainda não existem estudos prévios associando estas terapias. **Objetivo:** Avaliar o efeito *in vitro* do LBP nos marcadores de senescência celular de fibroblastos humanos expostos ao H₂O₂ e na potencialização dos efeitos citoprotetores associados ao guaraná. **Métodos:** este estudo foi realizado em cultura de células comerciais fibroblastos humanos da Linhagem HFF-1. As células foram expostas previamente ao H₂O₂, por 2 horas e em seguida foram tratadas com LBP no comprimento de onda de 660nm e com guaraná, permanecendo por 24 ou 72 horas em cultivo. As doses utilizadas nos tratamentos com guaraná e LBP, foram definidas após realização da curva de doses. Após a definição das doses foram realizados os tratamentos de guaraná e LBP isoladamente e em associação e após 24 ou 72h, foram realizadas as análises dos marcadores oxidativos, inflamatórios, apoptóticos e de proliferação celular, conforme protocolos previamente descritos na literatura. **Resultados:** O primeiro experimento (manuscrito 1) determinou a curva de dose do LBP e do H₂O₂ e a interação destes tratamentos. Foi possível verificar que a melhor dose de H₂O₂ para este estudo foi de 50µM e do LBP foi de 4 J/cm². Nesta dose, a interação do LBP com as células expostas ao H₂O₂ mostrou que o LBP possui efeito anti-inflamatório, anti apoptótico e favorecedor de proliferação celular. O segundo experimento (manuscrito 2) estabeleceu a curva de dose do guaraná e o efeito do uso isolado e da associação do LBP ao guaraná na reversão dos danos gerados pelo H₂O₂. Ficou evidente que ambos os tratamentos tem ação citoprotetora, porém com a associação dos tratamentos demonstrou-se resultados mais relevantes na proliferação celular pelo aumento significativo de células na fase S e aumento da expressão de FGF-1 nos fibroblastos tratados. **Conclusão:** os resultados deste estudo sugerem que o LBP é capaz de atuar positivamente nos marcadores de senescência de fibroblastos e que a associação do LBP com guaraná intensificou os efeitos cito-funcionais em relação aos tratamentos isolados, especialmente na proliferação celular.

Palavras-Chave: Estresse Oxidativo. Pele. Laser de Baixa Potencia. Guaraná

ABSTRACT

Masters Dissertation
Graduate Program in Pharmacology
Health Sciences Center
Universidade Federal de Santa Maria

THE INFLUENCE OF ASSOCIATING LOW-LEVEL LASER AND *GUARANÁ (Paullinia cupana kunth)* IN OXIDATIVE, INFLAMMATORY MARKERS, GROWTH FACTORS AND PROLIFERATION OF FIBROBLAST *IN VITRO*

AUTHOR: Daíse Raquel Maldaner
ADVISOR: Prof. Dr. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte
CO-ADVISOR: Prof. Dr. Fernanda Barbisan

Introduction: Cutaneous aging in humans is a complex process and can be induced by intrinsic and extrinsic factors. Reactive oxygen species (ROS) are the main responsible for skin changes, especially at the level of fibroblasts. The accumulation of ROS in the organism and lack of antioxidant defenses generate oxidative stress, which is a condition that can damage the lipids and proteins of the membrane and cellular deoxyribonucleic acid (DNA). Previous investigations have shown that *guaraná (Paullinia cupana var. Sorbilis Mart Kunth)* may repair cell damage due to its antioxidant and anti-inflammatory action. In addition, electrotherapeutic treatment with a low-level laser therapy (LLLT) stands out due to its anti-inflammatory, cicatrizing, and tissue biomodulating action. The association of these two therapies can be used to support traditional treatments to repair skin cell damage, which justifies the relevance of this research since there are no studies associating these therapies. **Objective:** To evaluate the *in vitro* effect of LLLT in cellular senescence markers of human fibroblasts exposed to H₂O₂ and in the potentiation of the cytoprotective effects associated with *guaraná*. **Methods:** This study was performed on commercial human fibroblast cell culture (line HFF-1). Cells were pre-exposed to H₂O₂ for 2 hours and then treated with LLLT at a wavelength of 660nm and *guaraná*. Cells remained in the culture for 24 or 72 hours. After the determinations of the doses, the treatments of *guaraná* and LLLT were performed alone and in association. After 24 or 72 hours, analyzes of the oxidative, apoptotic, and cell proliferation markers were performed according to protocols previously described in the literature. **Results:** The first experiment (manuscript 1) determined the dose curve of LLLT and H₂O₂ and the interaction of these treatments. The best dose of H₂O₂ for this study was 50µM and 4 J/cm² for LLLT. At this dose, the interaction of LLLT with cells exposed to H₂O₂ showed that LLLT has an anti-inflammatory, anti-apoptotic, and cell proliferation-enhancing effect. The second experiment (manuscript 2) established the dose curve of *guaraná* and the effect of the single use and association of LLLT with *guaraná* in reversing the damage caused by H₂O₂. The results also revealed that both treatments have cytoprotective action, although this association showed more relevant results in cell proliferation due to the significant increase of cells in the S phase and FGF-1 expression in the treated fibroblasts. **Conclusion:** This study suggests that LLLT is able to act positively on fibroblast senescence markers and that the association of LLLT with *guaraná* intensified cytofunctional effects in relation to isolated treatments, especially in cell proliferation.

Keywords: Oxidative stress. Skin. Low-level Laser. Guaraná

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Imagem ilustrativa das principais funções da pele.	17
Figura 2- Estrutura e renovação da epiderme	19
Figura 3- Composição geral da pele com destaque para derme e suas estruturas anexas.	20
Figura 4 - Histologia da derme papilar e reticular.....	21
Figura 5- Imagem histológica da derme com diferenciação de fibroblastos, fibrócitos e fibras de colágeno.....	22
Figura 6- esquematização da cascata indutora do envelhecimento intrínseco e extrínseco.	25
Figura 7 - representação esquemática da cadeia de geração de EROs	28
Figura 8 - Mecanismos de reparo ou indução de apoptose via ativação de p-53. O que resulta em uma diminuição nos níveis estacionários do p53 são indicados com setas verdes e aqueles que resultam em aumento dos níveis de p53 são indicados com setas vermelhas.....	31
Figura 9 - Mecanismos intrínsecos e extrínsecos de ativação da apoptose celular via cascata de caspases.....	32
Figura 10 - Efeitos do laser de baixa potência por ativação do cromóforo CCO mitocondrial. Ativação da produção de ATP e liberação de EROS que atuam como sinalizadoras de transcrição gênica.	36
Figura 11 - Guaraná. A-partes do guaraná I-planta, II-sementes, III-pó das semestres. B- Cromatografia do extrato hidroalcoólico exibindo 3 picos principais: 1-teobromina, 2-catequinas, 3-cafeína.....	39
Figura 12 - Delineamento experimental geral.	42

MANUSCRITO 1

Figure 1 - Effect of different H_2O_2 concentrations on the expression levels of markers cytotoxicity and apoptosis (A), antioxidant enzymes (B), cytokines (C), and histological analysis (D) of fibroblasts.....	49
Figure 2 - Effect of different doses of LLLT on the expression of markers of cyto-genotoxic and apoptotic (A), antioxidant enzymes (B), cytokines (C) in fibroblasts	50
Figure 3 - Comparison of changes in the levels of cell mortality (A), DNA oxidation (B), Casp 3 (C) and Casp 8 (D) markers in fibroblasts treated with LLLT $4J/cm^2 + H_2O_2$, LLLT $4J/cm^2$ and H_2O_2 , and incubated for 72h	51
Figure 4 - Comparison of changes in the levels of antioxidant enzymes (A) and cytokines (B), in fibroblasts treated with $4J/cm^2 + H_2O_2$, LLLT $4J/cm^2$ and H_2O_2 , incubated for 72h.....	52
Figure 5 - Comparison of cell cycle progression in fibroblasts treated with LLLT $4J/cm^2 + H_2O_2$, LLLT $4J/cm^2$ and H_2O_2 in culture for 72h. (A) Representative flow cytometry analysis graphs for each treatment. G1 = gap 1 phase, G2 = gap 2 phase, and S = synthesis phase. (B) representative S plus G2 phases for fibroblasts after each treatment (C) the effects of different treatments on the expression of fibroblast and keratinocyte growth factors.....	53

MANUSCRITO 2

- Figure 1** - Effect of different concentrations of Guarana on fibroblast after 72 hours cell exposition in markers : inflammatory (A), anti-inflammatory (B), apoptosis (C) and oxidation of DNA (D). Effect was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C, D,) indicate statistical differences in each treatment at $p < 0.05$ 68
- Figure 2** - Effect of Guarana, low-level laser therapy (LLLT), and their association in oxidative stress markers: (A) Levels of Reactive oxygen species (ROS); (B) Carbonylation of proteins; (C) Lipoperoxidation (D) DNA oxidation and (E) Level of antioxidant enzymes Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione peroxidase (GPX). Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance followed by the Bonferroni post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C) indicate statistical differences in each treatment at $p < 0.05$69
- Figure 3** - Effect of Guarana , low-level laser therapy (LLLT), and association in proteic levels and gene expression in fibroblasts. (A) Proteic levels and (B) gene expression cytokines: IL-1 β , IL-6, TNF- α (pro-inflammatory) and IL-10 (anti-inflammatory). (C) Proteic levels and (D) gene expression caspase. Treatments were statistically compared by ANOVA TwoOne-Way followed by Tukey post hoc test. Different letters identified concentrations with significant differences calculated by post hoc test ($p < 0.05$). Gene expressions of each cytokine and caspase are represented by coloured squares and were determined using untreated control group as reference to calculate the relative mRNA expression. The expression level of beta-actin was used as an internal control (housekeeping gene).....71
- Figure 4** - Effect of Guarana, LLLT, and association in fibroblasts, cell cycle determined by flow cytometry after 72 h exposition. (A) Representative graphics with cell phases: (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis). (B) % of cells the control in at each stage (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis) of the cell cycle. (C) proteic levels FGF and KGF-1. Analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C, D) indicate statistical differences in each treatment at $p < 0.05$ 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AP-1 – Proteína ativadora 1
- ASC – Células adiposas mesenquimais
- ATCC – *The American Type Culture e Collection*
- ATP – Adenosina Trifosfato
- Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*
- CASP - Caspase
- CAT – Catalase
- CCO – Citocromo C oxidase
- DCFH-DA – Diclorofluorecína-diacetato
- DMEM – *Dulbecco modification of Minimum Essential Media*
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EGF – *Epidermal growth factor*
- ERO – Espécie reativa de oxigênio
- FADD – Proteína de domínio associada a *Faz*
- FC – Fator de crescimento
- FGF – *Fibroblast growth factor*
- GPX – Glutaciona peroxidase
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HFF-1 – Linhagem de fibroblastos
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística
- IL-1 – Interleucina um
- IL-1 β – Interleucina um beta
- IL-6 – Interleucina seis
- IL-10 – Interleucina dez
- IFN γ – Interferon gama
- J/cm² – Joules por centímetros quadrados
- KGF – *Keratinocytes growth factor*
- LBP – Laser de baixa potência
- LLLT – *Low-level Laser Therapy*
- LO[•] – Radical alcoxila
- LOOH[•] – Radical peroxila
- ¹O₂ – Oxigenio singlete

O₂⁻ – Radical superóxido
OH⁻ – Radical hidroxila
ON – Óxido nítrico
ONU – Organização das Nações Unidas
MAP – Proteína ativada por mitógeno
MDM₂ – *Murine double minute 2*
MEC – Matriz extracelular
MMP – Metaloproteinase
NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NBT – Nitro blue tetrazolium
NFκB – Fator nuclear kappa beta
P 53 – Proteína supressora de tumor
PDGF – *Platelet-derived growth factor*
RNA – Ácido ribonucleico
RUV – Radiação ultravioleta
SNP – Nitroprussiato de sódio
SOD – Superóxido desmutase
TGFβ – *Transforming growth factor-beta*
TNF – Fator de necrose tumoral
TRADD – Proteína de domínio de morte associada a TNF
VEGF – *Vascular endothelial growth factor*
W – Watt

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	13
1 INTRODUÇÃO	13
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo geral.....	14
1.2.2 Objetivos específicos.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 ENVELHECIMENTO E SEU IMPACTO PESSOAL E SOCIAL	16
2.2 FISIOLOGIA DA PELE	17
2.3 FIBROBLASTOS: AS PRINCIPAIS CÉLULAS DA PELE	21
2.4 FISIOPATOLOGIA DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO.....	23
2.4.1 Papel do Metabolismo oxidativo e inflamatório no envelhecimento cutâneo	26
2.4.2 Marcadores apoptóticos	31
2.4.2 Atuação dos fatores de crescimento na manutenção da integridade cutânea.....	33
2.5 TERAPÊUTICA NO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO	34
2.5.1 Laser de baixa potência.....	35
2.5.2 Guaraná (<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> Mart).....	38
3 METODOLOGIA.....	41
3.1 DELINEAMENTO METODOLÓGICO EXPERIMENTAL GERAL	41
4 RESULTADOS	43
4.1 MANUSCRITO 1	43
4.2 MANUSCRITO 2.....	58
5 DISCUSSÃO	79
6- CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO A- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1.....	96

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), do ano de 2015. O presente estudo buscou avaliar o efeito do LBP em marcadores de senescência celular de fibroblastos expostos ao peróxido de hidrogênio e na potencialização dos efeitos antioxidantes e antiinflamatórios do guaraná de fibroblastos dérmicos através da análise de marcadores cito-funcionais e está apresentado sob a forma de dois manuscritos.

O primeiro intitulado “*In vitro effect of low-level laser therapy on the proliferation, apoptosis modulation, and expression of oxi-inflammatory markers in hydrogen peroxide-induced premature dermal fibroblasts*” submetido a revista *Lasers in Medical Science*, classificada no Qualis Capes - Ciências Biológicas II como B1.

O segundo manuscrito intitulado “*Interaction between low-level laser therapy and Guarana (Paullinia cupana) extract potentialize antioxidant, antiinflammatory, antiapoptotic and proliferative effects on dermal fibroblasts*” será submetido a revista *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, classificada no Qualis Capes - Ciências Biológicas II como B3.

As seções “introdução”, “revisão bibliográfica” e “delineamento metodológico geral” encontram-se no início desta dissertação; as seções “materiais e métodos” e “resultados” encontram-se nos manuscritos, que estão presentes na íntegra deste estudo e seguem as regras das revistas; as seções “discussão” e “conclusão” encontram-se no final desta dissertação, após os manuscritos. As referências bibliográficas listadas no fim da dissertação referem-se somente às citações dos itens introdução, revisão bibliográfica e discussão, uma vez que as referências utilizadas nos manuscritos estão ao final de cada um.

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e é indispensável à vida, pois isola os componentes orgânicos do meio exterior. Constitui-se de complexa estrutura de tecidos, que são definidos como grupos celulares de várias naturezas, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções de proteção, regulação térmica, produção de vitamina D, defesa imunológica, secreção e excreção (DIHL; LEHMANN, 2011). Com o passar dos anos, o organismo passa por um processo de envelhecimento cronológico natural ou intrínseco, afetando de forma simultânea todos os órgão e tecidos, em virtude das células possuírem uma capacidade de multiplicação finita, conduzindo a senescência celular (KAMIZATO; BRITO, 2014).

A senescência natural é explicada devido às deficiências durante a replicação do ácido desoxiribonucleico (DNA), uma vez que os telômeros continuamente perdem parte de suas sequências, e supõe-se que esta perda seja um fator de limitação para a capacidade replicativa celular. As principais alterações cutâneas encontradas no envelhecimento ocorrem na matriz e na expressão dos fibroblastos, os quais permanecem em fase estacionária por um longo período de tempo na derme. Estes só irão proliferar quando existir uma estimulação ou se não ocorrer o encurtamento dos telômeros (BORGES; SCORZA, 2016).

No entanto na pele, as manifestações do envelhecimento são maiores e visivelmente detectadas em virtude do dano actínico gerado pelo contato com o meio externo, ou envelhecimento extrínseco. Este dano é desencadeado por um processo fotoquímico entre cromóforos cutâneos e a radiação ultravioleta (RUV) com liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), e uma cascata de sinalização de citocinas inflamatórias, aumento da expressão de receptores de superfície celular, fatores transcriptores e liberação de enzimas responsáveis pela degradação das estruturas que sustentam a pele (ZHANG; DUAN, 2018). As células que apresentarem as membranas danificadas ficam sujeitas à danos celulares, a apoptose e ao prejuízo no transporte ativo de substâncias, induzindo a danos nos sistemas biológicos (VASCONCELOS, 2017).

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo, com função de sustentação e hidratação devido a sua capacidade de produção de fibras colágenas, elásticas, glicosaminoglicanos e substância fundamental amorfa (BORGES; SCORZA, 2016). No envelhecimento, os fibroblastos encontram-se em número reduzido, as fibras colágenas são finas e as elásticas em processo de degradação (PATRIOTA; RODRIGUEZ; CUCÉ, 2011), o

que torna esta célula importante para quantificar o dano e avaliar o processo de envelhecimento cutâneo (QUIN; BALIMUNKWE; QUAN, 2016).

Várias terapias têm sido propostas para minimizar os danos teciduais incluindo o uso do Laser de Baixa Potência (LBP). Entretanto os efeitos benéficos do LBP não são universais, e parecem ser dependentes do tipo de tecido e de parâmetros de exposição como dose, potencia, frequência, entre outros (YONEKURA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Além disto, não existem evidencias consistentes se o LBP poderia reverter ou atenuar alterações da pele associadas diretamente ao envelhecimento deste órgão. Com base neste contexto, o presente estudo buscou avaliar o potencial efeito do LBP em fibroblastos artificialmente envelhecidos via exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disto, o presente estudo avaliou se, os efeitos benéficos do LBP sobre fibroblastos poderiam ser intensificados via interação com outros agentes farmacológicos que potencialmente modulam o envelhecimento celular. Este é o caso do extrato do guaraná produzido a partir de sementes torradas da espécie *Paullinia cupana var. sorbilis Mart Kunt* o qual possui efeito antioxidante, antiinflamatório (KREWER et al., 2014) e atua na reversão de indicadores de senescência celular (MACHADO et al., 2015).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* do LBP nos marcadores de senescência celular de fibroblastos humanos expostos ao H_2O_2 e na potencialização dos efeitos citoprotetores associados ao guaraná.

1.2.2 Objetivos específicos

Em cultura de células da linhagem HFF-1 de fibroblastos humanos:

- Identificar a melhor dose de LBP, nos parâmetros utilizados neste estudo, com ação citoprotetora e regenerativa.
- Avaliar o efeito do LBP em marcadores de senescência celular de fibroblastos expostos ao H_2O_2 , por meio da análise de marcadores citotóxicos, antioxidantes, inflamatórios, apoptóticos e de reparo tecidual;

- Analisar se o LBP age na potencialização dos efeitos antioxidantes e antiinflamatórios associados ao extrato de guaraná através da análise da modulação da viabilidade e proliferação celular e de marcadores apoptoticos, oxi-inflamatórios, antiinflamatórios e antioxidantes.
- Identificar se o efeito sinérgico entre tratamento com o LBP e o guaraná em fibroblastos pode compor uma nova alternativa de tratamento para o envelhecimento cutâneo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENVELHECIMENTO E SEU IMPACTO PESSOAL E SOCIAL

O atual ritmo de envelhecimento da população mundial foi caracterizado pela ONU (Organização das Nações Unidas) em 2015 como: sem precedentes, penetrante, por ser um fenômeno que afeta todos os países, duradouro, já que não será possível o retorno para uma população predominantemente jovem como existia anteriormente (BARBISAN, 2017).

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgados em 2013, a população com faixa etária superior aos 65 anos deve quadruplicar até 2060 alcançando 58,4 milhões (26,7% do total de brasileiros), sendo que a expectativa média de vida deverá aumentar de 75 para 81 anos (IBGE, 2013).

Além de representar uma mudança significativa em termos socioeconômicos, o novo perfil populacional impacta na atuação de diversas modalidades médicas, visando promover a saúde e bem-estar de todos e, de fato, os cuidados geriátricos tem se tornado uma questão de saúde mundial. A complexidade do envelhecimento humano pode ser analisada a partir de diferentes abordagens conceituais e teóricas e se estende em todos os níveis das ciências humanas, das econômicas, jurídicas e das políticas sociais. É inquestionável que o processo de envelhecimento provoca no organismo modificações biológicas, psicológicas e sociais. Entretanto, é nas idades mais avançadas que esse processo torna-se mais evidente (LOURENZINI, 2014). O envelhecimento é um dos temas de maior relevância na medicina atual, tendo em vista o aumento da expectativa de vida da população e, ao mesmo tempo, a procura de formas para retardá-lo (ONU, 2015; SCHALKA et al., 2016).

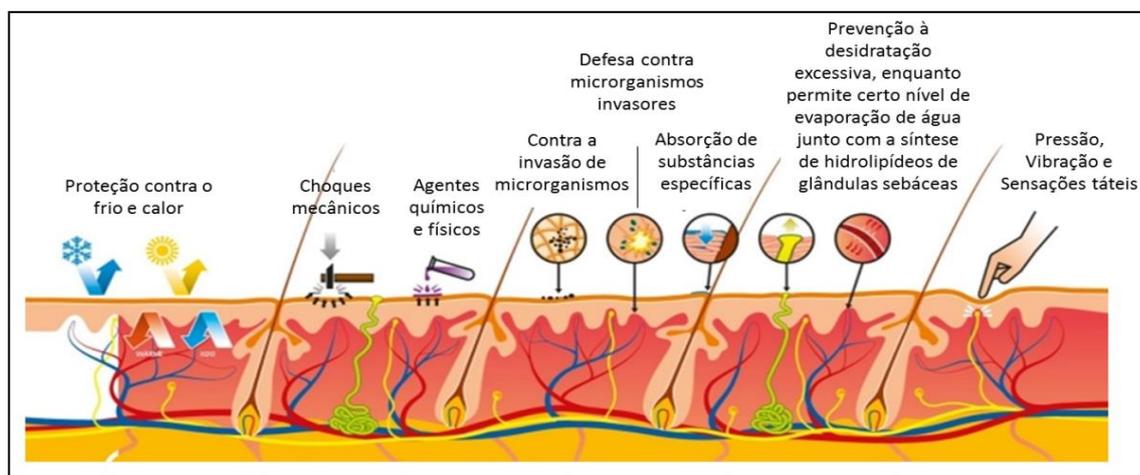
Destacam-se diversas disfunções cutâneas associadas ao envelhecimento, que apesar de não representarem condições letais, podem comprometer a qualidade de vida dos indivíduos afetados, por diminuir a autoestima, deixar o portador em situações constrangedoras, interferir no sono, e muitas vezes, provocar depressão, isolamento social e deterioração da aparência. As características observadas mais comumente na pele envelhecida são a capacidade reduzida de cicatrização, o enfraquecimento da imunidade que aumenta o risco de infecções, uma maior lentidão na resposta a tratamentos e um aumento na predisposição a reações adversas. De impacto mais drástico, a pele envelhecida apresenta maior disposição para o desenvolvimento de neoplasias, exigindo maiores cuidados principalmente quanto à exposição solar (LOURENZINI, 2014). Ainda, é preciso citar a constante busca por uma pele com aspecto jovial e saudável, sendo a aparência estética uma

das preocupações mais comuns em consultórios de dermatologia. A insatisfação com os sinais do envelhecimento cutâneo como rugas, sulcos, atrofia e manchas é um fator importante na redução da autoestima e causa de transtornos psico-sociais, sendo portanto um campo relevante de atuação para os profissionais da saúde e da beleza (MACEDO; TENÓRIO, 2015).

2.2 FISIOLOGIA DA PELE

De todos os órgãos dos sentidos, a pele é o mais vital: pode-se viver cego, surdo ou privado de paladar, porém sem a integridade da maior parte da pele, não é possível sobreviver. Ela atua, de forma coadjuvante, em muitas funções biológicas como na manutenção do equilíbrio metabólico, secretando e eliminando substâncias, mantendo o tônus, além de formar uma barreira de proteção antimicrobiana, imunológica, química, física e térmica e de conter terminações sensoriais que detectam estímulos táteis, vibratórios, pressóricos, térmicos, dolorosos e pruriginosos, conforme figura 1 (AZULAY; AZULAY; AZULAY-ABULAFIA, 2008; KAMIZATO; BRITO, 2014; PEREIRA, 2013).

Figura 1 - Imagem ilustrativa das principais funções da pele.



Fonte: adaptado de Lepori (2006).

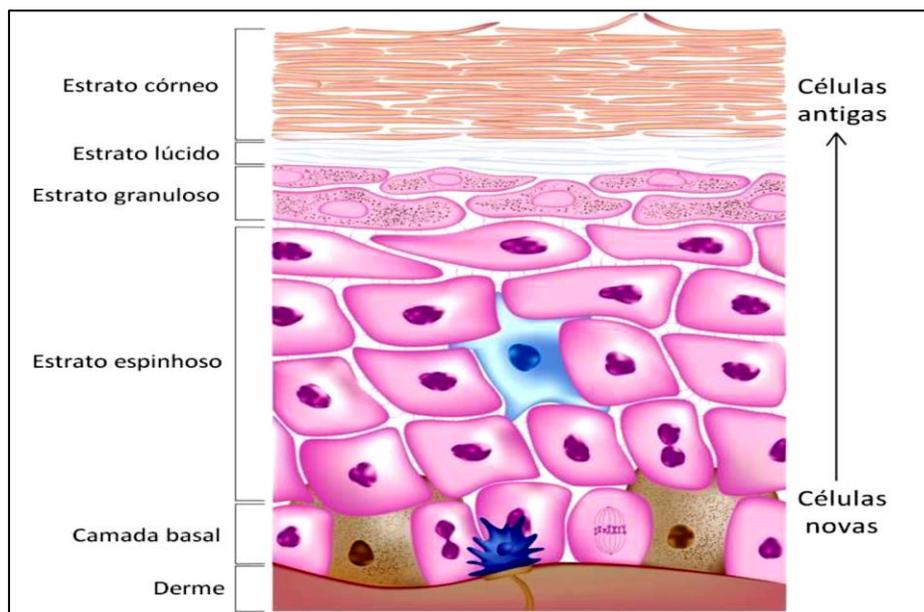
Este órgão é basicamente formado por três camadas interdependentes: a epiderme, mais externa, a derme, intermediária, e a hipoderme, mais profunda. A transição entre a epiderme e a derme é chamada de junção dermoepidérmica (DAL GOBBO, 2010; SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

A epiderme é composta por um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso e sua principal função é produzir queratina. Contém quatro tipos principais de células: os queratinócitos, responsáveis por sintetizar proteínas resistentes e impermeáveis; os melanócitos, que produzem melanina responsável por proteger a pele da luz ultravioleta; e ainda as células de Langerhans que participam do sistema imunológico e as células de Merkel, relacionadas à função sensorial (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010).

A epiderme é composta por cinco camadas ou túnicas: a camada basal é considerada a camada germinativa da pele e está ligada a junção dermoepidérmica. Nesta camada, os queratinócitos estão em constante atividade mitótica, sofrem diferenciação celular e migram formando as camadas mais superficiais; a camada espinhosa é constituída de cinco a dez fileiras de células que já sofreram modificações morfológicas e estão conectadas entre si e com as células da camada basal pelos desmossomas, os responsáveis pela coesão das células conferindo-as resistência a trações e pressões; a camada granulosa localiza-se acima da camada espinhosa e é composta por três a quatro fileiras de queratinócitos achatados com citoplasma repleto de grânulos de querato-hialina e que se preparam para perder seu núcleo, ocorrendo à morte celular; a camada lúcida é formada por células anucleadas e achatadas formando uma faixa transparente posta entre a camada granulosa e a camada córnea localizada nas regiões palmoplantares; a última camada da epiderme é a camada córnea, composta por células mortas, totalmente queratinizadas empilhadas e compactadas as quais são removidas e repostas continuamente, desempenhando a função principal da barreira cutânea (AZULAY; AZULAY; AZULAY-ABULAFIA, 2008; BORGES; SCORZA, 2016; RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010).

As células da epiderme tem a propriedade de se renovar pela intensa atividade mitótica que ocorre na camada basal, dispondo assim de uma migração da camada mais profunda para a mais superficial, após a alteração estrutural que sofrem durante a diferenciação celular, conforme figura 2. O tempo de migração para um queratinócito basal chegar à camada córnea é de cerca de quatorze dias, e o mesmo período é necessário para a descamação da camada córnea, totalizando quatro semanas para a renovação total da epiderme, em condições normais (HARRIS, 2011).

Figura 2- Estrutura e renovação da epiderme



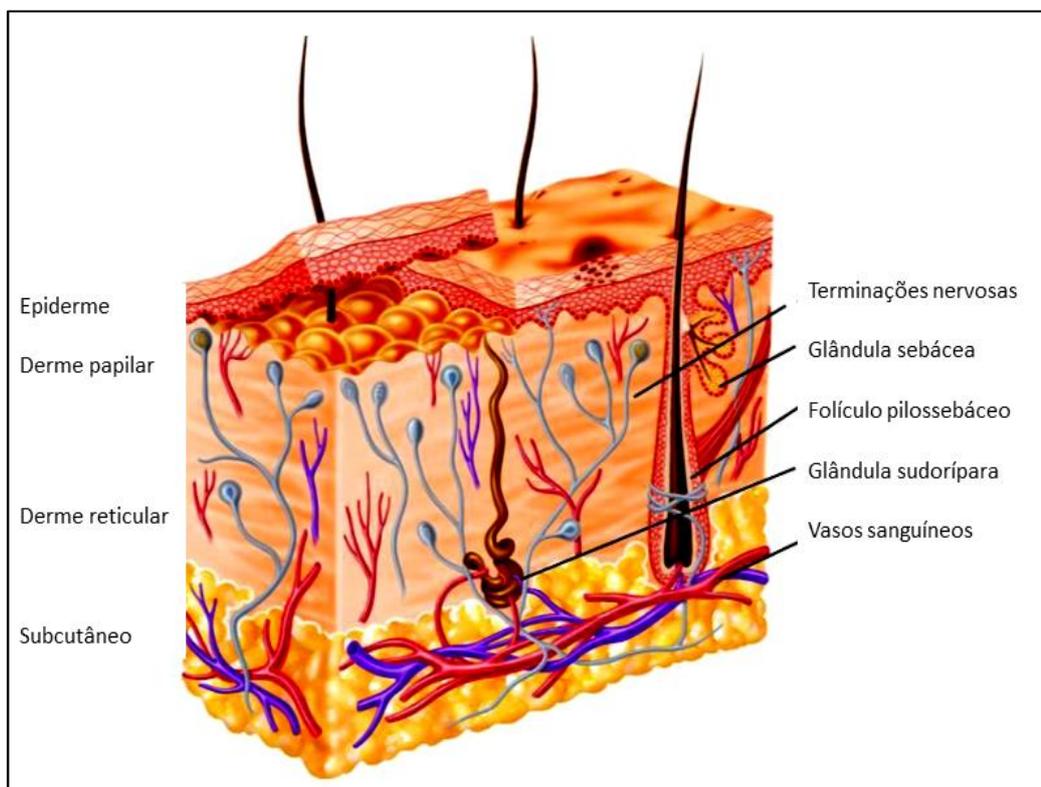
Fonte: adaptado de Donadussi (2012).

A junção dermoepidérmica é outra estrutura importante que compõe a pele, é uma membrana sintetizada por queratinócitos basais e fibroblastos dérmicos e funciona como um apoio mecânico à adesão da derme na epiderme e como uma barreira aos produtos químicos e celular. A estrutura da junção dermoepidérmica é complexa, composta por quatro camadas distintas visto em microscopia eletrônica. A camada superior contém a membrana celular dos queratinócitos basais e seus hemidesmossomos. A próxima camada é a lâmina lúcida, que é atravessada por filamentos de ancoragem, e situa-se sobre a lâmina densa. A lâmina sub-basal é uma zona filamentosa composta principalmente de fibrilas de ancoragem que servem para ancorar a epiderme e a junção dermoepidérmica à derme. Desta forma, a epiderme penetra na derme por meio de cristas epidérmicas, enquanto a derme se projeta na epiderme através de papilas dérmicas. Essas junções proporcionam as trocas metabólicas necessárias para pele, além de assegurar a aderência entre a epiderme e derme (BORGES; SCORZA, 2016; DONADUSSI, 2012).

A derme é a camada que histologicamente é formada por tecido conjuntivo. Suas funções principais são de proporcionar flexibilidade, manutenção da homeostase e de atuar na proteção e sustentação da pele. É composta por fibras colágenas, elásticas e substância fundamental amorfa. Ainda na derme, encontram-se vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, músculo eretor do pelo e anexos cutâneos, conforme figura 3. Dentre as células residentes da

derme, encontramos os fibroblastos, responsáveis por sintetizar as fibras de colágeno e a substância fundamental amorfa, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, leucócitos e plasmócitos, entre outros (BORGES; SCORZA, 2016; HARRIS, 2011).

Figura 3- Composição geral da pele com destaque para derme e suas estruturas anexas.



Fonte: adaptado de Donadussi (2012).

A derme é dividida em duas regiões distintas: a derme papilar superior e derme reticular inferior (figura 4). A Derme papilar está localizada logo abaixo da junção dermo-epidérmica e possui formas cônicas projetadas para cima, conhecidas como papilas dérmicas. Essas projeções aumentam a área de interface dermoepidérmica permitindo uma melhor aderência entre derme e epiderme. A derme papilar é composta por feixes frouxamente organizados de colágeno, fibras elásticas, fibrócitos, capilares, e terminações nervosas. A derme reticular contém fibras de colágeno compacto, fibras elásticas grossas, parte profunda de anexos epidérmicos, e redes vasculares e nervosas (DONADUSSI, 2012).

Figura 4 - Histologia da derme papilar e reticular.



Fonte: (SORREL; CAPLAN, 2004).

O colágeno é o principal constituinte da derme e é sintetizado pelos fibroblastos. Mais de 90% de fibras dérmicas são feitas de colágeno intersticial, principalmente dos tipos I e III, proporcionando resistência à tração mecânica e resistência à pele. As fibras elásticas são responsáveis pelo retorno da pele à sua configuração normal após deformação, e se estendem da lâmina densa da junção dermoepidérmica à derme reticular. As fibras elásticas são finas na derme papilar, mas se tornam mais espessas e mais orientadas horizontalmente na derme reticular (ECKERSLEY et al., 2018).

As fibras e células dérmicas são incorporadas na matriz de macromoléculas, conhecido como substância fundamental que é composta de glicoproteínas e proteoglicanos. Os componentes celulares da derme incluem fibroblastos, dendrócitos dérmicos e mastócitos. Fibroblastos são as principais células dérmicas e encontram-se mais abundantes na derme papilar e em menor número na derme reticular (COLE et al., 2018).

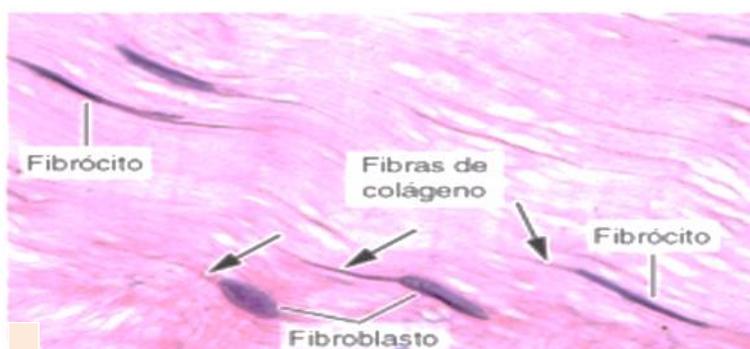
2.3 FIBROBLASTOS: AS PRINCIPAIS CÉLULAS DA PELE

O fibroblasto, como célula “imatura” ou de característica mesenquimal, é reconhecido como o tipo celular versátil dos tecidos conjuntivos. Além de ser responsável pela formação e remodelação dos tecidos classificados histologicamente como conjuntivos propriamente ditos, participa de modo ativo nos processos de cicatrização e de fibrose em determinadas doenças.

Uma vez diferenciados como subtipos celulares “maduros”, os fibroblastos ainda exibem diversidade considerável no que diz respeito às características morfológicas, expressão de receptores de superfície celular específica e capacidade de renovação celular (BELLICANTA, 2016; BORGES; SCORZA, 2016).

Ao microscópio óptico os fibroblastos apresentam um núcleo grande e com forma elíptica e cromatina pouco condensada, podem ser observados no núcleo dos fibroblastos vários nucléolos. Quando estão em intensa atividade, os fibroblastos apresentam prolongamentos citoplasmáticos que se misturam as fibras recém-sintetizadas da matriz extracelular (MEC). Conforme vão diminuindo a sua atividade, estas células passam a apresentar um formato fusiforme, seus nucléolos apresentam-se de maneira condensada e o citoplasma torna-se acidófilo, sendo então chamadas de fibrócitos, conforme figura 5 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 5- Imagem histológica da derme com diferenciação de fibroblastos, fibrócitos e fibras de colágeno.



Fonte: adaptado de Junqueira; Carneiro (2013).

Por ser um tipo celular com alta atividade de síntese e baixa capacidade de reserva, os fibroblastos quando observados ao microscópio eletrônico possuem seu citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, ribossomos, complexo de Golgi e mitocôndrias. Em fibroblastos com menor atividade, podem ocorrer alterações na aparência do citoplasma, redução no tamanho do núcleo e no número de compartimentos citoplasmáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Devido a sua capacidade de remodelar a MEC, os fibroblastos atuam diretamente na morfogênese dos organismos pluricelulares. Dependendo de sua localização, organizam-se de diferentes formas, são eles que, no processo de remodelação tecidual são responsáveis por ordenar a orientação dos elementos da MEC e composição da matriz. Quando localizados na

derme reticular apresentam-se em tramas paralelas a superfície e possuem formas estreladas mantendo íntima relação com as células vizinhas conferindo resistência as forças mecânicas que atuam sobre a pele. Em tendões, os fibroblastos arranjam-se tridimensionalmente formando colunas que se sobrepõem. Nas vilosidades intestinais, eles se apresentam sob a forma de uma rede densa e elaborada. Nos tecidos ósseos e cartilagosos, são responsáveis pela liberação da MEC que confere as características determinantes destes tecidos (ABRAHAM; KIERSZENBAUM, 2012).

A reepitelialização de lesões cutâneas, a proliferação e migração de queratinócitos e a recomposição da MEC são fortemente dependentes de fatores secretados por fibroblastos como interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 8 (IL-8), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e de queratinócitos (KGF) (GUERREIRO; COSTA; PEREIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

Fatores ambientais, químicos e físicos induzem perdas da capacidade proliferativa, da função e a morte de fibroblastos. Por exemplo, a intensidade e o tempo de exposição solar desidratam e degeneram os componentes do tecido conjuntivo dérmico, acarretando um turgor reduzido, enrugamento e elasticidade alterada, alterações estas compatíveis com o envelhecimento cutâneo (BORGES; SCORZA, 2016; KRUGLIKOV; SCHERER, 2016).

No envelhecimento, os fibroblastos encontram-se em número reduzido e as fibras colágenas são finas e as elásticas em processo de degradação (QUIN; BALIMUNKWE; QUAN, 2016; PATRIOTA; RODRIGUEZ; CUCÉ, 2011).

2.4 FISIOPATOLOGIA DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

O envelhecimento cutâneo é induzido por fatores genéticos (cronoenvelhecimento ou envelhecimento intrínseco) e fatores ambientais ou externos, especialmente representado pela exposição solar (fotoenvelhecimento, envelhecimento extrínseco ou actínico). É conhecido que os mecanismos celulares e moleculares destes fatores são iguais, ou seja, ocorre uma superposição dos efeitos biológicos aos agentes estressores extrínsecos sobre o envelhecimento intrínseco (LUCA et al., 2013).

Desta forma, destaca-se que o organismo como um todo passa por um processo de envelhecimento cronológico natural, afetando de forma simultânea todos os órgãos e tecidos, em virtude das células possuírem uma capacidade de multiplicação finita, conduzindo a senescência celular (DIHL; LEHMANN, 2011; KAMIZATO; BRITO, 2014).

Este envelhecimento intrínseco é lento e gradual, e é diretamente proporcional ao período já vivido. Caracterizado por apresentar baixa renovação celular e comprometimento

das respostas imunológicas, induzindo a sucessivas danificações das estruturas celulares. Além disso, ocorrem modificações na transcrição genética de inúmeras moléculas de DNA, proteínas e enzimas, tornando os tecidos ineficientes em suas funções (BENTO, 2015; BHATIA-DEY, et al., 2016).

O envelhecimento intrínseco geneticamente programado é denominado relógio biológico e está diretamente relacionado aos telômeros. Estas estruturas são constituídas por fileiras de proteínas e DNA, e funcionam como protetores para os cromossomos, impedindo recombinações e fusões das sequencias finais com outros cromossomos, auxiliam no reconhecimento de danos de DNA, participam da regulação da expressão genica, assegurando que a informação genética relevante seja perfeitamente copiada quando a célula se duplica. A cada divisão celular os telômeros sofrem um encurtamento e com isso a capacidade replicativa das células diminui até gerar a senescência celular e terminar em morte celular programada ou apoptose. O controle deste processo é responsabilidade de um complexo enzimático ribonucleoproteico chamado telomerase, com capacidade de sintetizar repetições teloméricas de DNA e recuperar a capacidade de divisão celular quando necessário (BORGES; SCORZA, 2016).

Este mecanismo de senescência, afeta diretamente os componentes da matriz dérmica pois age na expressão dos fibroblastos os quais permanecem em fase estacionária por um longo período de tempo na derme. Estes só irão proliferar quando existir uma estimulação ou se não ocorrer o encurtamento dos telômeros (ALDAG; TEIXEIRA; LEVENTHAL, 2016; HARRIS, 2011).

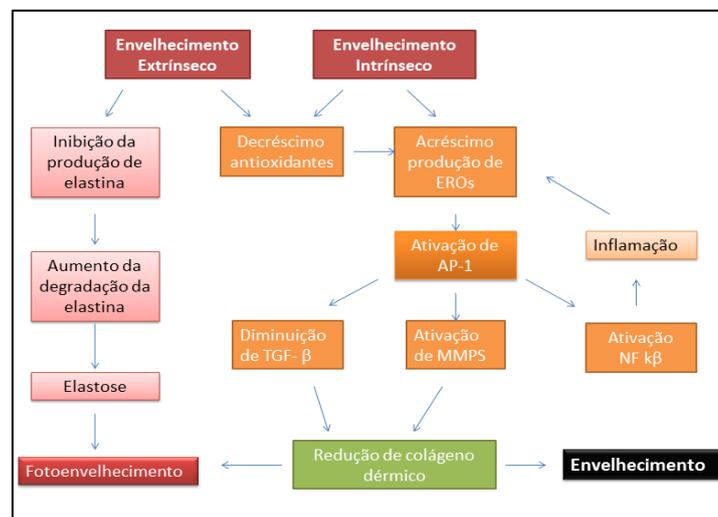
As células em senescência celular perdem a capacidade de divisão celular, ocorre redução ou ausência da atividade da telomerase e da sua capacidade antioxidante. Além disso, ocorre uma maior produção de EROs, devido inclusive a disfunção mitocondrial. No final do período de senescência, ocorre a morte celular por apoptose (LAGO, 2016; HÖHN et al., 2017).

A pele envelhecida intrinsecamente é atrófica, a junção dermo-epidérmica é achatada e atividade metabólica lenta. Ocorre o aumento do tamanho dos queratinócitos, perda da capacidade elástica por redução na atividade dos fibroblastos, resultando no aumento das linhas de expressão. É uma pele fina pálida, com rugas finas, ressecada, podendo apresentar neoplasmas benignos. Entre a terceira e sétima década de vida a taxa de renovação celular epidérmica decresce em 50% e a taxa de crescimento dos fibroblastos em torno de 30 a 50% (BORGES; SCORZA 2016; HARRIS, 2011; HÖHN et al., 2017).

Na pele as manifestações do envelhecimento são maiores e visivelmente detectadas em virtude do dano actínico gerado pelo contato com o meio externo. Este dano é desencadeado por um processo fotoquímico entre cromóforos cutâneos e a radiação ultravioleta com liberação de EROs, e uma cascata de sinalização de citocinas inflamatórias, aumento da expressão de receptores de superfície celular e de transcriptores, alterações na molécula de DNA resultando em encurtamento dos telômeros, e liberação de enzimas responsáveis pela degradação das estruturas que sustentam a pele. As células que apresentarem as membranas danificadas ficam sujeitas a apoptose e ao prejuízo no transporte ativo de substâncias, induzindo a danos nos sistemas biológicos (LAGO, 2016; RAPISARDA et al., 2017).

A exposição ambiental diária a agentes estressores incluindo a radiação ultravioleta (RUV) e o fumo, aumentam o estresse oxidativo. Isso resulta em danos nos tecidos, devido à depleção de antioxidantes associada ao aumento produção de EROS. Múltiplas vias bioquímicas que são desencadeadas por sobrecarga de EROS resultam na ativação da proteína ativadora 1 (AP-1), e consequente supressão do fator de crescimento transformador β de receptor II (TGF- β -R2), superexpressão de metaloproteinases de degradação da matriz (MMPs) que são collagenases, e no aumento da inflamação através do fator nuclear kappa β (NF-kB). Além disso, a RUV também causa danos diretos às proteínas estruturais da pele, conforme esquematização ilustrada na figura 6 (BHATIA-DEY et al., 2016; FABI; SUNDARAM, 2014; SOUZA, 2015).

Figura 6- esquematização da cascata indutora do envelhecimento intrínseco e extrínseco.



Fonte: Adaptado de Fabi; Sundaram (2014).

A desregulação da sinalização de TGF- β desempenha um papel proeminente na patogênese associada à MEC. Por exemplo, a regulação positiva da sinalização de TGF- β causa acúmulo anormal de proteínas nos tecidos afetados. Em contraste, a regulação negativa da sinalização de TGF- β regula negativamente a homeostase do colágeno e tem impacto significativo no envelhecimento do tecido conjuntivo resultando no afinamento da pele envelhecida (QUAN; FISHER, 2015; XU et al., 2018).

O avanço da idade e o acúmulo de danos extrínsecos promove o declínio das funções da pele, incluindo a redução na sua capacidade de agir como uma barreira protetora contra o ambiente e proporcionando uma pele mais seca (xerose). A interrupção da função de barreira epidérmica eleva os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro na pele (VELARDE, 2017).

A pele envelhecida por fatores extrínsecos, em contraste com a pele envelhecida intrinsecamente, é caracterizada por alterações de pigmentação (manchas da idade), rugas profundas, atrofia epidérmica com acúmulo de corneócitos resultando em um aspecto áspero, sem brilho ou aparência de couro. Além disso, ocorre a elastose caracterizada pelo acúmulo de elastina amorfa com elasticidade reduzida, as fibras de colágeno tornam-se espessas, fragmentadas e mais solúveis. Ainda ocorrem alterações no tecido subcutâneo com redução da vascularização e mudanças estruturais que também comprometem as funções e o aspecto da pele (ALDAG; TEIXEIRA; LEVENTHAL, 2016).

A maioria dos fatores que causam o envelhecimento precoce da pele, é decorrente da ação do estresse oxidativo gerado pelo excesso de exposição aos fatores ambientais (COLE et al., 2018; LAGO, 2016; VELARDE, 2017).

2.4.1 Papel do Metabolismo oxidativo e inflamatório no envelhecimento cutâneo

O envelhecimento celular, conforme já relatado anteriormente, pode ser explicado pela teoria dos radicais livres ou espécies reativas, a qual se baseia no envelhecimento induzido pelos efeitos deletérios nas organelas celulares, causados pelas EROs, produzidas principalmente na mitocôndria, onde ocorre o metabolismo aeróbico (ANDRISIC et al., 2018; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010; HARRIS, 2011).

O metabolismo aeróbico oxidativo é um processo bioquímico no qual o oxigênio é utilizado para a produção de energia (PERL, 2013). Durante o metabolismo oxidativo ocorre a geração de EROs, em um processo contínuo e fisiológico, com funções biológicas relevantes como na participação da fertilização do óvulo e nos mecanismos de defesa do organismo porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010).

No interior das mitocôndrias, o oxigênio passa pela cadeia transportadora de elétrons gerando adenosina trifosfato (ATP), ou seja, energia metabólica. Entretanto, a redução do oxigênio é incompleta e conduz à geração de diferentes EROs, tais como o radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), considerado o principal contribuinte para danos oxidativos (VITALE et al., 2013). O H_2O_2 é capaz de originar outras EROs, principalmente o radical hidroxila (OH^-), que por ter uma meia vida bastante curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*., ainda, sobre o OH^- este apresenta grande afinidade com o DNA, causando danos (ANDRISIC et al., 2018; BARBISAN, 2014; PERL, 2013).

H_2O_2 é extremamente instável e pode permear através das membranas lipídicas. Adicionalmente, o H_2O_2 também pode ser convertido em OH^- na presença de íons ferro (Fe^{2+}) ou cobre (Cu^{2+}) através da reação de Fenton. Os íons metálicos de transição, ferro e cobre, também catalisam a reação entre O_2^- e H_2O_2 , gerando OH^- , na reação de Haber-Weis (BARANDALLA et al., 2018; CHEN; HU; WANG, 2012).

O radical OH^- é uma das EROs mais instáveis dos sistemas biológicos, pois é capaz de reagir com diversas biomoléculas como DNA, enzimas, proteínas e aminoácidos. Também pode reagir com fosfolipídeos de membrana, promovendo a sua desorganização, formando radicais alcóxila (LO^-), radical peróxila (LOO^-), e hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$), precursores da peroxidação lipídica (CADET; WAGNER, 2016; SOUZA, 2015). O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais produzidos propagam-se até destruírem a si próprios levando à ruptura de sua estrutura, decaimento na troca de metabólitos e, numa condição de excesso de lesão oxidativa ocorre a apoptose celular. A peroxidação lipídica pode ser medida através do teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) (ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2013; FURUKAWA et al., 2017).

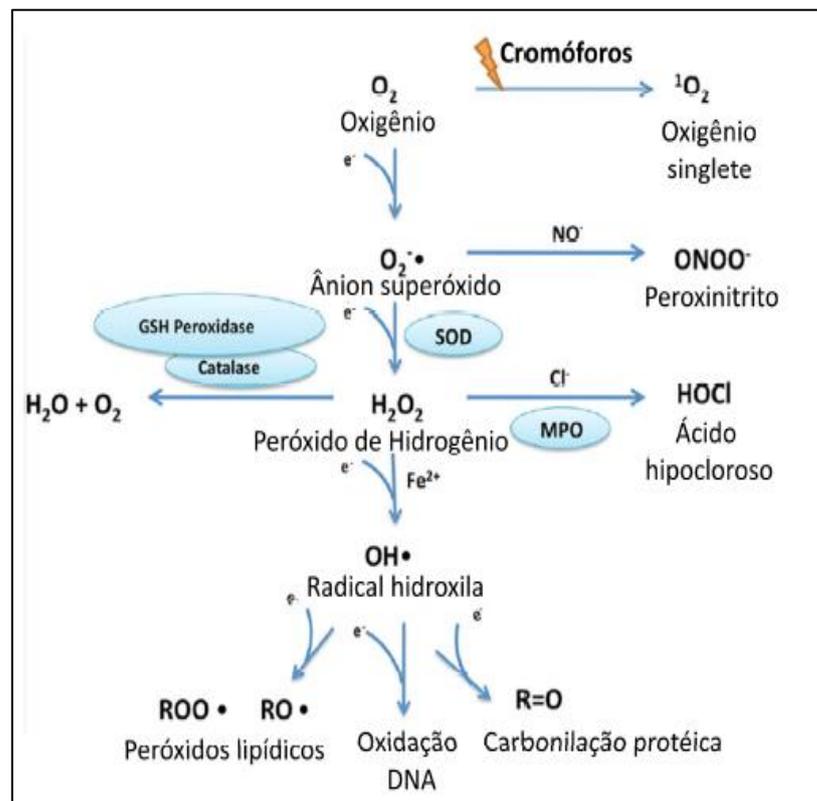
Os danos causados as estruturas das proteínas levam a fragmentação das cadeias polipeptídicas, à formação de ligações proteína-proteína e à modificações nos aminoácidos das cadeias laterais. Como consequência destas reações, podem ocorrer perdas na atividade enzimática, dificuldades no processo de transporte ativo, citólise e morte celular. A carbonilação de proteínas é um biomarcador para avaliar danos oxidativos em proteínas ocasionado pelas EROs. Refere-se a uma modificação proteica irreversível e não enzimática (SIES; BERNDT; JONES, 2017; VESKOUKIS; TSATSAKIS; KOURETAS, 2011).

Cabe destacar aqui, que as EROs são fundamentais para a sobrevivência dos organismos e que níveis basais de espécies reativas são importantes para a manutenção da homeostase do organismo, já que EROs como o H_2O_2 e o óxido nítrico (ON) atuam como sinalizadores celulares de proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação celular

(MACHADO, 2014). Entretanto, níveis elevados de EROs podem causar danos a células, tecidos e consequentemente perturbar a homeostase do organismo. Assim, os seres humanos contam com 2 sistemas principais de defesa antioxidante: o exógeno e um endógeno. O sistema exógeno é adquirido via alimentação através do consumo de moléculas bioativas, essas molécula ainda contribuem para o melhor funcionamento do sistema endógeno, que é composto por enzimas antioxidantes com destaque para: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPX) (KURUTAS, 2016; MONTAGNER, 2010).

Os antioxidantes enzimáticos, são a principal forma de defesa contra as EROs pois têm por finalidade catalisar as reações para neutralizar as mesmas, produzidos durante o metabolismo da respiração aeróbica e da oxidação de substratos. A primeira linha de defesa da célula contra o excesso das EROs tem a ação detoxificadora dos agentes oxidantes, antes que eles causem lesões. É constituída pela SOD, que catalisa a reação de O_2^- em H_2O_2 , por sua vez a CAT, a glutathiona reduzida e a GPX catalisam a degradação de H_2O_2 em H_2O (água). Essas enzimas são capazes de neutralizar os agentes oxidantes, e mantê-los em níveis adequados no organismo (NEVES et al., 2014). A reação em cadeia da geração de EROs está representada na figura 7 abaixo.

Figura 7 - representação esquemática da cadeia de geração de EROs.



Fonte: (Souza, 2015).

Quando a geração de EROS aumenta e/ou as defesas antioxidantes sofrem decréscimo instaura-se o estresse oxidativo. A exposição aguda a RUV por exemplo, elimina a atividade da catalase na pele e aumenta oxidação proteica. Estima-se que entre todos os fatores ambientais, a RUV contribui com até 80% e é o fator ambiental mais importante na desenvolvimento de câncer de pele e envelhecimento da pele. O mecanismo primário pelo qual a RUV inicia as respostas moleculares na pele humana é via ativação de cromóforo e geração fotoquímica de EROS principalmente formação de O_2^- , H_2O_2 , OH^- e oxigênio singlete (1O_2), também representado na figura 7 acima. A RUV penetra na pele, alcança as células e é absorvido pelo DNA, levando à formação de fotoprodutos que inativam as funções do DNA (POLJSAK; DAHMANE, 2012).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo está intimamente associado ao processo de envelhecimento e morte celular por apoptose. As EROs têm sido consideradas pré-requisito para o processo inflamatório e apoptótico, sendo assim, o estresse oxidativo teria um papel central no processos de envelhecimento celular, além de patologias e perda da homeostase do organismo (BRAND et al., 2016; CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; SINHA et al., 2013).

O processo inflamatório é uma reação do organismo frente a uma infecção ou a qualquer lesão tecidual. Uma vez que a pele está constantemente exposta aos fatores agressores do meio externo como RUV, poluição, ente outros, esta sofre com sucessivas agressões indutoras de inflamação. Na formação deste processo, inicialmente ocorre uma vasoconstrição reflexa seguida por vasodilatação, eritema, calor e dor. (MCMORROW; MURPHY, 2011). A vasodilatação induz ao aumento da permeabilidade vascular, permitindo a infiltração de líquidos nos tecido locais, promovendo à formação do edema, elevando a hipersensibilidade e tensão da pele e causando a liberação de mediadores químicos para o local (HAN; ROAN; ZIEGLER, 2017; ZIMMERMANN et al., 2011).

Os mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias, IL-1, fator de necrose tumol alfa (TNF- α) e interferon gama (INF- γ) e anti-inflamatória como a IL-10 são tipicamente produzidos pelos macrófagos e, ainda por células epiteliais, endoteliais ou fibroblastos. O TNF- α e a IL-1 irão atrair mais neutrófilos para o local, assim como ativá-los. Os linfócitos promovem a ativação de macrófagos levando-os a secretar proteases e citocinas como a IL-6 e INF- γ o que ativará outras células formando assim, um ciclo de recrutamento e ativação celular (CARNEIRO et al., 2011; CZEMPLIK, 2017; GUERREIRO; COSTA; PEREIRA, 2011).

O TNF- α age em diferentes partes do corpo, sendo considerada uma das citocinas mais importantes relacionadas aos processos inflamatórios e imunes. O efeito fisiológico principal do TNF- α é produzir e ativar a resposta imune e a inflamatória por conta do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los (ANDRÉ; TOFALINI, 2008; RAMBO, 2013).

Quando liberado em pequenas concentrações, o TNF- α , atua nas células endoteliais gerando vasodilatação e estimulando-as a secretarem um grupo de citocinas que atuam de forma quimiotática em relação aos leucócitos, produzindo, desta forma, um processo inflamatório local que permite o combate a quadros infecciosos (HAN; ROAN; ZIEGLER, 2017; RAMBO, 2013).

O IFN- γ é uma citocina que tem efeito supressivo mediado por células do sistema imunológico, e com importante propriedade imunossupressora, regulando a resposta imune mediada por células (PORTELLA, 2011).

A IL-6 é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Esta interleucina estimula os hepatócitos a produzir ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para produção de proteínas de fase aguda. É sintetizada por monócitos, fibroblastos, células endoteliais, células em resposta a microrganismos e à estimulação por outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF- α (SOUZA et al., 2008).

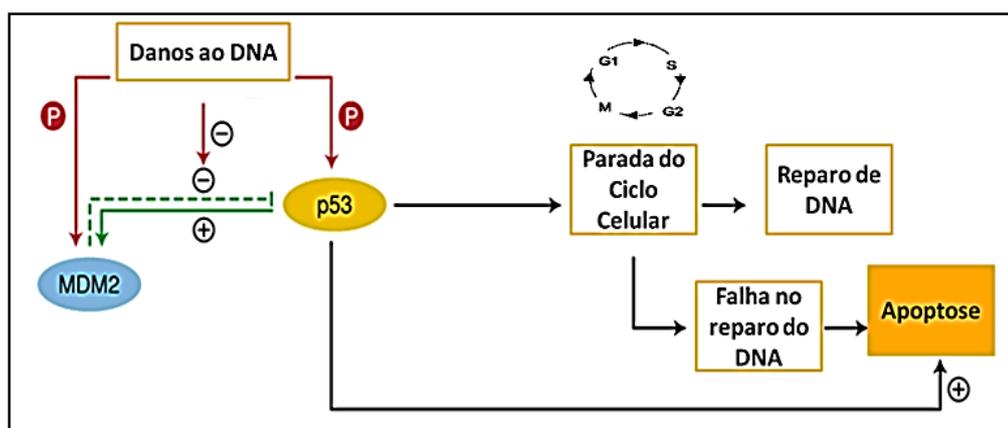
As citocinas atuam principalmente por duas vias: por estimulação dos níveis de NF- κ B no citoplasma ou por aumento dos níveis de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) nas células. A ativação da família das MAP quinases na pele resulta no aumento da transcrição do fator de transcrição c-jun, que juntamente com o fator de transcrição constitutivamente expresso, c-Fos, formam o complexo AP-1. O AP-1 é necessário para ativação das MMPs, as quais são responsáveis pela degradação de colágeno e fibras elásticas da derme (HAN; ROAN; ZIEGLER, 2017; SOUZA, 2015).

Portanto, a neutralização e remoção dos agentes que causam a inflamação e/ou o estresse oxidativo, auxilia o sistema imune numa resposta positiva, capaz de resolver o processo, caso contrário, como resposta ao dano de DNA celular sofrido, várias respostas celulares são induzidas, como a ativação transcricional do gene p-53 (proteína supressora de tumor) que afeta diretamente o ciclo celular e induz a cascata apoptótica (CADET; WAGNER, 2016).

2.4.2 Marcadores apoptóticos

A proteína p-53 participa da regulação do ponto de checagem de G1 do ciclo celular, que tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose. Danos no DNA promovem a superexpressão e consequente ativação da p-53, resultando na parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA. Depois de realizado o reparo, a p-53 aumenta a transcrição da proteína MDM-2 (do inglês, *murine double minute 2*), que age como inibidora da p-53. A proteína MDM-2 se associa à p-53, revertendo o bloqueio do ciclo celular e promovendo o avanço para a fase S. Quando os danos ao DNA não são passíveis de reparo, ocorre a ativação da apoptose. Mutações no gene p-53 resultam em um descontrole do ponto de checagem de G1, possibilitando que células danificadas progridam para a fase S sem reparar as lesões, ou entrar em apoptose, conforme ilustrado na figura 8 (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; SOUZA, 2015).

Figura 8 - Mecanismos de reparo ou indução de apoptose via ativação de p-53. O que resulta em uma diminuição nos níveis estacionários do p53 são indicados com setas verdes e aqueles que resultam em aumento dos níveis de p53 são indicados com setas vermelhas.



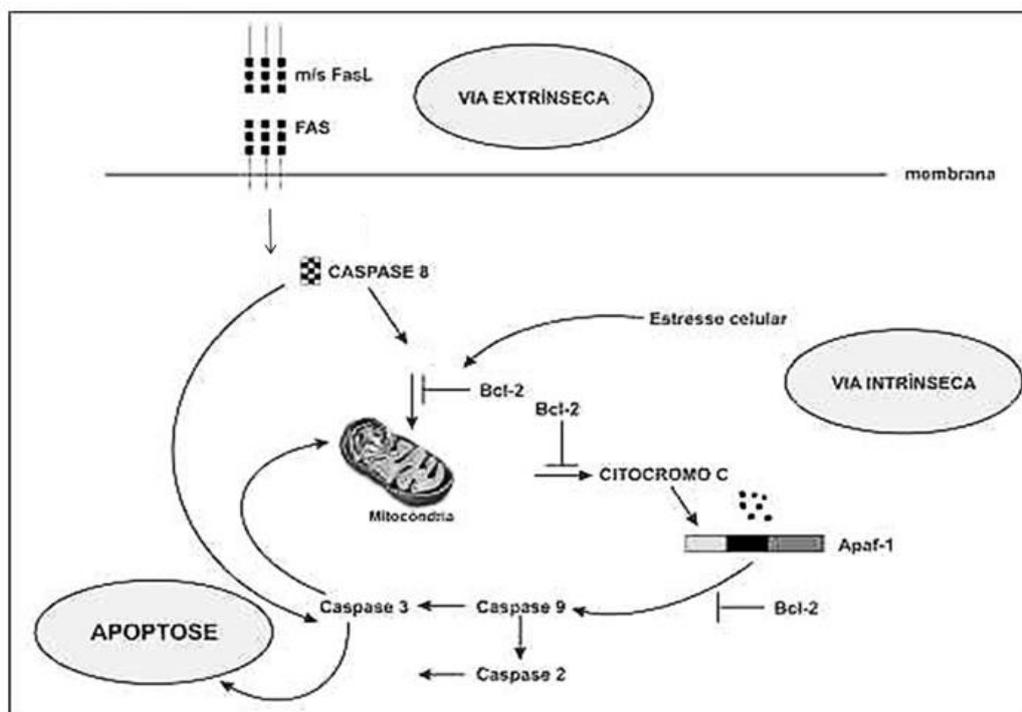
Fonte: Adaptada de Theobald; Offringa (2003).

Os principais danos detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos álcali-lábeis, crosslinks e quebras resultantes de reparo por excisão. As EROs provocam no DNA danos nas bases nitrogenadas, purínicas e pirimidínicas, no açúcar desoxirribose e nas ligações cruzadas DNA-proteína. Estas lesões estão associadas à formação de mutações e perda da integridade do DNA. Quando o excesso de -OH atinge a base guanina, esta se

transforma em uma base modificada denominada 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG). O 8-OHdG é o biomarcador de maior relevância na avaliação do dano oxidativo ao DNA. Se o dano de DNA não pode ser reparado, esta célula é induzida para apoptose (LEUNG et al., 2017; VESKOUKIS, TSATSAKIS; KOURETAS, 2011).

O ativador da apoptose na via intrínseca é o citocromo c, o qual responde a alterações mitocondriais, alterações de transporte elétrico, perda de potencial transmembrana, lesão por óxido-redução e, ainda, à participação pró e anti-apoptótica da família de proteínas *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) ou a lesões do DNA celular resultantes de toxicidade ou radiação. Os ativadores da via extrínseca são da família do TNF e se ligam ao receptor TNF-R1 e à via do Fas. O TNF-R1 inicia o processo apoptótico ao se ligar ao receptor TNF de morte (TRADD) e à Fas-proteína de morte (FADD). O receptor Fas se liga ao Fas-L, outro componente do grupo do TNF. A formação do complexo Fas e Fas-L resulta na ativação das caspases, conforme figura 9 (FRANCISCHETTI et al., 2010).

Figura 9 - Mecanismos intrínsecos e extrínsecos de ativação da apoptose celular via cascata de caspases.



Fonte: Adaptado de Francischetti et al. (2010).

As caspases sinalizam para a apoptose e clivam os substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos. São conhecidas 14 caspases humanas. Estas

promovem apoptose por: indução de enzimas destrutivas, como DNAses; liberação de citocromo C; e destruição das principais proteínas estruturais e regulatórias (JERONIMO, 2016).

As caspases envolvidas neste processo são subdivididas em via ascendente (iniciadoras) e via descendente (efetoras), de acordo com o comprimento dos seus predomínios. As caspases longas (1, 2, 8, 9 e 10) atuam como iniciadoras e as caspases curtas (3, 6 e 7) são efetoras (FUKUOKA et al., 2017).

Uma vez ativadas, as caspases efetoras podem clivar uma ampla gama de alvos celulares e, finalmente, causar apoptose em diversos tipos celulares. Esta transformação leva a clivagem de substratos de morte diferentes, que por sua vez conduzem a alterações morfológicas típicas da apoptose (VASCONCELOS, 2017).

O controle e ativação das cascatas de caspases são cruciais para vários processos celulares envolvidos na diferenciação celular e homeostasia. As proteínas inibidoras da apoptose são proteínas celulares que atuam na regulação da cascata das caspases, inibindo as caspases iniciadoras e as efetoras (CESCATO, 2010).

Um corpo crescente de dados afirma que a cascata da caspase está envolvido na execução da apoptose. Assim, o controle da atividade das caspases mostra-se como um potencial terapêutico, entendendo-se que o insucesso no reparo aos danos de DNA, ou a falha no processo de morte celular programada, perpetua e amplifica as mutações nas células e pode levar a danos irreversíveis e ao processo de carcinogênese cutânea (FRANCISCHETTI et al., 2010; JERONIMO, 2016; SOUZA, 2015; VASCONCELOS, 2017).

2.4.2 Atuação dos fatores de crescimento na manutenção da integridade cutânea

No processo de reparação tecidual os fatores de crescimento (FC) desempenham papel fundamental por estimularem e ativarem a proliferação celular, a angiogênese, a mitogênese e a transcrição genética. Os FCs agem de maneira a inibir ou estimular a expressão gênica das células alvo lesionadas. Ao transmitirem sinais modulatórios, regulam os processos de crescimento estimulantes e inibidores, tais como os de proliferação, diferenciação, migração e aderência. Atuam também promovendo a quimiotaxia celular, sendo capazes de induzir a migração de diversas células, além de estimular a angiogênese e a síntese da MEC (CARVALHO, 2016).

Os principais FCs envolvidos no reparo tecidual são o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), fator de

crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) (BORGES; SCORZA, 2016; CARVALHO, 2016; THOMSON et al., 2018).

Os FGF são secretados pelos macrófagos, fibroblastos, mastócitos e células endoteliais (SZWED; SANTOS, 2015). O FGF-1 está envolvido com a proliferação e diferenciação de osteoblastos e inibição de osteoclastos, promovem migração celular e angiogênese, além de ser um agente mitótico para queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais vasculares. Já o FGF- 2 está envolvido com o crescimento de fibroblastos, mioblastos, células endoteliais e queratinócitos, aumento da produção de fibronectina, estimulação da angiogênese, proliferação de células endoteliais, síntese de colágeno, síntese da matriz e retração de feridas (CARVALHO, 2016; FABI; SUDARAM, 2014).

O KGF é uma citocina altamente específica que exerce efeitos mitogênicos no epitélio celular e tem sido relatada como um fator chave no processo de cicatrização por atuar como protetor de células epiteliais contra dano e por desempenhar um papel importante na reparação de células danificadas (YANG et al., 2018; YU et al., 2017).

2.5 TERAPÊUTICA NO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

Á medida que a expectativa de vida mundial aumenta, cresce também o interesse pelo retardamento dos danos promovidos pelo envelhecimento. O conceito de beleza atualmente em vigor e procurado pela maioria das pessoas é o da pele jovem, sem manchas, ou rugas. O envelhecimento tem mecanismo fisiológico específico e acomete visivelmente a pele, trazendo alterações inestéticas e funcionais atingindo diretamente a imagem dos indivíduos. Dentre os recursos terapêuticos utilizados atualmente para tratamento ou amenização destas alterações destacam-se os *peelings*, a luz intensa pulsada, a radiofrequência, o uso de cosméticos rejuvenescedores, o microagulhamento, entre outros (AGNE, 2017; BORGES; SCORZA, 2016; PEREIRA, 2013).

No entanto, poucos estudos são realizados com o objetivo de buscar alternativas que além de terapêuticas possam atuar na prevenção destes danos, com ação reparadora e citoprotetora. Neste sentido, credita-se que o LBP por seus efeitos reparadores, aliados aos efeitos antioxidantes, citoprotetores do Guaraná (*Paullinia cupana var. sorbilis Mart kunth*) já investigados, possam representar novas alternativas terapêuticas para a amenização do envelhecimento cutâneo (YONEKURA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

2.5.1 Laser de baixa potência

O Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é um tipo de energia luminosa que apresenta características e propriedades precisas como a monocromaticidade, a coerência e a polarização, podendo ser dividido, de acordo com seu comprimento de onda, em laser de alta, média ou baixa potência para uso em diferentes patologias (AGNE, 2013; BELYKH et al., 2017). A diferença entre os vários tipos de lasers é dada pelo comprimento de onda, quanto maior o comprimento de onda, maior seu poder de penetração, podendo ser emitido de forma contínua ou pulsada. O comprimento de onda do LBP capaz de fornecer um resultado significativo na regularização das funções celulares está entre 620 e 860 nm, correspondendo a emissão de luz vermelha e infravermelho. Sendo que, os LBPs vermelhos são mais indicados para tratamentos da pele, devido a sua interação direta com células epidérmicas e dérmicas incluindo fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (RAMBO, 2013).

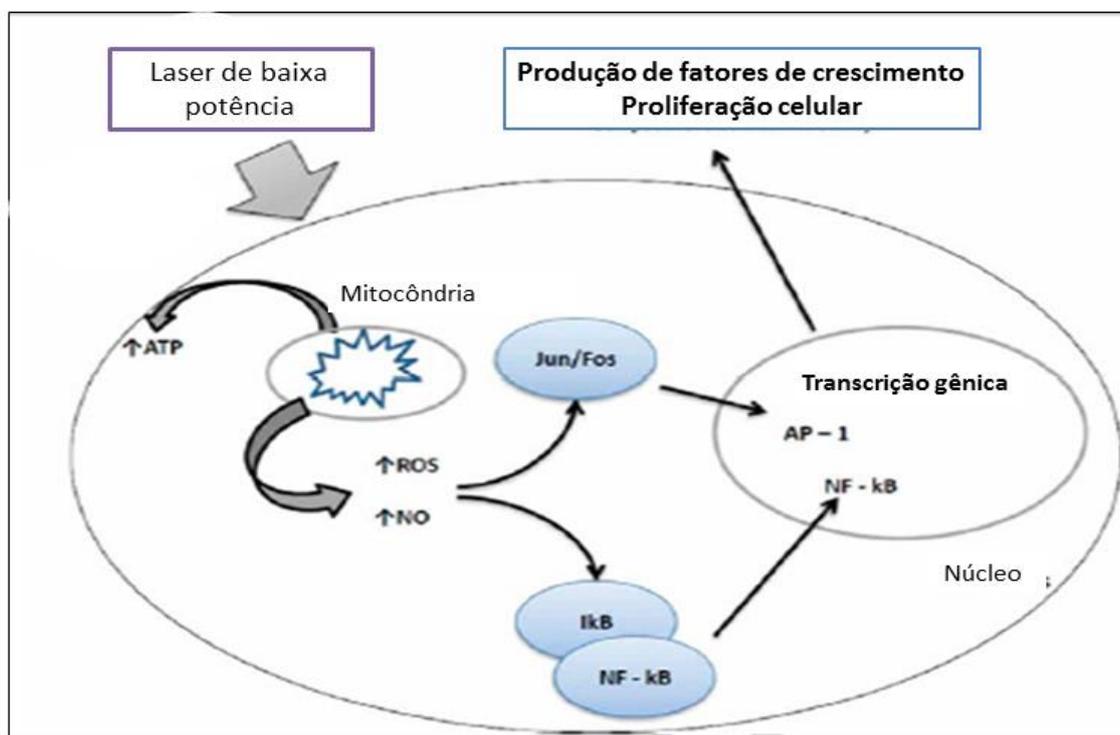
Sua potência é expressa em watts (W), variando de deciwatts a megawatts e a energia ou dose medida em joules por centímetro quadrado (J/cm²), sendo igual à potência multiplicada pelo tempo de aplicação. Os efeitos gerados quando esta energia é depositada nos tecidos são chamados de fotobiomodulação (LINS et al., 2010; AGNE, 2013).

2.5.1.1 Fotobiomodulação

A fotobiomodulação começa quando uma molécula adequada, conhecida como cromóforo, absorve um fóton da energia luminosa com um comprimento de onda adequado e um elétron entra em estado de excitação. Um cromóforo é uma molécula que dá uma cor a um composto e inclui hemoglobina, oxiemoglobina, mioglobina, citocromos, flavina, flavoproteínas, porfirinas e melanina. Em muitos casos, o cromóforo alvo é a enzima citocromo C oxidase (CCO) contendo ferro e cobre, localizada na cadeia respiratória mitocondrial. A excitação da CCO resulta em aumento da produção ATP, NADH, RNA e um aumento da respiração celular. Outros efeitos incluem aumento das enzimas antioxidantes CAT e SOD, aumento da liberação de NO, e aumento da produção de EROs, conforme ilustrado na figura 10 (SILVEIRA et al., 2008; PINTO, 2011; NESTOR et al., 2017). Entretanto, ressalta-se que, dependendo da dose, do comprimento de onda, do tempo de exposição e do tipo de tecido, a laserterapia pode interferir de diferentes formas sobre os

mecanismos de defesa antioxidante e de reparo tecidual (SILVA et al., 2016; BELYKH et al., 2017).

Figura 10 - Efeitos do laser de baixa potência por ativação do cromóforo CCO mitocondrial. Ativação da produção de ATP e liberação de EROS que atuam como sinalizadoras de transcrição gênica.



Fonte: Adaptado de NESTOR et al. (2017).

Ressalta-se que os efeitos da irradiação com LBP são dependentes da absorção molecular de sua energia e da transformação desta em certos processos biológicos. Ao entrar em contato com o tecido, a energia depositada nele é absorvida por meio dos cromóforos, resultando em ações primárias (diretas), que desencadeiam as ações secundárias (indiretas). Como ações diretas destacam-se os efeitos locais na síntese de ATP, DNA e proteínas, na normalização da membrana e no restabelecimento funcional já citados acima; enquanto que as ações indiretas estão relacionadas com efeitos sistêmicos como estímulo da microcirculação e efeitos anti-inflamatórios por redução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-2 e IL-6 (LINS et al., 2010; PIVA et al., 2011; AGNE, 2013; SILVA et al., 2016).

Os efeitos secundários são resultados da amplificação da resposta a energia luminosa e da transmissão desta resposta para outras partes das células, resultando em efeitos fisiológicos, como alterações na permeabilidade da membrana celular, no aumento do metabolismo celular, síntese de DNA e de RNA, aumento da proliferação de fibroblastos,

ativação de linfócitos T, macrófagos e mastócitos, aumento da síntese de endorfinas e diminuição de bradicinina (CHAVES et al., 2014; YUN; KWOK, 2017).

No entanto, para a obtenção de um bom resultado terapêutico é necessário um correto diagnóstico da patologia aliado a escolha do recurso apropriado. Na laserterapia com LBP é importante conhecer a densidade energética a ser depositada, a forma correta de depositá-la, a reação fotobiológica desejada, a frequência de pulso e o número e frequência de aplicações. A densidade de energia (dose) que é depositada sobre a área tratada para efeito de bioestimulação, conforme a maioria dos estudos já realizados, deve permanecer entre 1 J/cm² e 6 J/cm² (AGNE, 2013; PEREIRA, 2013; SZEZERBATY et al., 2018). Para Piva et al. (2011), as dosagem terapêuticas indicadas podem variar entre 1,8 a 16 J/cm², sendo as doses mais baixas, até 8 J/cm², indicadas para ação anti-inflamatória e cicatrizante e as doses mais altas para efeitos inibitórios.

O estudo de Ginani et al. (2017), investigou os efeitos do LBP na proliferação e viabilidade de células-tronco de dentes humanos utilizando como parâmetros laser de 660 nm, 30 mW, comparando as doses de 0,5 J/cm² e de 1,0 J/cm². O estudo concluiu que a dose de 1,0 J/cm² foi mais eficaz em promover a proliferação de células-tronco dentárias e a manutenção da viabilidade celular, quando comparado com o controle e a dose mais baixa.

A fototerapia na dose correta estimula a expressão de IL-6, a proliferação celular e a migração celular em células de feridas diabéticas estudadas *in vitro*. A dose de 5 J/cm² estimula a cicatrização de feridas diabéticas, enquanto 16 J/cm² é inibitória e indutora de dano (HOURELD; ABRAHAMSE, 2007).

O LBP (660 nm) com dose de 5 J/cm² modula a viabilidade celular, regula a expressão do VEGF e diminui a expressão de IL-6 e do RNA mensageiro em cultura de células de fibroblastos L929 em estudo *in vitro* (SZEZERBATY et al., 2018).

Um estudo recente avaliou o efeito da irradiação com LBP de 660nm em glândulas submandibulares de ratos modelos de diabetes, e verificou uma redução significativa na expressão dos biomarcadores de apoptose (CASP-3), bem como uma diminuição dos níveis da proteína p-53, o que sugere uma ação do LBP no controle da apoptose induzida pelo diabetes (FUKUOKA et al., 2017).

Destaca-se ainda que os efeitos do LBP mais documentados são a remodelação de tecidos cicatriciais, a diminuição do processo inflamatório, o estímulo da síntese de colágeno e epitelização, a reparação de fraturas e de feridas cutâneas em estudos desenvolvidos em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (BORGES; SCORZA, 2016; PINTO, 2011; RAMOS et al., 2018). É importante ressaltar que a aplicação do LBP é absolutamente contraindicada na

região do globo ocular, em tecidos neoplásicos e útero gravídico; e relativamente contraindicada em casos de hemorragias, neuropatias, infecções e em gônadas (CHRISTOFOLETTI et al., 2010).

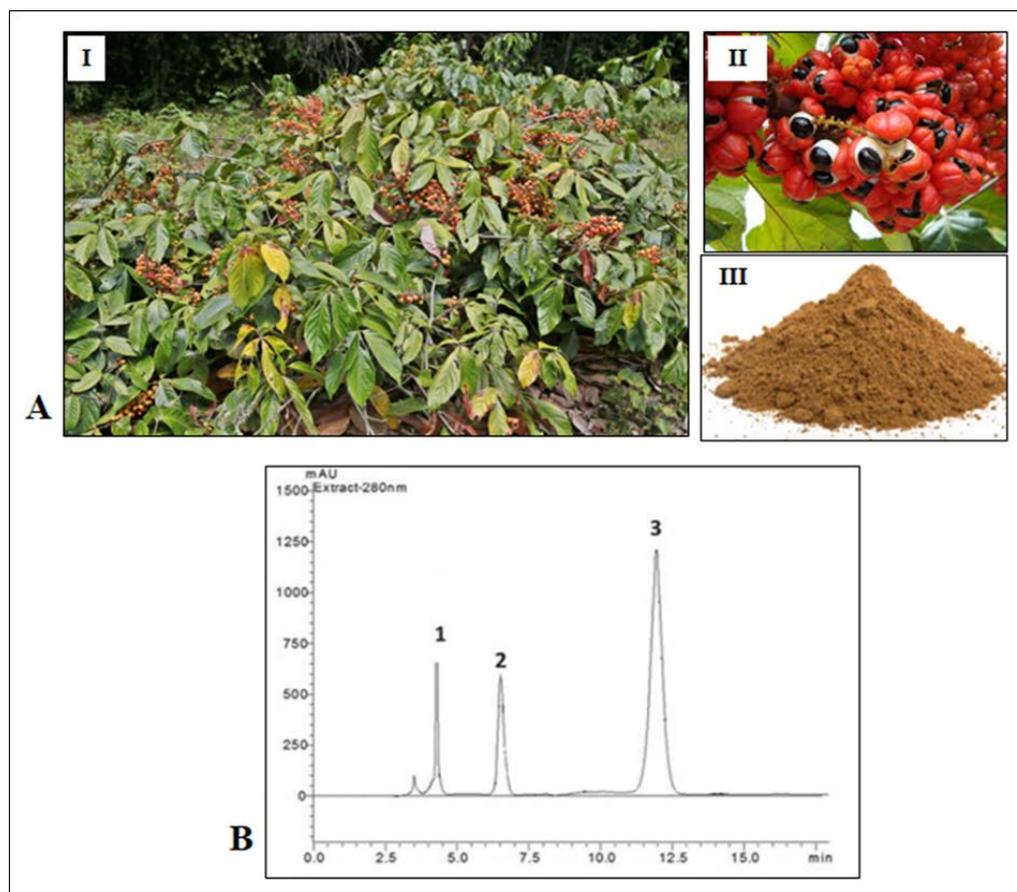
Estão sendo realizados estudos associando o LBP com produtos naturais que induzam uma melhor regeneração tecidual com o objetivo de apoiar e acelerar o tratamento e assim ampliar as respostas celulares. Como exemplo estudo de Catarino et al. (2015), verificou que a aplicação do LBP (670 nm, dose de 4,93 J/cm²) isolado ou combinado com o extrato de *Solidago chilensis* (popularmente conhecida como arnica brasileira), promoveu respostas favoráveis no reparo tecidual de queimaduras de segundo grau em um modelo experimental animal. E, mas recentemente estudo *in vitro* realizado por Carvalho e colaboradores (2018), demonstrou que a associação do LBP (660nm e dose de 3 J/cm²) com o *Aloe Vera* atuou favoravelmente na viabilidade celular de fibroblastos de polpa dental e no controle microbiano aparecendo como uma terapia alternativa para tratamento endodôntico intracanal.

Em vista disso, Catarino et al. (2015), sugerem que o LBP possa ser utilizado sinergicamente com outras terapias para proporcionar maior rendimento de resultados, com segurança, baixo custo e reduzindo a necessidade de procedimentos médicos mais invasivos.

2.5.2 Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart)

O guaraná é uma planta pertencente a família *Sapindaceae*, nativa da bacia Amazônica, comumente utilizado na medicina tradicional. Na natureza, cresce como uma trepadeira lenhosa que pode alcançar 10 m de comprimento, mas quando em ambientes domésticos cresce como um arbusto atingindo cerca de dois a três metros em altura. Tem uma característica fruta de cor vermelha que quando madura abre parcialmente, exibindo até três sementes (figura 11). Extratos de sementes torradas têm sido usados em medicamentos e bebidas, desde os tempos pré-colombianos, como estimulantes, afrodisíacos e tonificantes (KREWER et al., 2011; MACHADO et al., 2015; PEIXOTO et al., 2017).

Figura 11 - Guaraná. A-partes do guaraná I-planta, II-sementes, III-pó das semestres. B- Cromatografia do extrato hidroalcoólico exibindo 3 picos principais: 1-teobromina, 2-catequinas, 3-cafeína.



Fonte: (Barbisan, 2017).

O guaraná é um alimento da dieta brasileira com alto potencial fitoterápico, principalmente por ser rico em xantinas e catequinas. Esta afirmativa está baseada em pesquisa prévia realizada por Angelo et al. (2008) que investigou o transcriptoma do guaraná e identificou uma grande quantidade de transcritos de compostos bioativos presentes no guaraná que são similares aos encontrados na *Camelia sinensis* (chá-verde).

A constituição química do guaraná é bastante complexa, e dentre os componentes estão alcaloides, como teofilina, cafeína, teobromina, há ainda terpenos, flavonoides e amidas, além de saponinas, gorduras, amido, colina e pigmentos. Bittencourt e colaboradores (2013), analisaram a composição química do guaraná proveniente de Maués-Amazonas, via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e os principais compostos bioativos encontrados no guaraná foram cafeína = 12.240 mg/g, teobromina = 6.733 mg/g e catequinas = 4.336 mg/g.

Acredita-se que, na composição química bastante rica em compostos com reconhecidas atividades benéficas a saúde esteja a chave para as diversas ações farmacológicas já comprovadas cientificamente como: atividade antioxidante (KREWER et al., 2011; MACHADO et al., 2015), antiplaquetária, anti-inflamatória (KREWER et al., 2014), energética (CAMPOS et al., 2011), termogênica (SULLEIMAN et al., 2016), antiobesogênica, hipolipídica, na modulação neuro-cognitiva (DALONSO; PETKOWICZ, 2012), antibacteriana e antifúngica (BASILE et al., 2005; YAMAGUCHI-SASAKI et al., 2007), antitumoral (HERTZ et al., 2015), redução dos níveis de LDL-oxidado e doenças cardiovasculares (PORTELA et al., 2013), citoprotetor (KOBBER et al., 2016), efeito antidepressivo a longo prazo (OTOBONE et al., 2005), efeito protetor frente a toxicidade do metilmercúrio (ARANTES et al., 2016).

Além disso, estudo realizado por Machado e colaboradores (2015), analisou a ação da suplementação de guaraná na senescência das células adiposas mesenquimais (ASC), obtidas a partir de lipoaspirados humanos, e se essa ação envolveria a regulação diferencial do metabolismo de oxidação celular. As células ASC senescentes receberam um suplemento de guaraná de 5 mg / mL na oitava passagem, ou seja, quando perderam aproximadamente 25% de sua capacidade proliferativas. Estas células mostraram uma melhora em sua proliferação bem como diminuição dos marcadores de estresse oxidativo após o tratamento.

Os efeitos antioxidantes do extrato de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart.) sobre NO e outros compostos gerados a partir da degradação do nitroprussiato de sódio (SNP) em cultura de fibroblastos embrionários (células NIH-3T3) foram avaliados, em estudo de Bitencourt et al. (2013), verificando que os compostos bioativos do guaraná reverteram a toxicidade do SNP principalmente em concentrações mais baixas (<5 mg), o que diminuiu a mortalidade celular, a peroxidação lipídica, o dano ao DNA e a oxidação celular, bem como aumentou os níveis de SOD.

Ainda, quando testado no modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*, um nematódeo, o extrato aquoso de sementes de guaraná torrado melhorou a resistência contra o estresse oxidativo, aumentou a vida útil e atenuou os marcadores de envelhecimento, tais como declínio da atividade muscular relacionada com a idade (PEIXOTO et al., 2017).

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO METODOLÓGICO EXPERIMENTAL GERAL

Foi realizado um estudo de caráter experimental *in vitro* utilizando a linhagem celular de fibroblastos humanos (HFF-1/ATCC® SCRC-1041™), originárias da ATCC- *The American Type Culture Collection* e descongeladas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro.

Os fibroblastos foram cultivados em incubadora apropriada saturação 5% de CO₂ á 37°C. Cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco modification of Minimum Essential Media*) suplementado com 15% de soro bovino fetal, 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e 1% de antifúngico (anfotericina B).

As células foram cultivadas por 50 dias para adquirirem estado senescente, para que então os experimentos fossem realizados.

Inicialmente foram realizadas as curvas de concentração/efeito para escolha dos melhores concentrações ou doses a serem utilizados de:

- LBP: doses de 3, 4, 5, 6 e 8 J/cm² (PIVA et al., 2011; SZEZERBATY et al., 2018).
- H₂O₂: Concentrações de 1, 10, 25, 50 e 100 µM (SAGRILLO, 2014).
- Guaraná: Concentrações de 1, 3, 5, 10, 30 mg/mL (MACHADO et al., 2015).

Foram realizadas análises de proliferação celular, citotoxicidade e marcadores inflamatórios, para definição das concentrações de escolha. Uma vez definidas as concentrações foram realizados os experimentos.

Manuscrito 1 tratamentos:

- a) Controle negativo
- b) H₂O₂
- c) LBP
- d) H₂O₂ + LBP

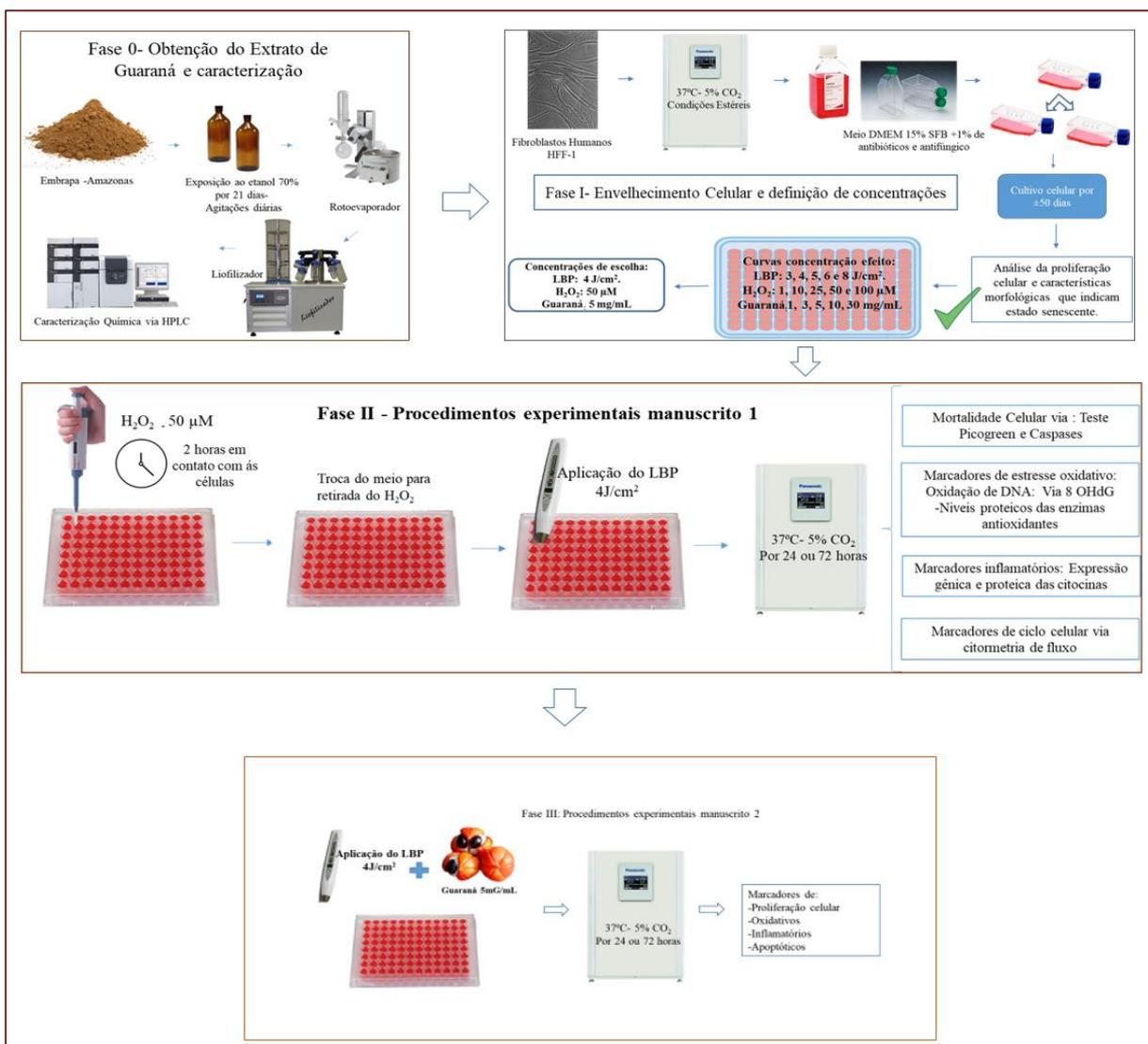
Manuscrito 2 tratamentos:

- a) Controle – somente H₂O₂
- b) H₂O₂ + LBP
- c) H₂O₂ + Guaraná
- d) H₂O₂ + LBP + Guaraná

Em relação ao manuscrito 1, as células foram tratadas com H_2O_2 , por 2 horas, em seguida este tratamento foi removido e readicionado o meio de cultura, e foi realizado os tratamentos com LBP. As células foram mantidas em cultura e após 24 ou 72 horas (conforme protocolo), foram realizados os testes para a análise dos marcadores oxidativos, inflamatórios, apoptóticos e proliferação.

Em relação ao manuscrito 2, as células previamente envelhecidas com H_2O_2 (por 2 horas) foram tratadas concomitantemente com Guaraná e LBP e mantidas em cultura e após 24 ou 72 horas (conforme protocolo), foram realizados os testes para a análise dos marcadores oxidativos, inflamatórios, apoptóticos e a proliferação celular. Abaixo figura 12 com a representação do delineamento experimental geral.

Figura 12 - Delineamento experimental geral.



Fonte: a autora da dissertação.

4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de 2 manuscritos:

- Manuscrito 1 submetido a revista *Laser in Medical Science*, classificada como B2 pelo Qualis- Capes- Ciências Biológicas II.

- Manuscrito 2 será submetido a revista *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, classificada como B3 pelo Qualis- Capes- Ciências Biológicas II.

4.1 MANUSCRITO 1

***In vitro* effect of low-level laser therapy on the proliferation, apoptosis modulation, and expression of oxi-inflammatory markers in hydrogen peroxide-induced premature dermal fibroblasts**

Daíse Raquel Maldaner^{1#}, Verônica Farina Azzolin^{2#}, Fernanda Barbisan^{2*}, Moisés Henrique Mastela², Cibele Ferreira Teixeira¹, Alexandre Dihel³, Thiago Duarte¹, Neida Luiza Pellenz¹, Luiz Fernando Cuozzo Lemos², Carla Maria Uggeri Negretto⁴, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^{1,4}

¹ Postgraduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Santa Maria 97105900, Brazil.

² Postgraduate Program of Gerontology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Santa Maria 97105900, Brazil.

³ Biogenomic Laboratory, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Santa Maria 97105900, Brazil.

⁴ Lutheran University of Brazil, BR 287, Km 252, Santa Maria 97020-970, Brazil.

Daíse Raquel Maldaner and Verônica Farina Azzolin have contributed equally to produce the present study

*Corresponding author: Fernanda Barbisan: Telephone: +55 55 3220-8163, E-mail: fernandabarbisan@gmail.com

Abstract

Purpose: Skin aging is a complex biological process induced by intrinsic and extrinsic factors; it is characterized by clinical and cellular changes, especially in epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. This study aims to evaluate the *in vitro* effect of low-level laser therapy (LLLT) in the reversal of aging-related damage of fibroblasts exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂), by analyzing the cytotoxic, inflammatory, apoptotic, and tissue repair markers in HFF-1 fibroblasts. Methods: Commercially available human fibroblasts from the HFF-1 strain were exposed to different concentrations of H₂O₂, to define the lowest dose that causes DNA damage and decreases cell viability. Exposure to different doses of LLLT (660 nm) was performed to determine the lowest dose that did not cause cytotoxic and pro-proliferative effect. The protective and reparative effects of LLLT against the H₂O₂ damage were then evaluated. Results: The H₂O₂ concentration for which the best fibroblast senescence result was seen was 50 µM; the best dose for LLLT treatment was 4 J/cm². Treatment with 50-µM H₂O₂ and 4J/cm² LLLT demonstrated the following: higher levels of DNA oxidation, a partial reversal of the

H₂O₂-induced triggering of CASP 1, CASP 3, CASP 8, IL-1 β , IL-6, TNF- α and INF γ , increased IL-10 levels, and a positive influence on cell proliferation and modulation of fibroblast growth factors (FGF-1 and KGF). Conclusions: These results suggest that in H₂O₂ -injured fibroblasts, LLLT presented an important protective and proliferative effect, partially or totally reversing the negative effects of H₂O₂ treatment.

Keywords: Skin, Aging, Fibroblast, Low-level laser therapy.

Introduction

The skin is a complex and the outermost organ of the body, comprising mainly of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. In the course of life, the skin accumulates biological changes, which are recognized as skin-aged phenotypes, including characteristics such as wrinkling, sagging, enlargement of the facial pore size, and generally, less elasticity and resilience than young skin. However, as aging is a consequence of the interaction between intrinsic (genetic) and extrinsic (environmental) factors, it is a very heterogeneous process and represents a challenge to dermatologists [1].

Most skin aging modification is directly related to fibroblasts, which have several functions, including the secretion and organization of dermal extracellular matrix (ECM). During the aging process, fibroblasts present with replicative senescence, and alterations in the cytoskeleton structure and in the secretion of fibbers. In fact, young fibroblasts show a high adherence; the spreading of these cells exerts a mechanical force on the surrounding ECM. However, the interaction of senescent fibroblasts with the dermal ECM is greatly interrupted, mainly as a consequence of matrix disorganization, which is related to collagen fibril deposition [2].

Causal mechanisms of skin aging are associated with decreased mitochondrial efficiency, with a consequent elevation of reactive oxygen species (ROS) levels, especially the superoxide anion and hydrogen peroxide (HP). In fact, the generation of high ROS levels is not followed by the concomitant increase of enzymatic antioxidant levels, and can be potentialized or minimized by external sources including environmental and lifestyle factors [3, 4]. Low-level laser therapy (LLLT) is a clinical procedure generally used as a skin biostimulator; it could be a potential tool that could decelerate the aging of fibroblasts [5]. However, complementary investigations are necessary to confirm this hypothesis.

The term Laser stands for “light amplification by stimulated emission of radiation”. In addition, the term “low-level” refers to a category associated with therapeutic actions, while high-intensity lasers have destructive actions: cutting, vaporizing, ablating, and/or coagulating a biological tissue. This resource deals with parameters like wavelength, intensity expressed

in watts (W), energy expressed in joules (J), the use of different techniques (such as punctual, sweep, intravascular), and the application on acupuncture points [6].

In this context, we have conducted a protocol using the commercial human foreskin fibroblast (HFF-1) cells from the normal human foreskin of a new-born. In in vitro standardized conditions, HFF-1 cells present a finite lifespan, similar to that observed in senescent fibroblasts that can be obtained by subsequent cell culture passages or by exposure to high levels of ROS. For this reason, HFF-1 fibroblasts have been used in prior studies to test chemical molecules that could reverse some fibroblast senescence characteristics [7, 8, 9]. Therefore, two integrated in vitro protocols were performed here: (1) potential senescence modulation of senescent HFF-1 cells by LLLT exposure.

Methods

Cell culture conditions and general experimental design HFF-1 cells procured from American Type Culture Collection USA (ATCC® SCRC-1041™), were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank to perform all experiments. Cells were maintained in the growth medium DMEM supplemented with 15% FBS, and the antibiotics penicillin (100 U/ mL) and streptomycin (100 U/mL). The growth conditions of cell lines were 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity. These cells were cultured for several passages, and each passage started with approximately 1×10^5 cells. The proliferative rate was always evaluated in 72-h cell cultures. In the 28th passage, an approximately 30% decrease of the proliferative rate of fibroblasts in our lab was observed, in comparison with younger cultures. Cyto-modifications in the monolayer structure were also observed, indicating senescence characteristics similar to those previously described in the study performed by McFarland and Holliday [7, 8] with HFF-1 cells.

These senescent-fibroblast cultures were exposed to a curve concentration of H₂O₂ in order to determine better concentration that triggered effect on cytotoxicity, apoptotic, oxidative-inflammatory and proliferative parameters, which could be potentially modulated by different LLLT conditions. The H₂O₂ concentrations used were: 1, 10, 25, 50, and 100 μM. The H₂O₂ exposure was performed as follows: Culture medium containing 1×10^5 fibroblast cells was transferred into 96-well plates and different concentrations of H₂O₂ dissolved in phosphate-buffer solution (PBS) were added to each well, followed by incubation for 2 hours. Next, the plates were centrifuged for 15 min at 252 g and washed with PBS. Fresh culture medium was then added, and the cells were cultured for 72 h hours, before the different variables were

analyzed for quantification. A similar procedure was performed when senescent fibroblasts were exposed to LLLT. All procedures were independently performed in triplicate.

LLLT conditions

Senescent fibroblasts were laser irradiated for 2 hours after H₂O₂ exposure, using the Endophoton LLT 0107 KLD® system (Biosystems Electronic Equipment Ltda - Brazilian Industry, Amparo, São Paulo, Brazil). Cells not exposed to H₂O₂ were also irradiated as a laser control group. A laser (660 nm) was used as the irradiation source with an output power 35 mW and frequency of 16 Hz, in the punctual continuous wave mode. The delivered dose for each irradiated set was 3, 4, 5, 6 and 8 J/cm² for exposure times of 10 s, 14 s, 16 s, 20 s and 28 s, respectively. The irradiation process was performed at room temperature 23°C, and in all the treatments, the distance between the laser and area of irradiation was 35 mm.

Cytotoxicity assays

The analysis of treatment effects on senescent fibroblast mortality was performed by the trypan blue dye exclusion method and measuring the double-stranded (ds) DNA fragment levels in the culture medium, which is an indicator of cellular mortality that was determined by a fast fluorimetric assay using the Quant-iT™ dye PicoGreen® (Invitrogen, Life Technologies). This is a fluorescent and stable reagent, with a high affinity for ds DNA, thus enabling the assessment of cellular integrity, assuming that the presence of free DNA in the medium is indicative of cell death due to membrane disruption. The ds DNA protocol was performed as previously described by Costa et al [10]. 20 µL of the cell culture samples of each well were transferred into a black 96-well plate, and then, 10x µL of DNA Picogreen previously diluted in Tris-EDTA (TE) buffer was added. A 10-minute incubation in the dark was performed before the fluorimetric analysis. The fluorimetric measurements were recorded at room temperature using a Spectra Max M2/M2 Multimode Plate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) at an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 520 nm.

Cell cycle analysis by Flow Cytometry

Analysis of senescent-fibroblast cellular proliferation was performed by flow cytometry, where the following different cell cycle phases were determined: G₀/G₁, S and G₂/mitosis phases, using a protocol similar to that described by Azzolin et al [11]. This protocol involved the use of propidium iodide (PI) reagent, which is able to intercalate with

DNA and determine the different cell cycle phases. The H₂O₂- and LLLT-exposed samples were treated with 500 µL of propidium iodide (PI)-PBS solution and incubated for 40 min at 37°C. After incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS, resuspended in 70% ethanol, and stored at -20 °C overnight until the flow cytometry analysis. For the analysis, the solution containing the cells was centrifuged and washed once with PBS and resuspended in 500 µL of PI solution and incubated 40 min time. This procedure was repeated, and the cells were then washed with 1 mL of PBS. Finally, the cells were centrifuged and resuspended in 500 µL of PBS for flow cytometry analysis.

Immunoassay protocols

Protein quantification of the following markers was performed: DNA 8-deoxyguanosine, and cytokines involved in inflammatory responses, such as interleukin IL-1, IL-6, IL-10, tumoral necrosis factor alfa (TNF- α), and interferon gamma (IFN- γ). The quantification was performed using the Quantikine Elisa kit obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), which is able to quantify cytokines in cell culture supernatants. The quantification of fibroblast growth factor (FGF), keratinocyte growth factor (KGF), and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX) was performed using an Elisa kit obtained from MyBioSource (San Diego, CA, USA), which is able to quantify these growth factors in cell culture supernatants. The assays were performed according to the manufacturer's instructions.

Fifty µL of the RD1W diluent was added to each well. Subsequently, 100 µL of standard control for our sample was added per well, and each well was covered with an adhesive strip and incubated for 1.5 h at room temperature. After this process, the solution in each well was aspirated and washed twice for three washes. The antiserum for each of the molecular markers analyzed here was added to each well. The plates were covered with a new adhesive strip, and again incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and 100 µL of the conjugate molecules of each marker tested here was added to each well, and the well was incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and 200 µL of substrate solution was added to each well, followed by incubation for 20 min at room temperature. After these procedures, 50 µL of a stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a micro plate reader at a wavelength of 450 nm.

Caspase-1, caspase-3, and caspase-8 activities were determined by fluorimetric assay kits, (Biovision, Inc., Milpitas, CA, USA). The fluorescence intensity of caspase-1, caspase-3,

and caspase 8 were recorded at an excitation wavelength of 400 nm, and an emission wavelength of 505 nm. The activity of caspase was calculated as Fluorescence intensity (FI)/min/ml = $\Delta FIt / (t \times v)$, where ΔFIt = difference in fluorescence intensity between time zero and time t minutes, t = reaction time in min, and v = volume of the sample in mL.

The sensitivity and detection range of each marker were as follows: DNA 8-deoxyguanosine (0.9–57 pg/mL), IL-1 (12.5–800 pg/mL), IL-6 (3.1–300 pg/mL), TNF α (5.6–1.000 pg/mL), INF γ (15.6–1.000 pg/mL), IL-10 (7.8–500 pg/mL), FGF (0.78–50 ng/mL) and KGF (25–1600 ng/mL), SOD (0.1–209 U/L), CAT (3.12–200 U/L), GPX (15.6–1000 U/L), CASP 1 (1.8–32.0 ng/mL), CASP 3 (3.6–42 ng/mL), and CASP 8 (7.0–60 ng/mL).

Statistical analysis

In order to compare the modifications triggered by H₂O₂ and laser exposure, all data were transformed into percentages in relation to the negative control group and presented as media \pm standard deviation (SD). The statistical comparisons were performed using the GraphPad Prism software, version 7.0 (2017). Results were statistically analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc Tukey's test, according to the presumption of variables in the analysis. Results with a $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Initially, treatment of fibroblasts with different H₂O₂ concentrations was performed in order to determine the best concentration that triggers several indicators of fibroblast senescence. As expected, H₂O₂ increased the fibroblast mortality rate in a concentration-dependent manner. This event was followed by the increase of DNA oxidation and the levels of three apoptosis markers, CASP 1, 3, and 8 markers (Fig 1A). After exposure to H₂O₂ at concentrations > 25 μ M, an increase in the levels of antioxidant enzymes SOD, CAT and GPX (Fig 1B) and the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α , and INF γ was observed. Moreover, from this concentration, a decrease in the levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, was observed (Fig 1C). Thus, an H₂O₂ concentration of 50 μ M was chosen to perform complementary studies involving the effect of LLLT on fibroblast senescence markers. Histological analysis of cell cultures exposed to H₂O₂ at a 50- μ M concentration confirmed its senescent effect on these fibroblasts (Fig 1D).

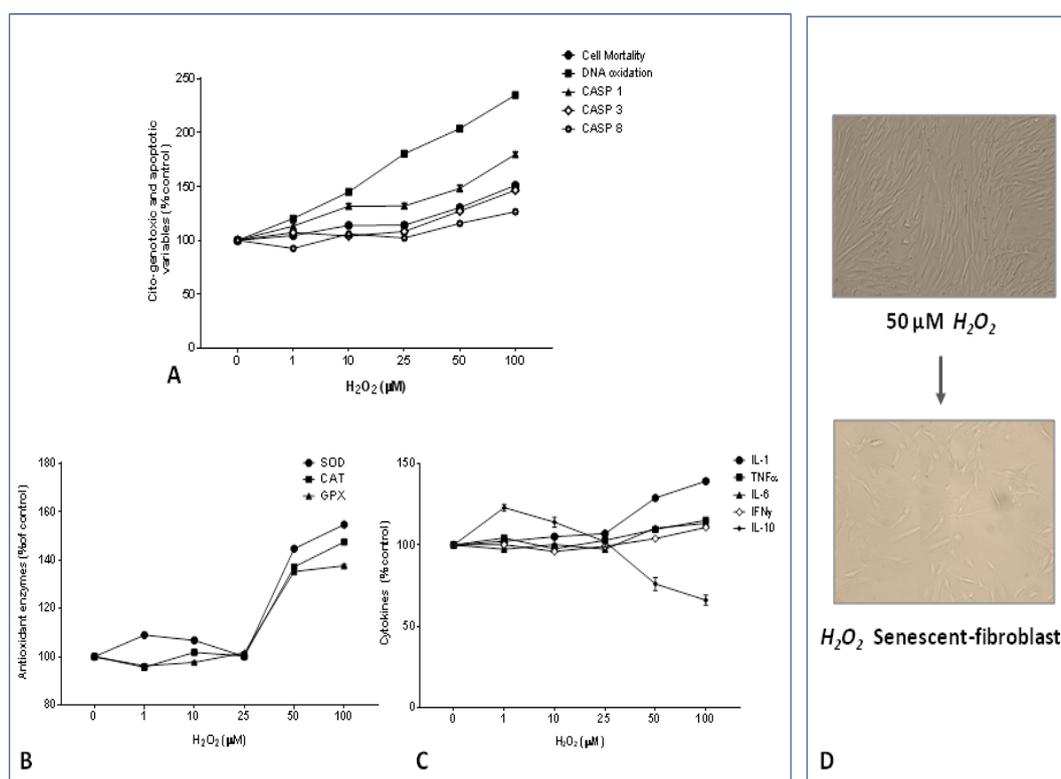


Figure 1: Effect of different H_2O_2 concentrations on the expression levels of markers cytotoxicity and apoptosis (A), antioxidant enzymes (B), cytokines (C), and histological analysis (D) of fibroblasts.

A complementary analysis was performed to define the LLLT range exposure that affects fibroblasts cultures positively and negatively. The levels of cell mortality, DNA oxidation, and all apoptosis markers investigated here (CASP 1, 3 and 8) increased significantly when fibroblasts were exposed to LLLT doses of $> 5 J/cm^2$ (Fig 2A). Analysis of antioxidant enzymes of fibroblasts exposed to LLLT doses of $> 4 J/cm^2$ showed an increase of GPX levels; fibroblasts exposed to LLLT doses from $> 6 J/cm^2$ showed an increase in the SOD and CAT levels (Fig 2B). LLLT exposure also modulated cytokine levels mainly at higher doses (6 and 8 J/cm^2); higher levels of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ) and lower levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, were observed. It is important to point out that fibroblasts exposed to LLLT doses of 4 J/cm^2 showed a significant increase in IL-1 β levels, but this effect was mild. Other cytokines were not affected by LLLT at 4 J/cm^2 doses (Fig 2C).

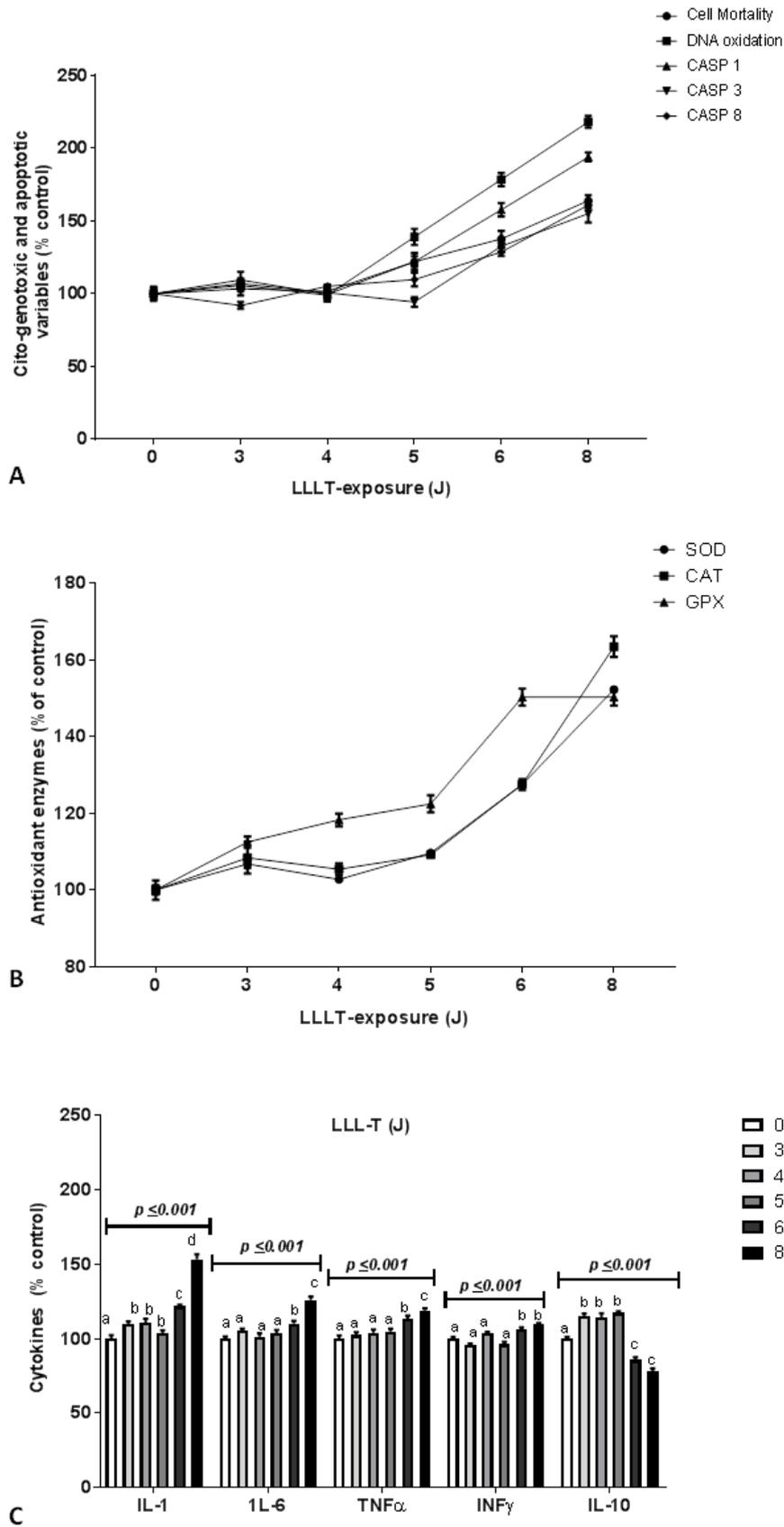


Figure 2: Effect of different doses of LLLT on the expression of markers of cyto-genotoxic and apoptotic (A), antioxidant enzymes (B), cytokines (C) in fibroblasts.

From these results, the effects of the interaction between 50- μM H_2O_2 and 4 J/cm^2 doses of LLLT at on fibroblast mortality, DNA damage, apoptosis, and antioxidant enzymes and inflammatory cytokine levels were analyzed. Fibroblast cultures pre-exposed to H_2O_2 and further exposed to a 4 J/cm^2 of LLLT presented a partial reversion of cell mortality when compared with cultures only pre-exposed to H_2O_2 (Fig 3A). The higher levels of DNA oxidation triggered by H_2O_2 exposure were also partially reversed when cells were subsequently exposed to a 4 J/cm^2 dose of LLLT (Fig 3B); similar results were found in case of the CASP 3 and CASP 8 levels (Fig 3C, 3D).

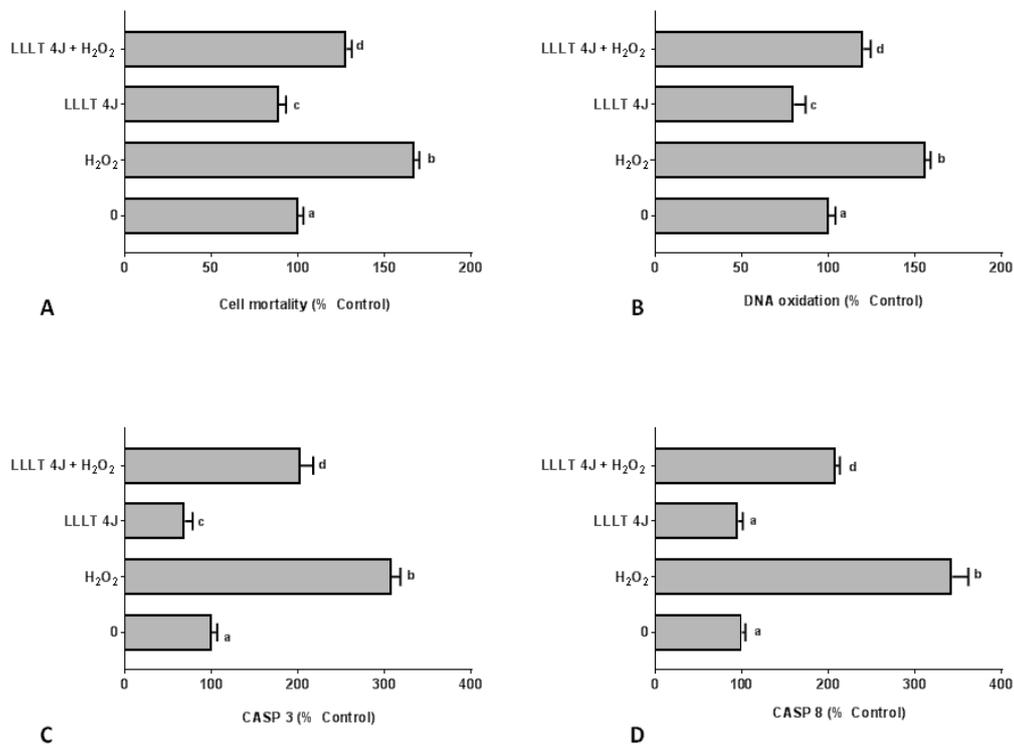


Figure 3: Comparison of changes in the levels of cell mortality (A), DNA oxidation (B), Caspase 3 (C) and Caspase 8 (D) markers in fibroblasts treated with LLLT 4 J/cm^2 + H_2O_2 , LLLT 4 J/cm^2 and H_2O_2 , and incubated for 72h.

The levels of all antioxidant enzymes decreased significantly in fibroblasts exposed to H_2O_2 and 4 J/cm^2 LLLT, compared to the case in cells that were only exposed to H_2O_2 and the case for untreated control cells (Fig 4A). Cytokine levels were also modulated by the interaction between H_2O_2 and 4 J/cm^2 LLLT. However, while higher levels of $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , and $\text{INF}\gamma$ were partially reversed, treatment with H_2O_2 plus 4 J/cm^2 LLLT presented $\text{TNF}\alpha$

levels similar to those in the control group. This same treatment was able to partially increase IL-10 levels, when compared to control group (Fig 4B).

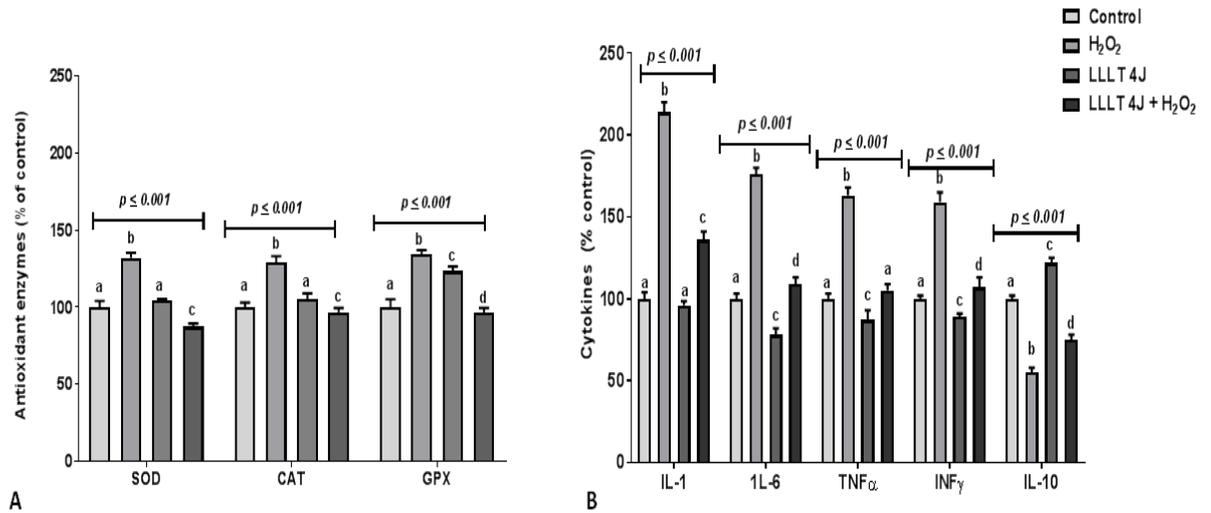


Figure 4: Comparison of changes in the levels of antioxidant enzymes (A) and cytokines (B), in fibroblasts treated with 4J/cm² + H₂O₂, LLLT 4J/cm² and H₂O₂, incubated for 72 h.

A complementary analysis was performed among these treatments to evaluate their potential effect on fibroblast proliferative states, which were evaluated by determining the cell cycle phases of the fibroblasts (Fig 5A). The G1 phase can be considered a stationary phase and the S and G2/Mitosis phase can be considered as proliferative cell cycle phases. Analysis showed a higher frequency of cells in the S and G2 phases in cells pre-exposed to H₂O₂ and subsequently treated with 4 J/cm² LLLT (Fig 5B). Fibroblasts only exposed to H₂O₂ showed a significant decrease in the FGF-1 and KGF levels, compared to the case in the control group. On the other hand, there was no change in the FGF-1 levels of fibroblasts only exposed to LLLT, compared to the case in the control group; on the other hand, the interaction between H₂O₂ and LLLT triggered higher levels of KGF, which is an important skin proliferative factor (Fig 5C).

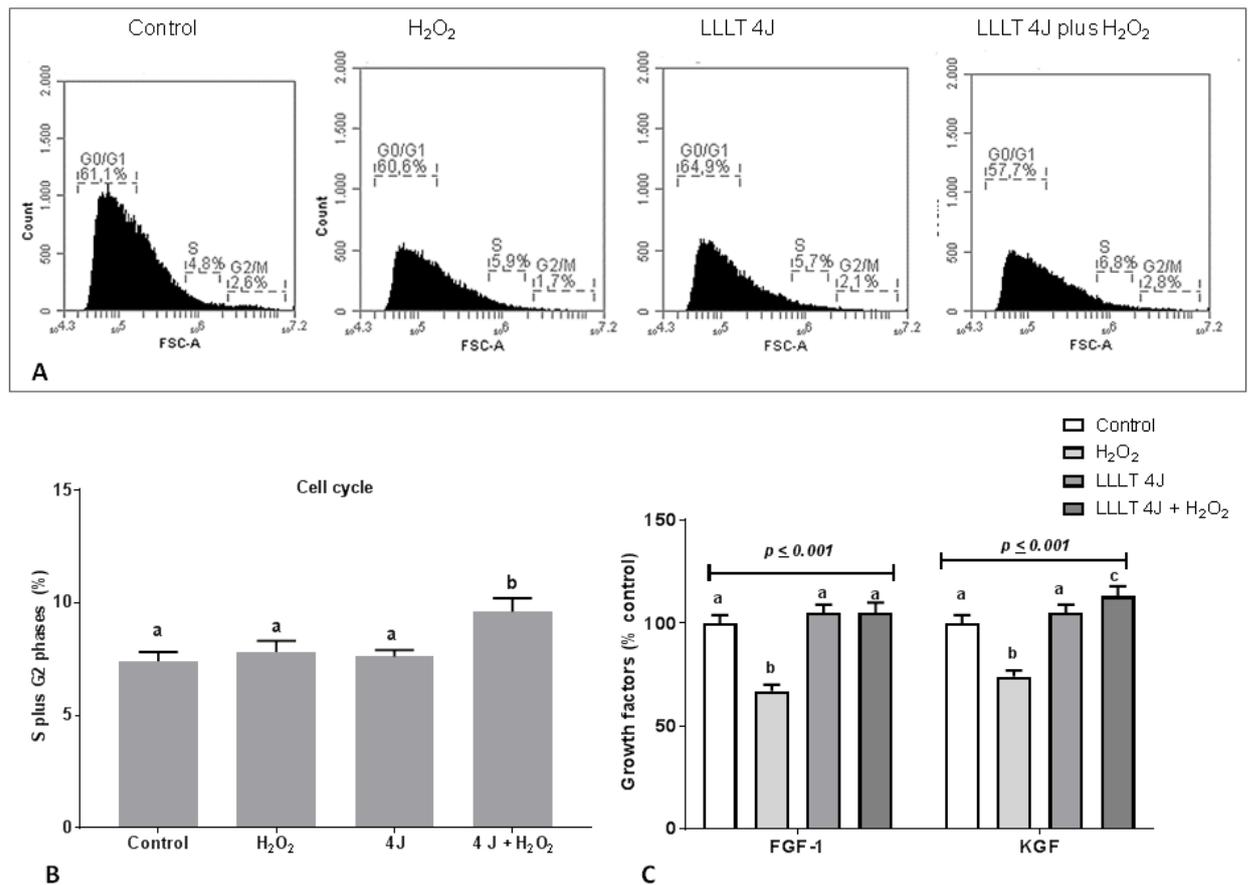


Figure 5: Comparison of cell cycle progression in fibroblasts treated with LLLT 4J/cm²+H₂O₂, LLLT 4J/cm² and H₂O₂ in culture for 72h. (A) Representative flow cytometry analysis graphs for each treatment. G1 = gap 1 phase, G2 = gap 2 phase, and S = synthesis phase. (B) representative S plus G2 phases for fibroblasts after each treatment (C) the effects of different treatments on the expression of fibroblast and keratinocyte growth factors.

Moreover, the potential effects of H₂O₂ and LLLT on fibroblast proliferation and the modulation of two fibroblast growth factors (FGF-1 and KGF) were also evaluated in this treatment.

Discussion

LLLT is a clinical procedure candidate used for the deceleration of fibroblast-aging processes [5]. Therefore, this investigation tried to contribute to the test of this hypothesis by an in vitro analysis involving foreskin fibroblasts exposed to different LLLT doses with and without acceleration of aging markers obtained by subjecting the cultures to temporary H₂O₂ supplementation. In general, LLLT exposure caused dose-dependent positive and negative effects on fibroblasts. LLLT at doses < 4 J/cm² did not affect cell mortality, DNA oxidation, and levels of apoptotic markers (CASP 1, 3, and 8) when compared to control cells. On the other hand, higher LLLT doses triggered an increase in the levels of cyto-genotoxic markers

and antioxidant enzymes. Moreover, higher LLLT doses lead to an increase in the proinflammatory cytokine supernatant concentrations, indicating the occurrence of a pro-inflammatory state in these cells. However, the interaction between 50- μM H_2O_2 and 4 J/cm^2 LLLT suggested that this treatment was able to minimize the levels of the fibroblast senescent markers studied here. Despite the methodological constraints associated with in vitro studies, these results may be considered relevant in relation to the effects of LLLT on fibroblast aging, which needs to be discussed more thoroughly.

In the present discussion, it is important to point out that laser stimulation is a procedure widely used for clinical applications, including LLLT therapy, due its property of not causing iatrogenic malignancies [12, 13, 14]. However, in the present investigation we observed that higher LLLT doses triggered cyto-genotoxic effects, including apoptosis induction. These results were expected, since it is well established that the biological response to LLLT stimulation is dependent on several parameters including wavelength, irradiance, time, pulse, light coherence, polarization, and others [6,15].

These results allowed us to infer the best LLLT exposure dose that could have some beneficial effects, i.e. the reversal of changes caused by the temporary exposure of fibroblasts to H_2O_2 . In fact, H_2O_2 is an important biological molecule, since in low and controlled concentrations, it is a regulatory signalling molecule that has several actions, including the regulation of the proliferative states of some cells. However, when present in high concentrations such at 50 μM , it triggers cellular events, especially in fibroblast cells that show characteristics of senescence. For this reason, fibroblast exposure to H_2O_2 , as used here, is considered a good in vitro model to understand the mechanisms and identify regulatory molecules related to replicative senescence and other aging characteristics [16,17,18].

Results obtained from fibroblasts exposed only to LLLT showed that at doses of < 4 J/cm^2 , a significant, but slight increase in IL-1 β levels occurred; however, other proinflammatory cytokines were not modulated by this treatment. On the other hand, lower LLLT doses were able to improve the levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine. Prior evidences showed that LLLT treatment acts on the wound healing process by increasing keratinocyte migration [19], also contributing to the extracellular matrix organization by increasing the production of collagen, as well as other tissue factors such as matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) [14]. Moreover, LLLT seems to be able to modulate the expression of several genes related to skin wound-healing processes. For example, a recent study described that LLLT (at doses of 1 to 5 J/cm^2) induced in vitro protein synthesis in fibroblasts, upregulating the gene expression of vascular endothelial growth factor (VEGF),

which is an important molecule that stimulates the formation of blood vessels in the body. In the same study, authors also observed the downregulation of IL-6 gene expression in these cells [15]. An investigation performed by Silveira et al [20] reported that in rats, LLLT (at doses of 3 to 5 J/cm²) was able to prevent proinflammatory state in trauma-induced muscles. Results from this investigation also reported that after 2 h, muscle injury occurred, along with the increase in the expression of several oxidative markers, as well as in antioxidant enzyme levels. These antioxidant enzyme levels remained high for the next 24 h after trauma-injury. However, these alterations were prevented by LLLT treatment, especially at a 3 J/cm² dose.

In fact, when cells were previously exposed to H₂O₂, LLLT action on fibroblasts was more pronounced, since this treatment was able to prevent cell mortality, DNA oxidation, and the CASPs level increase caused by H₂O₂ exposure. Similar to the observations of the study performed by Silveira et al [20], LLLT significantly decreased the levels of three main antioxidant enzymes evaluated here: SOD, CAT, and GPX. In general, at least partially, LLLT also reduced the levels of pro-inflammatory cytokines and increased the IL-10 levels. Actually, the anti-inflammatory property of LLLT treatment has been described in previous studies, such as that performed by Da Ré Guerra et al [21], also after physical trauma (partial tenotomy). Therefore, these results collectively suggest that LLLT can modulate the expression of some apoptotic, oxidative, and inflammatory markers present in H₂O₂-induced aging fibroblasts.

A complementary analysis was performed to determine whether LLLT could also act on the proliferative state of H₂O₂-exposed fibroblasts. Surprisingly, cell cycle analysis in 72-h cultures did not show a significant change in the frequency of fibroblasts in the S and G2 phases in case of control fibroblasts and fibroblasts exposed only to H₂O₂ or LLLT. However, the interaction between H₂O₂ and LLLT changed this result, since in cells subjected to this treatment, an increase in the frequency of cells that were in the S/G2 phases occurred.

However, this result could be confusing, since just proliferation does not necessarily reflect the desired proliferative state of the fibroblasts; thus, an analysis of two important growth factors was also performed. The first marker studied here was FGF-1. This molecule is a powerful mitogen involved in the stimulation of DNA synthesis and the proliferation of a wide variety of cell types, including fibroblasts. For this reason, recombinant FGF-1 has been developed and studied, such as that performed by Żerańska et al [22], showed that this molecule strongly stimulated fibroblast and keratinocyte proliferation. In our results, fibroblasts exposed only to H₂O₂ showed lower FGF-1 levels, while cells exposed only to LLLT showed FGF-1 levels similar to those in control cells. However, the interaction

between H₂O₂ and LLLT completely reversed the lower FGF-1 levels triggered by H₂O₂, indicating that in some “aging fibroblast states”, LLLT could help to stimulate skin cell proliferation. This suggestion is corroborated by a prior investigation that described the property of LLLT to upregulate the FGF-1 gene expression in the healing of diabetic wounds²³.

The interaction between H₂O₂ and LLLT exposure also increased levels of KGF-1 molecule, which is also a member of a growth factor family that shows high mitogenic and cell survival activities. In fact, this is considered a crucial molecule in fibroblast-keratinocyte cross talk. However, in some situations, such as fibrotic disorders, KGF-1 can be overexpressed in tissues [24, 25]. However, results found here did not show an extensive increase in the KGF-1 levels, although cells exposed just to LLLT showed KGF-1 levels similar to those in control fibroblasts. Furthermore, although the interaction between H₂O₂ and LLLT induced a significant increase in KGF-1 levels, this induction was considered slight, since it was less than 20% when compared to that in the untreated control group.

Conclusion

In summary, the results described here collectively suggest that the LLLT treatment of fibroblasts without any injury is relatively safe and innocuous, considering its potential cytogenotoxic, oxi-inflammatory, and proliferative effects. On the other hand, in H₂O₂-injured fibroblasts, which mimic the characteristics of senescent cells, LLLT elicited an important protective and proliferative effect, partially or totally reversing the negative effects caused by H₂O₂. In these terms, it is possible to infer that at a certain dose range, LLLT may possess some anti-aging properties.

Compliance with ethical standards

Ethics approval: This study involves the use of only commercial cell lines and does not involve any human participants or animals.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

This work has been funded by the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)- Brazil.

References

1. Lephart ED (2016) Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res Rev* 31:36-54.
2. Cole MA, Quan T, Voorhees JJ, Fisher GJ (2018) Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *J Cell Commun Signal* 12:35-43.
3. Birch-Machin MA, Bowman A (2016) Oxidative stress and ageing. *Br J Dermatol* 175:26-29.
4. Silva SAME, Michniak-Kohn B, Leonardi GR (2017) An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *An Bras Dermatol* 92:367-374.
5. Zachary CB (2016) Facial Rejuvenation: 40th anniversary review. *Semin Cutan Med Surg* 35:122-124.
6. Ramos FS, Maifrino LBM, Alves S et al (2018) The effects of transcutaneous low-level laser therapy on the skin healing process: an experimental model. *Lasers Med Sci* 33:967-976.
7. McFarland GA, Holliday R (1999) Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on culture human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* 34:35-45.
8. Merrell JG, McLaughlin SW, Tie L et al (2009) Curcumin-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanofibres: diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:1149-1156.
9. Delgado L, Fernandes I, González-Manzano S, et al (2014) Anti-proliferative effects of quercetin and catechin metabolites. *Food Funct* 5:797-803.
10. Costa F, Barbisan F, Assmann CE, et al (2017) Seminal cell-free DNA levels measured by pigogreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. *Zygote* 25:111-119.
11. Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, et al (2016) Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol In Vitro* 32:8-15.
12. Verma A, Stellacci F (2010) Effect of surface on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6:12-21.
13. Bayat M, Viridi A, Jalalifirouzkouhi R, Rezaei F (2018) Comparison of effects of LLLT and LIPUS on fracture healing in animal models and patients: A systematic review. *Prog Biophys Mol Biol* 132:3-22.
14. Migliario M, Sabbatini M, Mortellaro C, Renò F (2018) Near infrared low level laser therapy and cell proliferation: the emerging role of redox sensitive signal transduction pathways. *J Biophotonics* 2:e201800025.
15. Yan J, Wang J, Huang H et al (2017) Fibroblast growth factor 21 delayed endothelial replicative senescence and protected cells from H₂O₂-induced premature senescence through SIRT1. *Am J Transl Res* 9:4492-4501.
16. Ortiz-Espín A, Morel E, Juarranz Á, et al (2017) An Extract from the Plant *Deschampsia antarctica* Protects Fibroblasts from Senescence Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxid Med Cell Longev* 2017:ID 2694945.
17. Devi S, Kumar N, Kapila S, et al (2017) Buffalo casein derived peptide can alleviates H₂O₂ induced cellular damage and necrosis in fibroblast cells. *Exp Toxicol Pathol* 69:485-495.
18. Huang C, Qian SL, Sun LY, Cheng B (2016) Light-Emitting Diode Irradiation (640 nm) Regulates Keratinocyte Migration and Cytoskeletal Reorganization Via Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Photomed Laser Surg* 34:313-320.
19. Szezerbaty SKF, de Oliveira RF, Pires-Oliveira DAA, et al (2018) The effect of low-level laser therapy (660 nm) on the gene expression involved in tissue repair. *Lasers Med Sci* 33:315-321.
20. Silveira PC, Scheffer Dda L, Glaser V, et al (2016) Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. *Free Radic Res* 50:503-513.

21. Da Ré Guerra F, Vieira CP, Oliveira LP, et al (2016) Low-level laser therapy modulates pro-inflammatory cytokines after partial tenotomy. *Lasers Med Sci* 31:759-766.
22. Żerańska J, Pasikowska M, Szczepanik B, et al (2016) A study of the activity and effectiveness of recombinant fibroblast growth factor (Q40P/S47I/H93G rFGF-1) in anti-aging treatment. *Postepy Dermatol Alergol* 33:28-36.
23. Denadai AS, Aydos RD, Silva IS, et al (2017) Acute effects of low-level laser therapy (660 nm) on oxidative stress levels in diabetic rats with skin wounds. *J Exp Ther Oncol* 11:85-89.
24. Pansani TN, Basso FG, Turrioni AP, et al (2017) Effects of low-level laser therapy and epidermal growth factor on the activities of gingival fibroblasts obtained from young or elderly individuals. *Lasers Med Sci* 32:45-52.
25. Canady J, Arndt S, Karrer S, Bosserhoff AK (2013) Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis. *J Invest Dermatol* 133:647-657.

4.2 MANUSCRITO 2

Interaction between low-level laser therapy and Guarana (*Paullinia cupana*) extract potentialize antioxidant, antiinflammatory, antiapoptotic and proliferative effects on dermal fibroblasts

Daíse Raquel Maldaner^{#1,2}, Neida Luiza Pellenz^{#1}, Fernanda Barbisan^{3*}, Verônica Farina Azzolin³, Moisés Henrique Mastela¹, Cibele Ferreira Teixeira¹, Thiago Duarte¹, Euler Esteves Ribeiro⁴, Ednea A. Maia-Ribeiro⁴, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,3}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^{1,2}

1 Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

2 Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS, Brazil

3 Postgraduate program of Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

3 Biogenomic Laboratory, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

4 University of the State of Amazonas / Open University of the Third Age, Manaus, AM-Brazil

Daíse Raquel Maldaner and Neida Luiza Pellenz have contributed equally to produce the present study

*Corresponding author: Email: fernandabarbisan@gmail.com

Abstract

Introduction: The low-level laser therapy (LLLT) has several clinical applications. However, its beneficial effect is not universal and could be improved by plant extracts such as Guarana (*Paullinia cupana*) that presents some potential antiaging properties. **Objective:** To evaluate the effect of the interaction between LLLT and Guarana extract on antioxidant, antiinflammatory, antiapoptotic and proliferative markers of a human dermal fibroblast lineage. **Methods:** The human dermal fibroblast (HFF-1) cells were cultured in controlled conditions and initially exposed to several Guarana concentrations (1, 3, 5, 10, 30 µg/mL). The concentration of choice of

this extract was defined through the analysis of cytokine levels, DNA oxidation and apoptotic markers thus being used to supplement fibroblast cultures no-exposed and LLLT-exposed ($4 \text{ J} / \text{cm}^2$). After 72 h cell cultures submitted to these treatments were analysed using spectrophotometric, fluorimetric, immunological and gene expression (qRT-PCR) assays. Flow cytometry was also used to evaluate the effect of treatments on cell cycle fibroblasts. **Results:** Guarana at 5 mg/mL concentration showed significant antiinflammatory and antiapoptotic action on fibroblasts been used in complementary protocols. Interaction between Guarana and LLLT decreased significantly oxidative variables including protein carbonylation, lipoperoxidation and DNA oxidation. This treatment present lowering effect on pro-inflammatory gene and protein expression trigger elevate levels of gene and protein IL-10 levels. Guarana plus LLLT also decreased protein and genes of caspases 1, 3 8 levels increasing frequency of cells in S-phase cycle and of FGF-1 and KGF levels, two proliferative signalling molecules. Some of these results were also observed in fibroblasts treated just Guarana or just LLLT-treated. **Conclusions:** Despite the methodological limitations associated with in vitro studies, the whole of results suggested that concomitant treatment with Guarana and LLLT could be fibroblast-biostimulators been some clinical relevance.

Keywords: Skin. Aging. Fibroblast. Laser. Amazonic Fruit

Introduction

Skin interventions involves non-pharmacological procedures, such as low-level laser therapy (LLLT). In fact, LLLT acts inducing non-thermal responses involving endogenous chromophores, finally resulting in photophysical and photochemical biological events (1). Its clinical tool has been commonly used as skin biostimulator due its potential effect on fibroblast's aging deceleration (2).

Clinical applications of LLLT involve several clinical settings involving three main objectives, namely: wound healing, tissue repair and tissue death prevention; chronic joint disorders treatment along with inflammation and edema relief; analgesia and neurological disorders treatment (1). On the skin, LLLT also seems has beneficial effects on wrinkles, acne scars, hypertrophic scars, and healing of burns., in reduction of UV damage both as a treatment and as a prophylactic measure. Dermatological studies also described that in pigmentary disorders such as vitiligo, LLLT can improve pigmentation by stimulating melanocyte proliferation and reduce depigmentation by inhibiting autoimmunity (3).

As LLLT is also used as skin biostimulator some authors believe that its procedure could be a potential tool that could decelerate fibroblast's aging (2). A recent *in vitro* investigation performed by Maldaner et al (4) suggested that on fibroblast reactive oxygen

species (ROS) injured, the LLLT presented an important protective and proliferative effect, reverting partially or totally negative effects triggering by H₂O₂-exposure.

However, it is possible that LLLT effect on fibroblast could be potentialized by interaction with some antioxidant compounds and extracts. This is the case of Guarana (*Paullinia cupana*) that has a chemical matrix richest in caffeine-catechin molecules. Traditionally, Guarana toasted and roasted seeds has been consumed as energetic beverage by Amazonian indigenous communities since pre-Colombian times (5).

Previous *in vitro* investigations suggested that Guarana could modulates differentially inflammatory states and anti-aging processes. This is the case of an investigation performed by Krewer et al. (6), that evaluated Guarana effects on cytokine levels modulation from a translational study involving *in vitro* and *in vivo* protocols. *In vitro* analysis using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) showed that Guarana presented similar anti-inflammatory effects than resveratrol, decreasing Il-1 β and INF- γ levels and increasing Il-10 levels compared to those of the control group. Results from a randomised, placebo-controlled assay that included 14 healthy volunteers supplemented for 14 days of Guarana powder confirmed its antiinflammatory effect. Complementary investigation performed by Machado et al. (7), investigated the Guarana effects on senescent adipocyte-mesenchymal cells (ASCs) obtained from human lipoaspirates cells. In these cells Guarana was able to increase cellular proliferation and to decrease several oxidative stress indicators reverting the initial senescence processes in ASCs.

Therefore, we tested here potential interactive *in vitro* effects of LLLT and Guarana extract on modulation of oxidative, inflammatory and apoptotic markers of dermal fibroblasts, with the objective of verifying the synergistic effect of these treatments on cytoprotection and the proliferation of senescent fibroblasts.

Methods

Cell culture conditions and general experimental design

Present *in vitro* investigation was performed using HFF-1 dermal fibroblast cells (ATCC® SCRC-1041™), a commercial cell line produced by American Type Culture Collection (ATCC-USA), and obtained from Rio de Janeiro Cell Bank. The cell line was maintained in the growth medium DMEM supplemented with 15% Fetal bovine serum (FBS) supplemented with antibiotics (1% penicillin/streptomycin) and antifungal (1% anfotericine B), 37°C temperature, 5% CO₂, and 95% humidity.

Initially, Guarana effect was determined on fibroblast culture cells (1×10^5 fibroblast) reared in 96-well plates. Inflammatory and apoptotic modulation by different Guarana at different concentrations (1, 3, 5, 10 and 30 mG/mL) was evaluated in 72 h cell cultures. Guarana curve concentration was choose based in previous studies performed by Krewer et al (6) and Cadona et al (8). The levels of follow pro-cytokines was measured in culture cells: Interleukin (IL) 1 β , IL-6, e tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Levels of IL-10, an antiinflammatory cytokine was also quantified. DNA oxidation was measured through the levels of 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG). And caspase (CASP), apoptotic marker was evaluated by levels CASP 1-3 and 8. As criteria for concentration of choice we considered the lowest concentration of Guarana that concomitantly caused anti-inflammatory effects did not induce oxidation to DNA and caspase induction, for to perform subsequent experiments that evaluated the interaction between Guarana and LLLT on fibroblast dermal cells. Fibroblasts were previously aged by treatment with H₂O₂ according to methods used by Maldaner et al. (4). In this second protocol, complementary variables were also evaluated in 72 hours cell cultures including: (1) oxidative metabolism parameters: ROS, protein carbonylation, lipoperoxidation and DNA oxidation determined by 8-OHdG levels; (2) Inflammation markers: cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10) protein and gene

modulation (evaluate in 24 hours); (3) Apoptotic markers: caspases (1-3 and 8) protein and gene modulation; (4) proliferative modulation: Cell cycle analysis evaluated by flow cytometry protocols and by quantification of two growth-cell signalling molecules: fibroblast growth factor (FGF-1) and keratinocyte growth factor (KGF).

Guarana extract preparation and chemical characterization

The study performed here is part of a project previously authorized by the Brazilian Environmental Ministry to assess the components of genetic patrimony in the national territory (no.010547/2013-4) according to Brazilian legislation (no. 2186-16). Guarana extract used in all experiment was produced using raw powder Guarana obtained by Embrapa Western Amazon Co, a non-profit governmental organization located in Maués, Amazon, Brazil.

The Guarana powder was used to produce a hydroalcoholic extract as described by Bittencourt et al. (9). Briefly, the extract was produced using 70:30 alcohol and water to 100 mL of extraction fluid prepared at a concentration of 300 mg/mL. After 24 h of extraction, the solution was centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the supernatant was isolated and filtered through Whatman N°. 1 paper. Ethanol was removed from the extract by rotary evaporator at reduced pressure, 25°C at 115 rpm, and the extract was lyophilized in a freeze-drying equipment (Enterprise II LT 1000; Terroni, São Paulo, Brazil).

Bioactive molecules were measured by Chromatographic analysis with detection of UV absorbance at 272 nm on an HPLC system consisting of a Shimadzu Prominence LC-20 A, an LC-20AT quaternary pump, a SIL 20 auto sampler-A, a DGU-20A5 on-line degasser, a CBM-20 A integrator and a SPD-20 V DAD detector according to Andrews et al. (2007). A 150 mm 4.6 mm i.d. ODS-3 column (Phenomenex Prodigy ODS-3 100 A, 5- μ m particle size Torrance, CA, USA) was used for the separation. Working standards were prepared by

diluting the stock solution (mL) in mobile phase at the several ratios. The least concentrated standard was designed to achieve a limit of detection of 0.005% based on a 1g sample diluted to 100 mL (LOD = 0.05 mg/g). The HPLC conditions were: flow rate, 1 mL/min; mobile phase A, 0.1% H₃PO₄ in water; mobile phase B and 100% ACN. The chromatographic system was calibrated with at least a five points standard curve for each set of samples analysed (9, 10). Standards were run after every fourth sample. Excellent reproducibility was seen in the standards; typically, the R value for the calibration curve was 0.9999 or better. The bioactive compounds of Guarana were determined to be caffeine = 12.40 mg/g, theobromine = 6.433 mg/g and total catechins = 4.128 mg/g.

To perform *in vitro* experiments, the lyophilized extract was diluted in distilled water and prepared at a concentration of 200 mg/mL. The mixture was infused for 7 min by boiling, centrifuged (1500 rpms, 15 min) and filtered. The solution was sterilized by filtration (filters 0,22µm) before adding to the culture medium at different concentrations.

LLLT exposure conditions

Fibroblast cells were laser irradiated until 2 hours after cell to be Guarana exposed using equipment Endophoton LLT 0107 KLD® (Biosystems Electronic Equipment Ltda - Brazilian Industry, Amparo, São Paulo, Brazil). Cells no exposed to Guarana were also irradiated as a laser control group. A laser (660 nm) was used as the irradiation source with 35mW output power and 16 Hz frequency in punctual continuous wave mode. The delivered dose was 4J/cm² with exposure times 14s, since this dose presents anti-aging effects as previously described by Maldaner et al (4). The irradiation process was achieved at room temperature (18–25 °C). All treatments were conducted with 35 mm distance between the laser and area of irradiation.

Inflammatory metabolism markers

The cytokines protein quantification was performed using samples from cell culture supernatants. These molecules were measured as inflammatory markers that are gene and protein expressed in fibroblasts (IL-1 β , IL-6, TNF α and IL-10) Quantikine Human Elisa Kits (R&D Systems, Minneapolis, USA), using according to the manufacturer's instructions following previously described methodological details in Jung (14). The sensitivity and detection range of each cytokine were respectively: IL-1 β (12.5–800 pg/mL), IL-6 (3.1–300pg/mL); TNF α (5.6–1.000 pg/mL), IL-10 (7.8–500 pg/mL).

Oxidative metabolism markers

Considering that Guarana has antioxidant activity the follow oxidative metabolism markers were quantified in fibroblasts previously HP-exposed or not: nitric oxide (NO) and superoxide anion (SA) levels spectrophotometrically determined by Choi (12) and Morabito (13) methods, respectively. Both assays were read at 550 nm. The ROS level in the supernatant cultures were quantified by dichlorofluorescein acetate fluorimetric assay (DCFDA) read at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm. The levels of carbonylation protein was determined by Levine et al. (14) method with absorbance reading at 370 nm and Lipoperoxidation was quantified by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) being read at 532 nm absorbance (15).

DNA oxidation determined by deoxiguanosine (8-OHdG) and the antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) were also quantified using Abcam (Cambridge, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, similar to described before. The sensitivity and detection range of each marker were

respectively: DNA 8-deoxyguanosine (0.9-57 pg/mL), SOD (0,1 – 209 U/L), CAT (3.12-200 U/L) and GPX (15.6 U/L-1000 U/L)

CASP and cytokines gene expression analysis

Gene expression of apoptotic and inflammatory markers were determined by performing quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) with Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN Biotechnology, Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany). Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA) from each sample of all treatments. Expression of most genes was quantified, as described previously by Luca et al. (16). For performing reverse transcription, RNA was added to the samples (1 for 30 s, and a melt curve of 60°C–90°C, with 0.5°C increments, for 5 s. For each sample, qRT-PCR was performed in triplicate by using DNase (Invitrogen Life Technologies) for 5 min at 37°C and the samples were heated at 65°C for 10 min. cDNA was synthesized using 1 µL iScript cDNA and 4 µL of Mix iScript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) by using the following reaction conditions: 5°C for 10 min, 25°C for 5 min, 85°C for 5 min, and 5°C for 60 min. The conditions to perform qRT-PCR assay were the following: 95°C for 3 min, 40 cycles of 95°C for 10 s and 60°C for 30 s, and a melt curve of 60°C–90°C, with 0.5°C increments, for 5 s. For each sample, qRT-PCR was performed in triplicate by using 1µM of each primer, 1000 ng/µL cDNA, RNase-free water, and 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN Biotechnology) in a 20-µL reaction mixture. Beta-actin (β -actin) was the housekeeping gene used to normalize the gene expression of all samples tested. Relative expression was quantified using comparative cytosine-thymine (CT) and is expressed as a fold change compared with that in control cells.

The specific primer pairs of cytokines and Caspase are presented used in this study were: IL-1 β Forward GCGGCATCCAGCTACGAAT and Reverse

ACCGCATCTTCCTCAGCTTGT; IL-6 Forward TACCCCCAGGAGAAGATTCCA and Reverse CCGTCGAGGATGTACCGAATT; TNF- α Forward CAA CGGCATGGATCTCAAAGAC and Reverse TATGGGCTCATACCAGGGTTTG; IL 10 Forward GTGATGCCCAAGCTGAGA and Reverse TGCTCTTG TTTTCACAGGGAAGA. CASP-1 Forward CGCACACGTCTTGCTCTCAT and Reverse TACGCTGTACCCAGATTTTGTAG, CASP-3 Forward TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG and Reverse TACCAGTGCGTATGGAGAAATGG CASP-8 Forward AAGGAGCTGCTCTTCCGAATT and Reverse CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT.

Cellular proliferation analysis

Guarana effect's on cellular proliferative states was evaluated by frequency of cells in different cell cycle phases (G0/G1, S and G2/mitosis phases) from flow cytometry analysis. Protocol used here was similar to previously described by Azzolin et al (17). Briefly, sample treatments were incubated with 500 μ L of a propidium iodide (PI) PBS solution and incubated for 40 min at 37 °C, since this reagent is able to intercalates to the DNA to determine different cell cycle phases. Further an incubation period, the cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 70% ethanol been stored at -20 °C overnight. The solution containing cells was centrifuged and washed once with PBS, resuspended in 500 μ L PI solution during x time. This procedure was repeated washing the cells with 1 mL PBS. Finally, cells were centrifuged and resuspended in 500 μ L PBS in order to perform flow cytometry analysis.

In addition to the analysis of the cell cycle was quantified two important growth factors markers: fibroblast growth factor (FGF-1) strongly stimulated fibroblast and keratinocytes proliferation (18), and keratinocyte growth factor (KGF-1) also known as FGF-7 that also present broad mitogenic and cell survival activities. Quantification of these two

markers was also performed by immunoassay using similar kits and methodological procedures described before. The sensitivity and detection range of FGF-1 and KGF-1 were respectively: FGF (0.78 -50 ng/mL.) and KGF (25 -1600 ng/mL).

Statistical analysis

Data were analysed using GraphPad Prism software, version 7.0 (2017). All data were transformed into percentages in relation to the negative control group and presented as media \pm standard deviation (SD) to perform statistical comparisons. Data were statistically analysed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's or Bonferroni *post-hoc* tests. Results with a $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Initially Guarana effect on fibroblasts a curve was performed to determine best concentration to be test in the interaction with LLLT from analysis of some inflammatory and oxidation mark in 72 h cell cultures. Guarana at 5 mg/mL concentration not induced proinflammatory cytokines and increased significantly IL-10 levels (Figure 1A,1B), whereas higher Guarana concentrations triggered a pro-inflammatory response in fibroblast cells. Moreover, fibroblasts exposed to Guarana at 5 mg/mL did not present elevation of caspases and DNA oxidation than control group (Figure 1C, 1D).

From these results, the effect of Guarana at 5 mg/mL concentration on inflammatory and apoptotic markers induced by interaction between and LLLT-exposure was subsequently analysed.

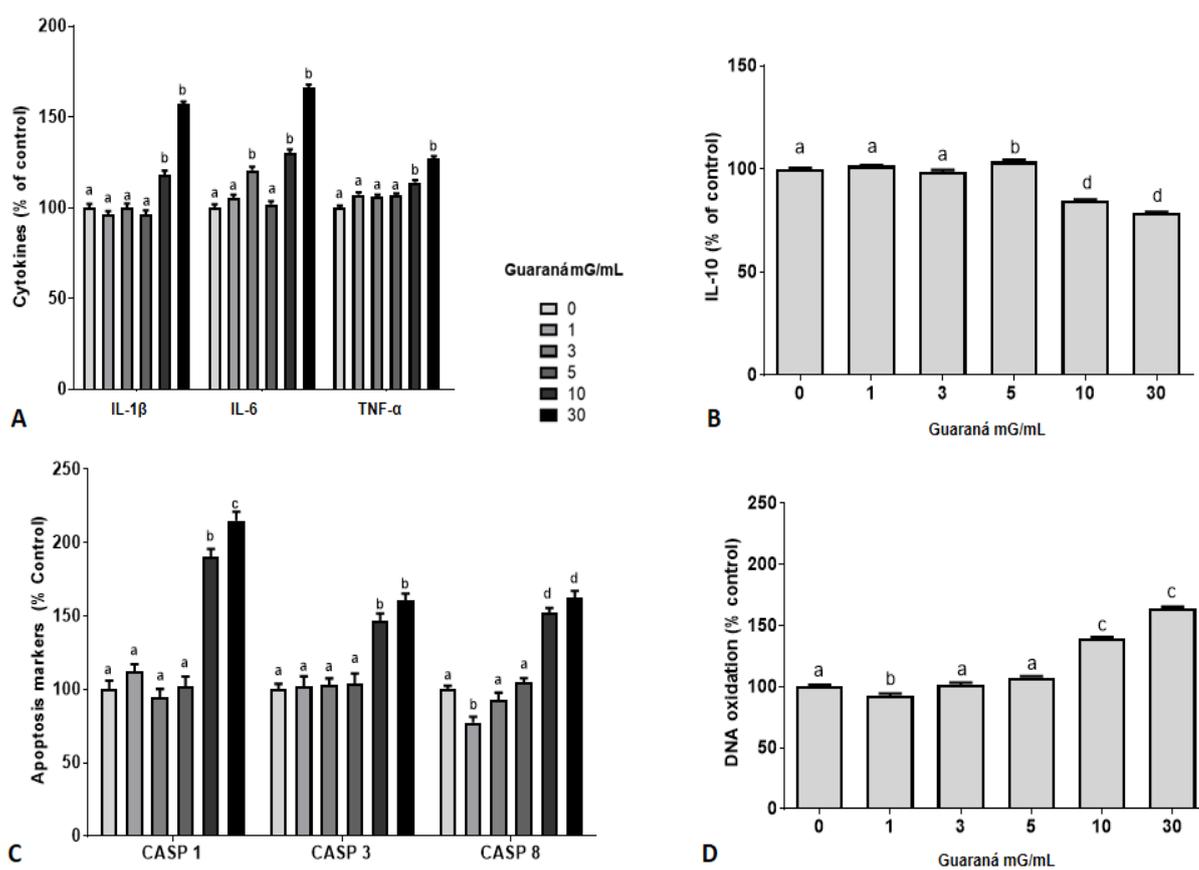


Fig 1: Effect of different concentrations of Guarana on fibroblast after 72 hours cell exposition in markers : inflammatory (A), anti-inflammatory (B), apoptosis (C) and oxidation of DNA (D). Effect was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C, D,) indicate statistical differences in each treatment at $p < 0.05$.

Modulation of pro-oxidative markers of fibroblasts triggered by interaction between Guarana and LLLT was analysed, and results are presented in Figure 2 (A to E). Guarana supplementation decreased significantly ROS, lipoperoxidation and DNA oxidation levels than control group. However, Guarana induced a slight but significant increase in protein carbonylation levels in comparison to control group. At contrary LLLT induced significant increase in ROS, protein carbonylation and lipoperoxidation levels, presenting a lowering effect just in DNA oxidation levels. Interaction between Guarana and LLLT triggered lower protein carbonylation, lipoperoxidation and DNA oxidation levels. However, ROS levels were not dropped in the presence of Guarana and LLLT.

Modulation of antioxidant enzyme levels was also compared among treatments (Figure 2E). SOD total levels increased significantly when fibroblasts were exposed to all treatment tested here. CAT levels increased significantly when cells were exposed just to Guarana or with Guarana plus LLLT. The levels of GPX enzyme increased significantly in cells just Guarana -exposed. This effect was also observed in cells just LLLT, but this effect was lower than Guarana treatment. Interaction between Guarana and LLLT also triggered an increase in GPX levels in comparison to control group.

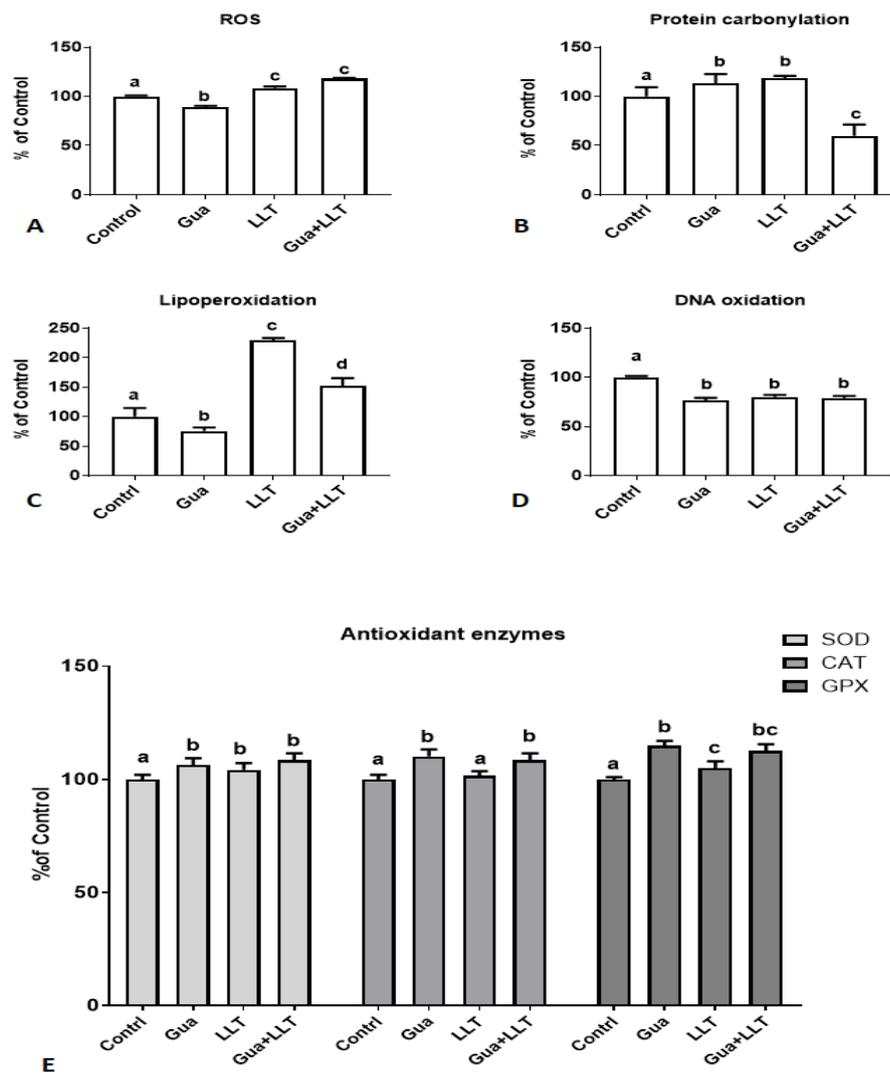


Fig 2: Effect of Guarana, low-level laser therapy (LLLT), and their association in oxidative stress markers: (A) Levels of Reactive oxygen species (ROS); (B) Carbonylation of proteins; (C) Lipoperoxidation (D) DNA oxidation and (E) Level of antioxidant enzymes Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione peroxidase (GPX). Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance followed by the Bonferroni post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C) indicate statistical differences in each treatment at $p < 0.05$.

The effect of interaction between Guarana and LLLT-exposure on modulation of protein and gene expression cytokines was analysed (Figure 3a). All treatments triggered decrease in pro-inflammatory cytokines and also caused a down-regulation in their genes. However, in IL-1 β this effect was significantly more accentuated in fibroblasts just LLLT-exposed. On the other hand, all treatments were able to increase IL-10 protein levels triggering over-expression of its gene. IL-10 gene modulation was higher in fibroblasts LLLT and Guarana plus LLLT-exposed than cells just Guarana exposed. CASP levels of fibroblasts were also differentially modulated by Guarana and LLLT-exposure (Figure 3B). In general, all treatments decreased significantly CASP 1, CASP 3 and CASP 8 protein levels. CASP 1 gene was downregulated by LLLT and Guarana plus LLLT treatments. CASP3 gene was downregulated by all treatments, whereas CASP 8 gene was downregulated by Guarana and Guarana plus LLLT-exposed fibroblasts.

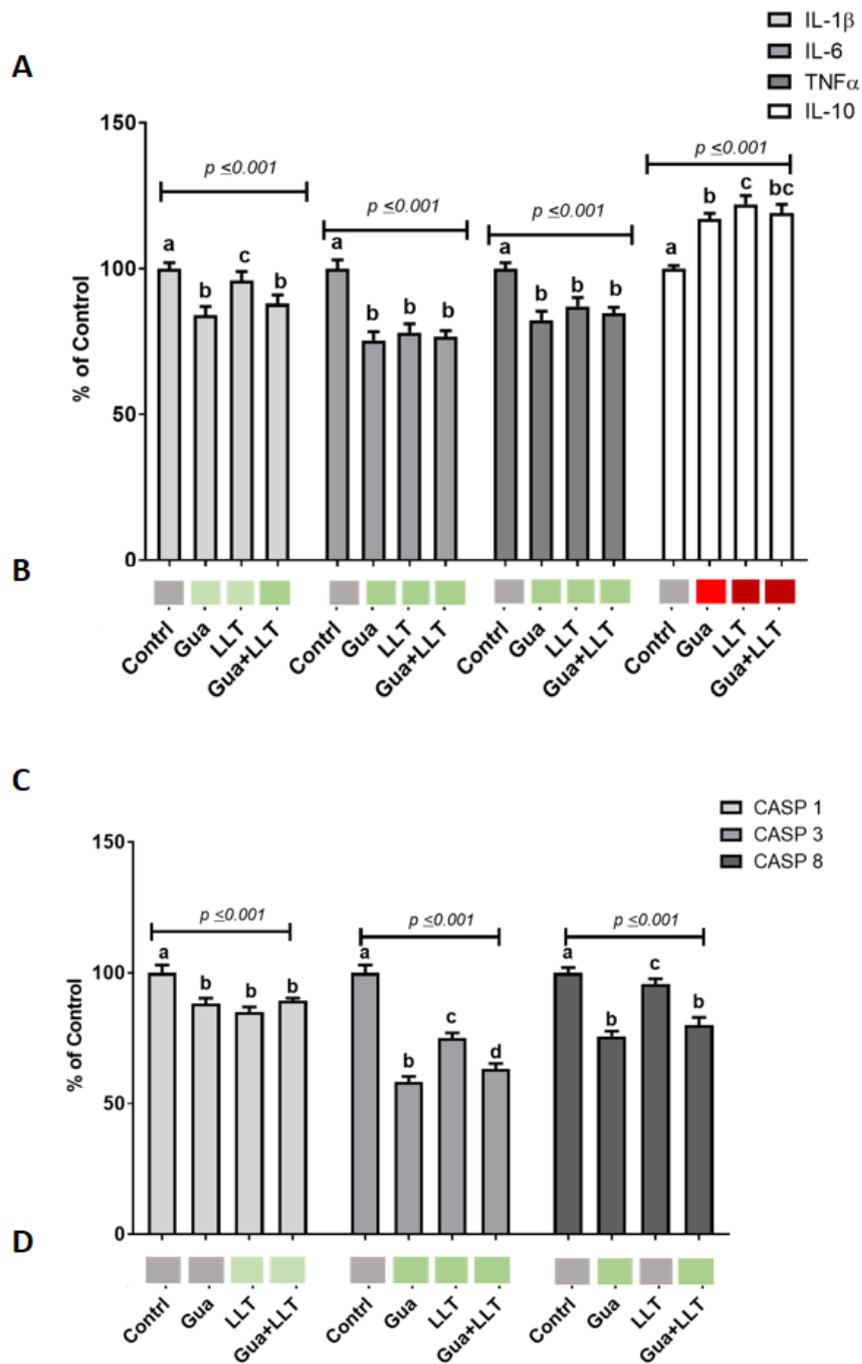


Fig 3: Effect of Guarana , low-level laser therapy (LLLT), and association in proteic levels and gene expression in fibroblasts. (A) Proteic levels and (B) gene expression cytokines: IL-1 β , IL-6, TNF- α (pro-inflammatory) and IL-10 (anti-inflammatory). (C) Proteic levels and (D) gene expression caspase. Treatments were statistically compared by ANOVA TwoOne-Way followed by Tukey post hoc test. Different letters identified concentrations with significant differences calculated by post hoc test ($p < 0.05$). Gene expressions of each cytokine and caspase are represented by coloured squares and were determined using untreated control group as reference to calculate the relative mRNA expression. The expression level of beta-actin was used as an internal control (housekeeping gene).

Indicators of Guarana plus LLLT effect on fibroblast proliferation in 72 h cell cultures was evaluated by cell cycle analysis using flow cytometry method and also by modulation of FGF-1 and KGF growth cellular signalling molecules and results are presented in Figure 4. As can see in Figure 1A and 1B, Guarana treatment decreased significantly number cells in S-phase than control group. However, LLLT presented an inverse action triggering significant increase in the frequency of S-phase cells. These results was significantly accentuated in fibroblast concomitantly exposed with Guarana plus LLLT. All treatments increased FGF-1 and KGF levels than control group. However, in cells treated with Guarana plus LLLT levels of FGF-1 were significantly higher than other treatments. On the other hand, KGF levels were significantly higher in cells just Guarana -exposed than other treatments.

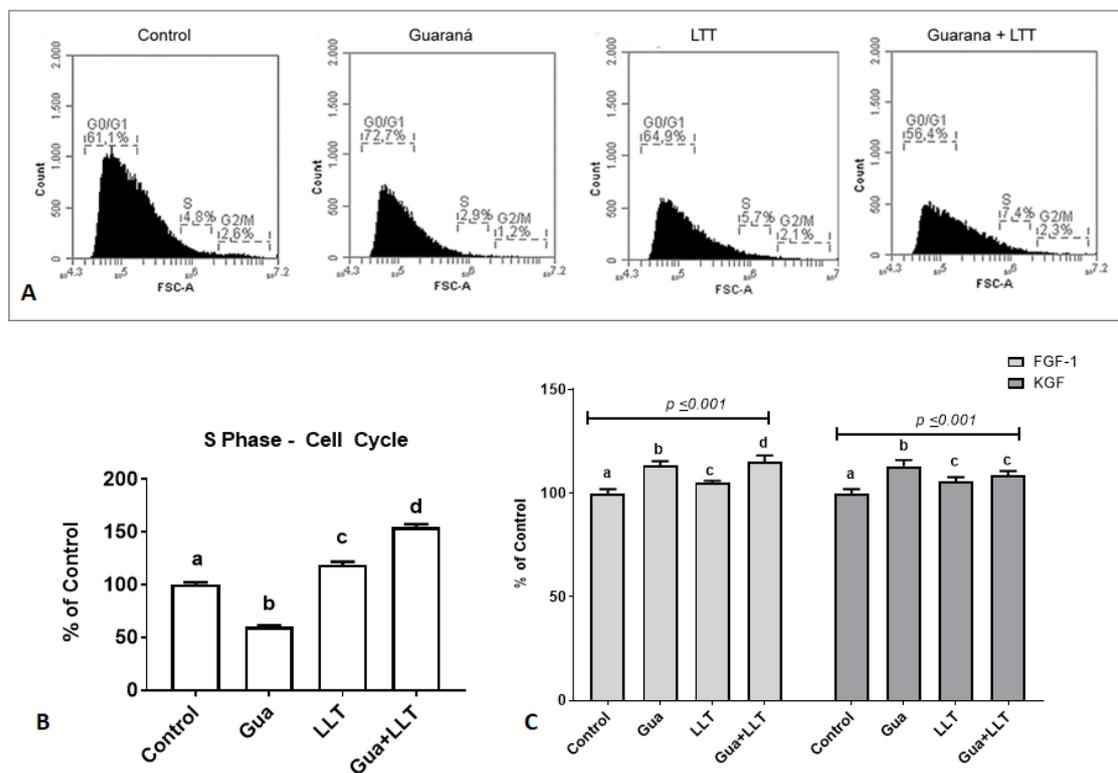


Fig 4: Effect of Guarana, LLLT, and association in fibroblasts, cell cycle determined by flow cytometry after 72 h exposition. (A) Representative graphics with cell phases: (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis). (B) % of cells the control in at each stage (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis) of the cell cycle. (C) proteic levels FGF and KGF-1. Analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C, D) indicate statistical differences in each treatment at $p < 0.05$.

Discussion

In the present investigation we analysed if potential interaction between LLLT and Guarana extract could present beneficial effects on dermal fibroblast cells. Initially we observed that Guarana did not present proinflammatory and apoptotic effect on fibroblasts at $< 10 \mu\text{g/mL}$ concentrations. As Guarana at 5 mG/mL trigger increase in IL-10 antiinflammatory cytokines this concentration was choosing to perform complementary protocols. In general, Guarana plus LLLT-exposure triggered antioxidant, antiinflammatory, antiapoptotic and proliferative effects on dermal fibroblasts. However, in some variables the beneficial effects on fibroblasts have also been observed in cells or just treated with Guarana or just LLLT-exposed. We will now discuss in more detail the main results obtained.

Initially it is important to point out that results presented here confirmed Guarana's antiinflammatory effect previously described by Krewer et al (6) and Suleiman et al (7). However, different of these studies, results described here were obtained from dermal fibroblast cells exposed to Guarana concentrations $\leq 10 \mu\text{g/mL}$. In fact, these cells can secret cytokines mainly when exposed to pollutant or pro-senescent agents (18, 19, 20, 4). From these results, Guarana at 5 mG/mL was used in subsequent protocols with and without LLLT.

In this point, it is relevant to comment that laser stimulation is a procedure widely used for clinical applications due its properties that did not cause iatrogenic malignancies, including LLLT therapy (22, 23,1). However, its beneficial effect is not universal and dependent of *in vitro* and *in vivo* treatment conditions. For this reason, in the present investigation was used a 4J/cm^2 LLLT-exposure based in results previously described by Maldaner et al (4) using same dermal fibroblast line (HFF-1). This LLLT-dosis was able to improve the levels of IL-10, an antiinflammatory cytokine mainly in cultures concomitantly exposed to H_2O_2 that at 50 uM concentration, is an accelerator of cellular senescence (24, 25, 26).

Considering the effects of Guarana plus LLLT-exposure on fibroblast oxidative metabolism results showed that this interaction triggered increase in total ROS levels than other treatments. On the other hand, this interaction has a lowering effect on protein carbonylation levels and also decreased lipoperoxidation levels caused in fibroblasts just LTTT-exposed.

There are growing evidences demonstrating that a low to moderate increase in ROS levels could result in a positive effect on many cellular processes, stimulating for example cellular proliferation. Previous studies have described that LLLT induced ROS could stimulate fibroblast proliferation as well as DNA synthesis cultured normal human keratinocytes, fibroblasts, osteoblasts, mesenchymal and cardiac stem cells and endothelial cells (1). Considering the results found here that showed an increase in the number of fibroblasts in the S phase, and also increase in the levels of the FGF-1 growth factor, it seems that elevate ROS levels triggered by Guarana plus LLLT had no negative effects.

This presumption is corroborated by results that also showed decreasing in the levels of protein carbonylation, lipoperoxidation and DNA oxidation in fibroblasts exposed to Guarana plus LLLT. Furthermore, all treatments have some slight effect on modulation of antioxidant enzymes. However, it important to comment that, cells just Guarana or LLLT-exposed also decreased DNA oxidation levels confirming independent genoprotective effect of both treatments as previously described in previous studies (4,7).

Modulation of inflammatory markers on fibroblast was evaluated and results showed that both, independent Guarana and LLLT treatments as well as Guarana plus LLLT-exposure presented an important lowering effect on protein and gene expression pro-inflammatory cytokines. On the other hand, all treatments were able to induce elevate levels of antiinflammatory IL-10 cytokine. These results could be relevant mainly in relation to IL-10. This antiinflammatory cytokine has been identified as a candidate scar-improving therapy

based on preclinical studies. Shi et al (27) showed that when human dermal fibroblasts were stimulated with TGF- β 1 and subsequently treated with IL-10 this cytokine presented inhibitory effects on the excessive deposition of extracellular matrix components and fibroblast-to-myofibroblast transition, suggesting that IL-10 has the potential therapy in prevention and reduction of skin scarring. From these results, recent studies have considered gene and protein modulation of IL-10 fibroblast as an important aspect of plant extracts with potential would healing effects (28).

All treatments were able to decrease levels of three caspases molecules that participate of intrinsic and extrinsic apoptosis via in the cells. During skin aging, oxidative stress can cause important DNA damage inducing apoptosis events in cells, such as fibroblasts. Previous studies have described potential antiapoptotic effect of LLLT in different types of cells (29, 30, 31). Antiapoptotic effect of fibroblast by catechin, that is part of Guarana chemical-matrix also have been described in the literature (32). It is probably that reduction of apoptotic events is related to important genoprotective effect observed in fibroblasts exposed to these treatments.

Most strong results considering the interaction between Guarana and LLLT exposure occurred in fibroblast cell cycle and modulation of FGF-1 levels. These results put in evidence potential benefice in this interaction. FGF-1 is considered a powerful mitogen that trigger stimulation of DNA synthesis and proliferation of a large types of cell types, including fibroblasts (17). Previous investigations, such as performed by Denadai et al (33) described that LLLT is able to up-regulate the FGF-1 gene expression in the healing of diabetic wounds. However, for our best knowledgment this is the first investigation describing FGF-1 modulation by Guarana extract. Despite all treatments increase significantly KGF-1 levels, this effect was relatively slight, and this result could be considered positive. In fact, KGF-1 is a key signalling molecule between fibroblast and -keratinocyte cells. However, in some

conditions, such as fibrotic disorders KGF-1 is overexpressed in the tissue (34). Therefore, high levels of KGF-1 could be not much desirable.

Conclusion

In conclusion, despite methodological constrains related to *in vitro* studies, the whole of results described suggest that independent and interactive use of Guarana and LLLT could be positive antioxidant, antiinflammatory, antiapoptotic and proliferative effect on fibroblasts.

References

1. Migliario M, Sabbatini M, Mortellaro C, Renò F. Near infrared low level laser therapy and cell proliferation: the emerging role of redox sensitive signal transduction pathways. *Journal of Biophotonics*. 2018;e201800025.
2. Zachary C. Facial Rejuvenation: 40th Anniversary Review. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 2016;35(6S):S122–4.
3. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2013;32(1):41–52.
4. Maldaner DR, Azzolin VR, Barbisan F, Mastela MH, Teixeira CF, Dihel A, Duarte T, Pellenz NL, Cruz IBM, Duarte MMMF (2018) In vitro effect of low-level laser therapy on the old-fibroblasts proliferative, apoptosis modulation and oxi-inflammatory markers hydrogen peroxide-induced *Laser in med sci*.
5. Schimpl FC, Da Silva JF, Gonçalves JFDC, Mazzafera P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 150: 14–31.
6. Krewer CDC, Suleiman L, Frescura Duarte MMM, Ribeiro EE, Mostardeiro CP, Echart Montano MA, et al. Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: Evidence from human in vitro and in vivo protocols. *European Food Research and Technology*. 2014;239(1):49–57.
7. Machado AK, Cadoná FC, Azzolin VF, Dornelles EB, Barbisan F, Ribeiro EE, et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Research International*. 2015;67:426–33.
8. Cadoná FC, Rosa JL, Schneider T, Cubillos-Rojas M, Sánchez-Tena S, Azzolin VF, et al. Guaraná, a Highly Caffeinated Food, Presents in vitro Antitumor Activity in Colorectal and Breast Cancer Cell Lines by Inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPKs Pathways. *Nutrition and Cancer*. 2017;69(5):800–10.
9. Bittencourt LS, Machado DC, Machado MM, Dos Santos GFF, Algarve TD, Marinowic DR, et al. The protective effects of guarana extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013;53:119–25.

10. Belliardo F, Martelli A, Valle MG. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (Guarana) and *Cola* spp. samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 1985;180(5):398–401.
11. Costa F, Barbisan F, Assmann CE, Araújo NKF, De Oliveira AR, Signori JP, et al. Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. *Zygote*. 2017;25(2):111–9.
12. Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim G Do. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cellular Immunology*. 2012;280(2):164–70.
13. Morabito C, Rovetta F, Bizzarri M, Mazzoleni G, Fanò G, Mariggiò MA. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;48(4):579–89.
14. Levine A, Thenhaken R, Dixon R, Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 1994;79(4): 583-593.
15. Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:251-256.
16. Barbisan F et al. The in vitro influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence. *Rejuven Res*. 2017;20(4).
17. Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, Berto MD, Barbisan F, Dornelles EB, et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicology in Vitro*. 2016;32:8–15.
18. Zeranska J, Pasikowska M, Szczepanik B, Mlosek K, Malinowska S, Debowska RM, et al. A study of the activity and effectiveness of recombinant fibroblast growth factor (Q40P/S47I/H93G rFGF-1) in anti-aging treatment. *Postepy Dermatologii i Alergologii*. 2016;33(1):28–36.
19. Lee DC, Choi H, Oh JM, Hong Y, Jeong SH, Kim CS, Kim DK, Cho WK, Kim SW, Kim SW, Cho JH, Lee J. The effect of urban particulate matter on cultured human nasal fibroblasts. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:58-73.
20. Shirato K, Koda T, Takanari J, Sakurai T, Ogasawara J, Imaizumi K, et al. Anti-Inflammatory Effect of ETAS®50 by Inhibiting Nuclear Factor- κ B p65 Nuclear Import in Ultraviolet-B-Irradiated Normal Human Dermal Fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018:1–8.
21. Kitahiro Y, Koike A, Sonoki A, Muto M, Ozaki K, Shibano M. Anti-inflammatory activities of *Ophiopogonis Radix* on hydrogen peroxide-induced cellular senescence of normal human dermal fibroblasts. *Journal of Natural Medicines*. 2018; 2018:1-10.
22. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*. 2010; 6: 12–21.
23. Bayat M, Virdi A, Jalalifiroozkouhi R, Rezaei F. Comparison of effects of LLLT and LIPUS on fracture healing in animal models and patients: A systematic review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2018; 132: 3–22.
24. Yan J, Wang J, Huang H, Huang Y, Mi T, Zhang C, et al. Fibroblast growth factor 21 delayed endothelial replicative senescence and protected cells from H₂O₂-induced premature senescence through SIRT1. *American Journal of Translational Research*. 2017;9(10):4492–501.
25. Ortiz-Espín A, Morel E, Juarranz Á, Guerrero A, González S, Jiménez A, et al. An Extract from the Plant *Deschampsia antarctica* Protects Fibroblasts from Senescence Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:1–16.

26. Devi S, Kumar N, Kapila S, Mada SB, Reddi S, Vij R, et al. Buffalo casein derived peptide can alleviate H₂O₂ induced cellular damage and necrosis in fibroblast cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2017;69(7):485–95.
27. Shi JH, Guan H, Shi S, Cai WX, Bai XZ, Hu XL, et al. Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. *Archives of Dermatological Research*. 2013;305(4):341–52.
28. Czemplik M, Korzun-Chłopicka U, Szatkowski M, Działo M, Szopa J, Kulma A. Optimization of Phenolic Compounds Extraction from Flax Shives and Their Effect on Human Fibroblasts. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 2017:1–10.
29. Pansani TN, Basso FG, Turrioni APS, Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy and epidermal growth factor on the activities of gingival fibroblasts obtained from young or elderly individuals. *Lasers in Medical Science*. 2017;32(1):45–52.
30. Yin K, Zhu R, Wang S, Zhao RC. Low-Level Laser Effect on Proliferation, Migration, and Antiapoptosis of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 2017;26(10):762–75.
31. Chu YH, Chen SY, Hsieh YL, Teng YH, Cheng YJ. Low-level laser therapy prevents endothelial cells from TNF- α /cycloheximide-induced apoptosis. *Lasers Medicine Science*. 2018; 33(2):279–286
32. Tanigawa T, Kanazawa S, Ichibori R, Fujiwara T, Magome T, Shingaki K, et al. (+)-Catechin protects dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014;14:133.
33. Denadai AS, Aydos RD, Silva IS, Olmedo L, de Senna Cardoso BM, da Silva BAK, et al. Acute effects of low-level laser therapy (660 nm) on oxidative stress levels in diabetic rats with skin wounds. *Journal of experimental therapeutics & oncology*. 2017;11(2):85–9.
34. Canady J, Arndt S, Karrer S, Bosserhoff AK. Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(3):647–57.

5 DISCUSSÃO

O LBP é um procedimento clínico candidato a ser usado na desaceleração dos processos de envelhecimento dos fibroblastos (ZACHARY et al., 2016). Portanto, esta investigação procurou contribuir para o teste desta hipótese através de uma análise *in vitro* envolvendo fibroblastos expostos a diferentes dosagens de LBP associado ou não com uso H_2O_2 como indutor de senescência celular. Em geral, a exposição ao LBP causou efeitos positivos e negativos nos fibroblastos de forma dependente da dose de irradiação. O LBP em doses $<4 J/cm^2$ não afetou a mortalidade celular, a oxidação do DNA e os marcadores apoptóticos (CASP 1, 3 e 8) quando os resultados são comparados com as células controle (não tratadas).

Por outro lado, doses maiores de LBP desencadearam aumento nos níveis de marcadores cito-genotóxicos e enzimas antioxidantes. Além disso, doses maiores de LBP levam ao aumento das concentrações citocinas pró-inflamatórias, indicando a ocorrência de um estado pró-inflamatório nessas células. No entanto, a interação entre a concentração de $50 \mu M$ de H_2O_2 e a dose de $4J/cm^2$ de LBP sugeriu que este tratamento foi capaz de minimizar os marcadores senescentes de fibroblastos aqui estudados, uma vez que o H_2O_2 tem papel pró-indução de senescência celular. Apesar das limitações metodológicas relacionadas com estudos *in vitro*, estes resultados podem ser considerados relevantes em relação à questão dos efeitos LBP no envelhecimento dos fibroblastos, sendo evidenciados nos resultados posteriores.

Consideramos relevante destacar que a estimulação a laser é um procedimento amplamente utilizado para aplicações clínicas devido às suas propriedades benéficas, incluindo a terapia com LBP (BAYAT et al., 2018; MIGLIARIO et al., 2018; VERMA; STEFFACCI, 2010). Nossos estudos indicam, ação dose-dependente do laser, uma vez que observamos que doses mais altas de LBP desencadearam efeito citogenotóxico incluindo indução de apoptose. Esses resultados eram esperados, uma vez que está bem estabelecido que a resposta biológica à estimulação por LBP é dependente de vários parâmetros, incluindo comprimento de onda, irradiância, tempo, pulso, polarização e outros (RAMOS et al., 2018; YAN et al., 2017).

Estes resultados nos permitiram inferir a menor dose de exposição ao LBP nos parâmetros estabelecidos para este estudo, que poderia ter efeitos benéficos na reversão de alterações causadas pela exposição temporária de fibroblastos ao H_2O_2 . De fato, o H_2O_2 é uma

importante molécula biológica, pois em concentrações baixas e controladas é uma molécula sinalizadora reguladora que possui diversas ações, incluindo a regulação dos estados proliferativos de algumas células. No entanto, quando o H_2O_2 está presente em altas concentrações, a $50\mu M$, sua molécula desencadeia eventos celulares, em fibroblastos intimamente relacionados às características da senescência. Por essa razão, a exposição de fibroblastos ao H_2O_2 , como usada aqui, é considerada um bom modelo *in vitro* para se compreender mecanismos e identificar moléculas regulatórias relacionadas à senescência replicativa e outras características do envelhecimento (DEVI et al., 2017; HUANG et al., 2016).

Os resultados obtidos a partir de fibroblastos expostos apenas ao LBP mostraram que a dose $< 4 J/cm^2$ proporcionou um ligeiro aumento nos níveis de IL-1, enquanto outras citocinas pró-inflamatórias não foram moduladas por este tratamento. Por outro lado, estas doses de LBP foram capazes de melhorar os níveis de IL-10, uma citocina antiinflamatória. Uma investigação realizada por Silveira e colaboradores (2016) relatou que, em ratos, a LBP (3 a 5 J/cm^2) é capaz de prevenir o estado patológico induzido por trauma muscular. Os resultados desta investigação relataram que após 2 h ocorreu redução em vários marcadores oxidativos, bem como aumento nos níveis de enzimas antioxidantes, especialmente com uso da dose de 3 J/cm^2 .

Ainda, o LBP parece ser capaz de modular vários genes relacionados aos processos de cicatrização de lesões cutâneas pois evidências anteriores mostraram que o tratamento com LBP atua no processo de cicatrização de feridas aumentando a migração de queratinócitos (SZEZEBATY et al., 2018), contribuindo também na organização da matriz extracelular pelo aumento da produção de colágeno, além de outros fatores teciduais como a matriz metaloproteinase-2 (MMP-2) (MIGLIARIO et al., 2018). Um estudo recente descreveu que o LBP (1 a 5 J/cm^2) induziu a síntese proteica *in vitro* em fibroblastos aumentando a expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é uma importante molécula que estimula a formação de vasos sanguíneos. No mesmo estudo, os autores também observaram a regulação negativa da expressão gênica da IL-6 nessas células (YAN et al., 2017).

Quando as células eram previamente expostas ao H_2O_2 , a ação do LBP sobre o fibroblasto era mais pronunciada, já que esse tratamento foi capaz de prevenir a mortalidade celular, a oxidação do DNA e o aumento dos níveis de CASPs causados pela exposição ao H_2O_2 . Semelhante ao estudo realizado por Silveira e colaboradores (2016), o LBP diminuiu significativamente os níveis das três principais enzimas antioxidantes avaliadas aqui: SOD,

CAT e GPX. Em geral, o LBP também reduziu, pelo menos parcialmente, os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentou os níveis de IL-10. Na verdade, a propriedade antiinflamatória do tratamento com LBP tem sido descrita em estudos anteriores, como os realizados por Da Ré Guerra e colaboradores (2016), avaliando a ação após trauma físico (tenotomia parcial). Portanto, resultados completos sugerem que o LBP pode modular alguns marcadores apopticos, oxidativos e inflamatórios presentes nos fibroblastos com envelhecimento induzidos por H₂O₂.

Uma análise complementar foi realizada para determinar se o LBP também poderia atuar no estado proliferativo de fibroblastos expostos a H₂O₂. Surpreendentemente, a análise do ciclo celular em culturas de 72 horas não mostrou mudança significativa na frequência das fases S e G2 no controle de fibroblastos ou quando expostos isoladamente ao H₂O₂ ou LBP. Porém, a interação entre H₂O₂ e LBP alterou esse resultado, já que nesse tratamento ocorreu aumento na frequência de células que estavam nas fases S/G2 do ciclo celular.

Como este resultado pode ser confuso, uma vez que apenas a proliferação não reflete necessariamente um estado proliferativo desejado dos fibroblastos, a análise de dois importantes marcadores de fatores de crescimento também foi realizada. O primeiro marcador estudado foi o FGF-1. Esta molécula é um poderoso mitógeno envolvido na estimulação da síntese de DNA e na proliferação de uma ampla variedade de tipos de células, incluindo fibroblastos. Por essa razão, o FGF-1 recombinante está sendo desenvolvido e estudos como Żerańska e colaboradores (2016), mostraram que essa molécula estimulou fortemente a proliferação de fibroblastos e queratinócitos. Em nossos resultados, o fibroblasto exposto apenas a H₂O₂ apresentou níveis mais baixos de FGF-1, enquanto que as células expostas apenas a LBP apresentaram níveis semelhantes desta molécula as células controle. No entanto, a interação entre H₂O₂ e LBP reverteu os níveis mais baixos de FGF-1 desencadeados pelo H₂O₂, indicando que em alguns “estados de fibroblastos envelhecidos” o LBP poderia ajudar a estimular a proliferação de células da pele. Essa sugestão é corroborada por uma investigação prévia que descreveu a propriedade do LBP para regular positivamente a expressão do gene FGF-1 na cicatrização de lesões diabéticas (DENADAI et al., 2017).

A interação entre a exposição a H₂O₂ e LBP também aumentou os níveis da molécula de KGF-1, que também é membro de uma família de fatores de crescimento que apresentam ampla atividade mitogênica e de sobrevivência celular e, é considerada uma molécula crucial na interrelação entre queratinócitos e fibroblastos (CANADY et al., 2013). No entanto, os resultados aqui encontrados não mostraram um aumento expressivo nos níveis de KGF-1, apesar de as células tratadas apenas com LBP apresentarem concentrações semelhantes desta

molécula do que os fibroblastos de controle, a interação entre H_2O_2 e LBP induziu um aumento nos níveis de KGF-1, porém essa indução foi considerada leve, uma vez que foi inferior a 20% quando comparado ao grupo controle não tratado. Isto pode ser considerado positivo, pois em algumas situações, como os distúrbios fibróticos, o KGF-1 pode ser superexpresso no tecido e desencadear alterações cicatriciais importantes (PANSANI et al., 2017).

Em um segundo momento analisamos se a interação entre o LBP e o extrato de guaraná poderia apresentar efeitos benéficos sobre as células fibroblásticas humanas. Inicialmente, observou-se que o guaraná não apresentou efeito pró-inflamatório e apoptótico nos fibroblastos em concentrações <10 mg/mL. Como o guaraná a 5 mg/mL desencadeou aumento nos níveis da citocina antiinflamatórias IL-10, optou-se por esta concentração como de escolha para realização dos protocolos complementares. Em geral, o guaraná associado à exposição ao LBP desencadeou efeitos antioxidantes, antiinflamatórios, antiapoptóticos e proliferativos nos fibroblastos dérmicos senescentes. No entanto, em algumas variáveis, os efeitos benéficos nos fibroblastos também foram observados em células tratadas com guaraná ou expostos ao LBP isoladamente.

É importante ressaltar que os resultados aqui apresentados confirmam o efeito antiinflamatório do guaraná descrito anteriormente por Krewer et al. (2014) e Suleiman et al (2015). Entretanto, diferentemente desses estudos, os resultados aqui descritos foram obtidos de células fibroblásticas dérmicas expostas a concentrações de guaraná < 10 mg/mL. De fato, essas células podem secretar citocinas principalmente quando expostas a agentes poluentes ou pró-senescentes (LEE et al., 2018; SHIRATO et al., 2018; KITAHIRO et al., 2018). A partir desses resultados, o guaraná a 5 mg/mL foi utilizado nos protocolos subsequentes com e sem LBP na dose de $4 J/cm^2$, baseado nos resultados descritos anteriormente.

Considerando os efeitos do guaraná associado a exposição ao LBP no metabolismo oxidativo dos fibroblastos, os resultados mostraram que essa interação desencadeou um aumento nos níveis de EROs totais maior que nos outros tratamentos. Por outro lado, essa interação tem efeito redutor sobre os níveis de carbonilação de proteínas e também diminui os níveis de lipoperoxidação causados em fibroblastos expostos apenas ao LBP. Em contrapartida, a associação dos tratamentos mostrou ação antioxidante por ter atuado positivamente na expressão das enzimas SOD, CAT e GPX.

Existem crescentes evidências demonstrando que um aumento baixo a moderado nos níveis de EROs pode resultar em um efeito positivo em muitos processos celulares, estimulando, por exemplo, a proliferação celular (NESTOR et al., 2017). Estudos anteriores

descreveram que as EROs induzidas por LBP poderiam estimular a proliferação de fibroblastos, bem como a síntese de DNA de queratinócitos humanos normais, fibroblastos, osteoblastos, células-tronco mesenquimais e cardíacas e células endoteliais (MIGLIARIO et al., 2018; SZEZERBATY et al., 2018). Considerando os resultados encontrados aqui que mostraram um aumento no número de fibroblastos na fase S, e também aumento nos níveis do fator de crescimento FGF-1, pode-se inferir que os níveis elevados de EROs desencadeados pelo guaraná mais o LBP não promoveram efeitos negativos.

Esta presunção é corroborada por resultados que também mostraram decréscimo nos níveis de carbonilação protéica, lipoperoxidação e oxidação do DNA em fibroblastos expostos ao guaraná associado ao LBP. Além disso, todos os tratamentos têm algum efeito ligeiro sobre a modulação de enzimas antioxidantes. No entanto, é importante comentar que células expostas exclusivamente ao guaraná ou ao LBP também diminuiriam os níveis de oxidação do DNA, confirmando o efeito genoprotetor independente de ambos os tratamentos, como descrito em estudos anteriores (MACHADO et al., 2015; FUKUOKA et al., 2017).

A modulação de marcadores inflamatórios em fibroblastos foi avaliada e os resultados mostraram que tanto o tratamento independente com guaraná e LBP quanto o associação apresentaram um importante efeito de redução na expressão proteica e de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, todos os tratamentos foram capazes de induzir elevação dos níveis de citocinas antiinflamatórias. Esses resultados podem ser relevantes principalmente em relação à IL-10. Essa citocina antiinflamatória foi identificada como uma terapia candidata para melhoria de cicatrizes, baseada em estudos pré-clínicos. Shi e colaboradores (2010), mostraram que quando fibroblastos dérmicos humanos foram estimulados com TGF- β 1 e subsequentemente tratados com IL-10, essa citocina apresentou efeitos inibitórios sobre a deposição excessiva de componentes da matriz extracelular e transição de fibroblastos para miofibroblastos, sugerindo que IL-10 tem o potencial terapêutico na prevenção e redução de cicatrizes cutâneas. A partir desses resultados, estudos recentes consideraram que tratamentos capazes de atuar na modulação de genes da IL-10 do fibroblasto possuem um aspecto curativo importante (CZEMPLIK et al., 2017).

Todos os tratamentos desta investigação foram capazes de diminuir os níveis de três moléculas de caspases que participam das vias da apoptose intrínseca e extrínseca nas células. Durante o envelhecimento da pele, o estresse oxidativo pode causar danos importantes no DNA, induzindo eventos de apoptose nas células, como os fibroblastos. Estudos anteriores descreveram o potencial efeito antiapoptótico do LBP em diferentes tipos de células (PANSANI et al., 2014; YIN et al., 2017; CHU et al., 2018). O efeito antiapoptótico do

fibroblasto pela catequina, que faz parte da matriz química do guaraná, também tem sido descrito na literatura (TANIGAWA et al., 2014). É provável que a redução de eventos apoptóticos esteja relacionada ao importante efeito genoprotetor observado nos fibroblastos expostos a esses tratamentos isolados e em conjunto.

Os resultados mais relevantes considerando a interação entre a exposição ao guaraná e ao LBP ocorreram no ciclo celular dos fibroblastos e na modulação dos níveis de FGF-1. Esses resultados colocam em evidência o potencial benefício nessa interação. Como já relatado anteriormente, investigações realizadas por Denadai et al. (2017), descreveram que o LBP é capaz de regular positivamente a expressão do gene FGF-1 assim como neste estudo. Entretanto, para nosso conhecimento, esta é a primeira investigação descrevendo a modulação positiva do FGF-1 pelo tratamento com o extrato de guaraná, o que sugere uma interação positiva deste extrato com a cicatrização e reparo tecidual. Apesar de todos os tratamentos aumentarem os níveis de KGF-1, este efeito foi relativamente pequeno, e este resultado pode ser considerado positivo, pois níveis elevados de KGF-1 são encontrados em distúrbios fibróticos (CANADY et al., 2013), ou seja, a superexpressão deste está relacionada com a desregulação da produção de colágeno.

Em resumo, todos os resultados aqui descritos sugeriram que a exposição à LBP em fibroblastos sem qualquer lesão é relativamente segura e inócua, considerando seus potenciais efeitos citogenotóxicos, oxi-inflamatórios e proliferativos. Por outro lado, em fibroblastos H₂O₂-lesados que mimetizam características de células envelhecidas, a LBP apresentou um importante efeito protetor e proliferativo, revertendo parcialmente ou totalmente os efeitos negativos desencadeados pelo H₂O₂. Nestes termos, é possível inferir que, na dose de 4 J/cm², o LBP pode apresentar algumas propriedades antienvhecimento. E, apesar dos constrangimentos metodológicos relacionados aos estudos *in vitro*, todos os resultados descritos sugerem que o uso independente e interativo do guaraná e LBP pode ter um efeito antioxidante, antiinflamatório, antiapoptótico e proliferativo nos fibroblastos.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados a partir da realização desse estudo é possível concluir que:

- Dentre as doses de LBP avaliadas, a de 4 J/cm^2 apresentou efeito citoprotetor mais relevante e foi capaz de diminuir os efeitos citotóxicos, inflamatórios, apoptóticos gerados pela exposição ao H_2O_2 , além de favorecer a proliferação dos fibroblastos senescentes.

- A associação do tratamento de LBP (4 J/cm^2) ao guaraná (5 mg/mL) mostrou-se importante na modulação da resposta inflamatória e apoptótica frente ao H_2O_2 , sendo mais relevante a ação pró-proliferativa destes tratamentos com acréscimo no percentual de células na fase S e aumento da expressão de FGF-1.

- Em face da demanda pela busca por uma melhor aparência estética, este estudo demonstrou que a associação do LBP com o Guaraná pode compor uma nova possibilidade terapêutica para o tratamento do envelhecimento cutâneo.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM L.; KIERSZENBAUM, P. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 3ª ed. São Paulo: Elsevier, 2012.

AGNE, J. E. **Eletrotermofototerapia**. Santa Maria: O autor, 2013.

AGNE, J. E. **Eletrotermofototerapia**. 3 ed. Santa Maria: O autor, 2017.

ALDAG, C.; TEIXEIRA, D. N.; LEVENTHAL, P. S. Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: a review of the literature. **Clin Cosmet and Invest Dermat**, v. 9, n. 4, p. 411-419, 2016.

ANDRÉ, A. L. R.; TOFALINE, F. S. **Qual o papel do fator nuclear kappab (NF-KB) na Obesidade?**. 2008, 87 f. Trabalho de Conclusão (Graduação em Nutrição)-UNI, Belo Horizonte, MG, 2008.

ANDRISIC, L. et al . Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. **Redox Biol**, v.14, n.1, p.47 - 58, 2018.

ANGELO, P. C, et al. Guarana (Paullinia cupana var. sorbilis Mart var. sorbilis), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Rep**, v. 27, n. 1, p. 117-124, jan, 2008.

ARANTES, L. P., et al. Guarana (Paullinia cupana var. sorbilis Mart Mart.) attenuates methylmercury-induced toxicity in Caenorhabditis elegans. **Toxicol Res**, v. 5, n. 6, p. 1629-1638, nov, 2016.

AZZOLIN V. F., et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. **Toxicology In Vitro**, v. 32, p. 8-15, apr. 2016.

AZULAY, R.D.; AZULAY, D.R.; AZULAY-ABULAFIA, L. **Dermatologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BAKOS, R. M. **Efeitos agudos da radiação ultravioleta B na expressão imunoistoquímica das metaloproteinases -2 e -9 em nevos melanócitos**. 2005. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

BARANDALLA, M. et al. Global gene expression profiling and senescence biomarker analysis of hESC exposed to H2O2 induced non-cytotoxic oxidative stress. **Stem Cell Res Ther**, v.8, n.1, p.160 -168, 2017.

BARBA, J.; RIBEIRO, E. R.. Efeitos da microdermoabrasão no envelhecimento facial. **Rev Inspir**, v. 1, n. 1, 2009.

BARBISAN, F. **Efeito farmacogenético e farmacogenômico do metotrexato na resposta citotóxica de células mononucleares periféricas do sangue**. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

- BARBISAN, F et al. The in vitro influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence. **Rejuv Res**, v. 20, n. 4, maio, 2017.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana var. sorbilis* Mart Mart. **J Ethnopharmacol**, v. 102, p. 32-36, 2005.
- BHATIA-DEY, N. et al. Cellular Senescence as the Causal Nexus of Aging. **Front Genet**, v.7, n.13, p. 1 – 9, 2016.
- BAYAT, M. et al. Comparison of effects of LLLT and LIPUS on fracture healing in animal models and patients: A systematic review. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 132, p. 3-22, 2018.
- BELLICANTA, P. L. **Efeito da Microgravidade Simulada em Fibroblastos de Pele Humana**. 2016, 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica)-Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2016.
- BELYKH, E. et al. Laser application in neurosurgery. **Surg Neurol Int**, v. 9, n. 8, p. 274 - 283, 2017.
- BENTO, B. S. **Fotoenvelhecimento cutâneo processo e produtos**. 2015, 78f. Dissertação (Mestrado integrado em ciências farmacêuticas)-Instituto superior de ciências da saúde Egas Moniz,[s.l.], 2015.
- BITTENCOURT, L. S. et al. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana var. sorbilis* Mart) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and Chem Toxic**, v. 53, p. 119–125, 2013.
- BORGES, F. dos S.; SCORZA, F. A. **Terapêuticas em estética**. São Paulo: Phorte, 2016.
- BRAND, R. M. et al. A Topical Mitochondria-Targeted Redox Cycling Nitroxide Mitigates Oxidative Stress Induced Skin Damage. **J Invest Dermatol**, v. 137, n. 3, p.576-586, 2016.
- CADET, J; WAGNER, R. Radiation-induced damage to cellular DNA: Chemical nature and mechanisms of lesion formation. **Radiat Phys and Chem**, v. 128, p. 54-59, 2016.
- CAMPOS, M. P. et al. Cancer-related fatigue: a review. **Rev Assoc Med Bras**, v. 57, p. 211-219, 2011.
- CANADY, J. et al. Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 3, p. 647-657, 2013.
- CARNEIRO, J. R et al. IL-2, IL-5, TNF- α and IFN- γ mRNA expression in epidermal keratinocytes of systemic lupus erythematosus skin lesions. **Clinics**, v. 66, 2011.
- CARVALHO, M. R. **Fatores de crescimento para tratamento de úlceras venosas: revisão sistemática e metanálise**. 2016, 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Cuidado em

Saúde)-Universidade Federal Fluminense, 2016.

CARVALHO, N. C. et al. Analysis of Aloe vera cytotoxicity and genotoxicity associated with endodontic medication and laser photobiomodulation. **J Photochem Photobiol**, v.1, n.178, p. 348–354, 2018.

CATARINO, H. L. C. et al. InGaP 670-nm laser therapy combined with a hydroalcoholic extract of *Solidago chilensis* Meyen in burn injuries. **Lasers Med Sci**, v.30, n.3, p.1069-1079.

CESCATO, V. A. **Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, Bax e caspase-3 adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral**. 2010, 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHANDRA, J., SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p.:323-333, ago., 2000.

CHAVES, M. E. A., et al. Effects of low-power light therapy on wound healing:LASER x LED. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 4, p. 616-623, 2014.

CHEN, L.; HU, J. Y; WANG, S. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. **J Am Academi Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013-1024, 2012.

CHRISTOFOLETTI, D. C. et al. Ações do laser e da microcorrente em lesões cutâneas. **An Prod de In Cient Discente**, v. 13, n. 16, p. 93-101, 2010.

CHU, Y. H. et al. Low-level laser therapy prevents endothelial cells from TNF- α /cycloheximide-induced apoptosis. **Lasers Med Sci**, v. 33, n. 2, p. 279-286, 2018.

COLE M. A., et al. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. **J Cell Commun Signal**, v. 12, n. 1, p. 35-43, 2018.

CZEMPLIK, M. et al. Optimization of Phenolic Compounds Extraction from Flax Shives and Their Effect on Human Fibroblasts. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2017, Article ID:3526392, 2017.

DALGOBBO, P. C. **Estética facial essencial: orientação para o profissional de estética**. São Paulo: Atheneu, 2010.

DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. Guarana powder polysaccharides: characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food Chem**, v. 134, n. 4, p. 1804-1812, 2012.

DA RÉ GUERRA, F. et al. Low-level laser therapy modulates pro-inflammatory cytokines after partial tenotomy. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 4, p. 759-766, 2016.

DENADAI, A. S. et al. Acute effects of low-level laser therapy (660 nm) on oxidative stress levels in diabetic rats with skin wounds. **J Exp Ther Oncol**, v. 11, n. 2, p. 85-89, 2017.

DEVI, S. et al. Buffalo casein derived peptide can alleviate H₂O₂ induced cellular damage and necrosis in fibroblast cells. **Exp Toxicol Pathol**, v. 69, n. 7, p. 485-495, 2017.

DIHL, R. R.; LEHMANN, F. K. M. **Estudo da pele**. Canoas: ULBRA, 2011.

DONADUSSI, M. **Revisão sistemática da literatura sobre a efetividade clínica do plasma rico em plaquetas para o tratamento dermatológico estético**. 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde)-Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2012.

ECKERSLEY, A. et al. Structural and compositional diversity of fibrillin microfibrils in human tissues. **J Biol Chem**, v. 293, n.14, p. 5117-5133, 2018.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Rev Cont Saúde**, [S.l.], v. 11, n. 20, p. 93-102, 2013.

FABI, S.; SUNDARAM, H. The Potential of Topical and Injectable Growth Factors and Cytokines for Skin Rejuvenation. **Facial Plast Surg**. v. 30, p. 157–171, 2014.

FRANCISCHETTI, I, et al. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

FUKUOKA, C. Y. et al. The Effects of Low-Power Laser Irradiation on Inflammation and Apoptosis in Submandibular Glands of Diabetes-Induced Rats. **Plos One**, v. 18, jan. 2017.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2017.

GINANI, F., et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Lasers Med Sci**, out, 2017.

GRIVICICH V.; REGNER A.; ROCHA A. B. Morte celular por apoptose. **Rev Bras de Cancerol**, v. 52, n. 03, p. 335-343, 2007.

GUERREIRO, R.; COSTA, Q. S.; PEREIRA, J. M. A. As quimiocinas e os seus receptores: Características e Funções Fisiológicas. **Acta Med Port**, v. 24, p. 967-976, 2011.

HAN, H.; ROAN, F.; ZIEGLER, S.F. The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines. **Immunolog Rev**, v.278, n.1, p. 116-130, 2017.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3 ed. São Paulo: Senac, 2011.

HERTZ, E. et al. Effect of Paullinia cupana var. sorbilis Mart on MCF 7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. **Mol Clin Oncol**, v. 3, p. 37-43, 2015.

HÖHN, A. et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox Biol**, v.1, n.1, p. 482-501, 2017.

HOURELD, D. N.; ABRAHAMSE, H. Irradiation with a 632.8 nm Helium-Neon Laser with 5 J/cm² Stimulates Proliferation and Expression of Interleukin-6 in Diabetic Wounded

Fibroblast Cells. **Diab Technol Therap**, v. 9, n. 5, 2007.

HUANG, C. et al. Light-Emitting Diode Irradiation (640 nm) Regulates Keratinocyte Migration and Cytoskeletal Reorganization Via Hypoxia-Inducible Factor-1 α . **Photomed Laser Surg**, v. 34, n. 8, p. 313-320, 2016.

JENTZSCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radic Biol Med**, v. 20, n. 1, p. 251-256, 1996.

JERONIMO, M. C. **Caracterização química, físico-química, atividade antioxidante e Avaliação dos efeitos citotóxicos da pitáia-vermelha [Hylocereus Undatus (haw.) Britton & rose] cultivada no Brasil.** 2016, 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade de Brasília. Brasília, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica I.** 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAMIZATO, K. K. ; BRITO, G. S. **Técnicas estéticas faciais.** 1ed. São Paulo: Érica, 2014.

KEDE, M. P.V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética.** 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

KITAHIRO, Y. et al. Anti-inflammatory activities of Ophiopogonis Radix on hydrogen peroxide-induced cellular senescence of normal human dermal fibroblasts. **J Nat Med**, 2018, 10.1007/s11418-018-1223-9

KOBER, H. et al. Genoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (Paullinia cupana var. sorbilis Mart Mart. var. sorbilis) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Drug Chem Toxicol**, v. 39, p. 48-52, 2016.

KREWER, C. C. et al. Habitual intake of Guaraná and metabolic morbidities: An epidemiological study of an elderly amazonian population. **Phytother Res**, v. 25, p. 1367-1374, 2011.

KREWER, C. C. et al. Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: evidence from human in vitro and in vivo protocols. **Eur Food Res Technol**, 2014. DOI 10.1007/s00217-014-2182-3.

KRUGLIKOV, I.L.; SCHERER, P.E. Skin aging: are adipocytes the next target? **Aging**, v.8, n.7, p.1457-1469, 2016.

KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J**, v.15, n.1, p.71 -78, 2016.

LAGO, J. C. **Análise do perfil de expressão gênica de biomarcadores do processo de envelhecimento da pele.** 2016, 96 f. Tese (doutorado em Ciências Médicas)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2016.

LEE, D. C. et al. The effect of urban particulate matter on cultured human nasal fibroblasts. **Biomed Pharmacother**, v. 101, p. 58-73, 2018.

LEPORI, L. R. **A pele:** miniatlas. São Paulo: Soriak Produções, 2006.

LEUNG, K. S. et al. Short-time UVA exposure to human keratinocytes instigated polyunsaturated fatty acid without inducing lipid peroxidation. **Free Radic Res**, v.51, n. 3, p.269-280, 2017.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively, **Met in Enzym**, v.233, p. 346-357, 1994

LINS, R. D. A. U. et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potencia no processo de reparo. **Anais Bras Dermat**, v. 85, n. 6, p 849-855, 2010.

LORENCINI, M. **Avaliação global de transcritos associados ao envelhecimento da epiderme humana utilizando microarranjos de DNA.** 2014, 299 f. Tese (doutorado em genética e biologia molecular)-Universidade de Campinas, Campinas, SP, 2014.

LUCA, C. et al. A atuação da cosmetologia genética sobre os tratamentos anti envelhecimento. **Interfacehs**, São Paulo, v. 8, n. 2, p.63-91, 2013.

MACHADO, A. K. **Efeito cito-genômico do peróxido de hidrogênio e do guaraná (Paullinia cupana var. sorbilis Mart) em células tronco mesenquimais.** 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

MACHADO, A. K. et al. Guaraná (*Paullinia cupana var. sorbilis Mart*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. **Food Res. Intern**, v. 67, p. 426-433, 2015.

MACEDO, M.C.A.; TENÓRIO, C.A. Tratamento de rugas: uma revisão bibliográfica sobre carboxiterapia, radiofrequência e microcorrente. **Vis Universt**, v.2, n.1, p.1-20, 2015.

MCMORROW JP, MURPHY EP. Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors. **Biochem Soc Trans**, v.39, n.2, p. 688 – 693, 2011.

MIGLIARIO, M. et al. Near infrared low level laser therapy and cell proliferation: the emerging role of redox sensitive signal transduction pathways. **J Biophotonics**, 2018, doi: 10.1002/jbio.201800025

MONTAGNER, G. F. S. **Efeito in vitro do polimorfismo Ala16Val do gene da superóxido dismutase dependente de manganês no metabolismo oxidativo de linfócitos.** 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

NESTOR, M. et al. Photobiomodulation with Non-Thermal Lasers: Mechanisms of Action and Therapeutic Uses in Dermatology and Aesthetic Medicine. **J Cosmet Laser Ther**, v.19, n.4, p. 190 -198, 2017.

NEVES, R. P. et al. Benchmarking of Density Functionals for the Accurate Description of Thiol-Disulfide Exchange. **J Chem Theory Comput**, v.11, n. 10, p. 4842-4856, nov. 2014.

OLIVEIRA, C. M. et al. Citocinas e dor. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, V. L. C. de, et al. Photobiomodulation therapy in the modulation of inflammatory mediators and bradykinin receptors in an experimental model of acute osteoarthritis. **Lasers Med Sci**, v.32, n.1, p. 87 – 94, 2017.

OTOBONE, F. J. et al. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [Paullinia cupana var. sorbilis Mart var. sorbilis (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phytother Res**, v. 21, p. 531-535, 2007.

PANSANI, T. N. et al Effects of low-level laser therapy and epidermal growth factor on the activities of gingival fibroblasts obtained from young or elderly individuals. **Lasers Med Sci**. v. 32, n. 1, p. 45-52, 2017.

PATRIOTA, R. C. R.; RODRIGUES, C. J.; CUCÉ, L. C. Luz intensa pulsada no fotoenvelhecimento: avaliação clínica, histopatológica e imuno-histoquímica. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 6, p.1129-1133, 2011.

PEIXOTO, H., et al. Anti-aging and antioxidant potential of Paullinia cupana var. sorbilis Mart var. sorbilis: findings in Caenorhabditis elegans indicate a new utilization for roasted seeds of Guarana. **Medicines**, v. 4, n. 61, p. 2-14, 2017.

PEREIRA, M. F. L. **Recursos técnicos em estética**. v. 2. São Paulo: Difusão, 2013.

PERL, A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. **Nat Rev Rheumatol**, v. 9, p. 674-686, 2013.

PINTO, M. V. de M. (org). **Fototerapia: aspectos clínicos da reabilitação**. São Paulo: Andreoli, 2011.

PIVA, J. A. de A. C. et al. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **An Bras Dermat**. v. 86, n. 5, p 947-954, 2011.

POLJSK, B e DAHMANE, R. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. **Dermatol Res Pract**, v.1, n.1, p.1 – 4, 2012.

PORTELLA, R. L. et al. Guaraná (Paullinia cupana var. sorbilis Mart Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 1-12, 2013.

PORTELLA, R. B. **Avaliação do polimorfismo no gene da Interleucina-10 na doença peri-implantar**. 2011, 87 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)-UVA, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

QIN, Z. , BALIMUNKWE, R. M. , QUAN, T. Age- related reduction of dermal fibroblast size up-regulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin in vivo. **Br J Dermatol**, v.177, n.5, p. 1337-1348, 2017.

QUAN, T.; FISHER G. Role of Age-Associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging. **Gerontol**. v. 61, n. 5, p. 427–434, 2015.

RAMBO, C. S. de M. **Análise da laserterapia de baixa potencia (660nm) sobre a expressão de biomarcadores inflamatórios no processo de cicatrização: estudo comparativo entre ratos jovens e idosos.** 2013, 95 f. Dissertação (mestrado em ciências da reabilitação)-Universidade nove de julho, São Paulo, SP, 2013.

RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M.C.R. **Fundamentos de dermatologia.** Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

RAMOS, S. F., et al. The effects of transcutaneous low-level laser therapy on the skin healing process: an experimental model. **Lasers Med Sci**, v.33, n.5, p.967 – 976, 2018.

RAPISARDA, V. et al. Integrin Beta 3 Regulates Cellular Senescence by Activating the TGF- β Pathway. **Cell Rep**, v.18, n.10, p.2480-2493, 2017.

SAGRILLO, M. R. **Efeito *in vitro* do Tucumã (*Austrocaryum aculeatum*, Meyer) na citoproteção ao estresse oxidativo e na modulação da leucemia promielocítica aguda.** 2014, 95f. Tese (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia.** 3 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2008.

SCHALKA, S. et al. A new proposal for the evaluation of an antioxidant cosmeceutical in the treatment of the skin: affected by the effects of urban life. **Surg Cosmet Dermatol**. v. 8, n. 1, p. 46-54, 2016.

SHI, J.H. et al. Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. **Arch Dermatol Res**. v. 305, n. 4, p. 341-52, 2013.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Ann Rev of Biochemistry**. v. 86, p. 715-748, 2017.

SILVA, M. L.; **Encapsulação da vitamina C em lipossomas para o tratamento do envelhecimento cutâneo: desenvolvimento tecnológico, analítico e avaliação da performance biológica *in vitro* em modelos de permeação cutânea e em linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos.** 2016. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Curso de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2016.

SILVA, V. S. et al. Comparative analysis of different doses of coherent light (laser) and non-coherent light (light-emitting diode) on cellular necrosis and apoptosis: a study *in vitro*. **Res Biomed Eng**, v. 32, n. 4, p. 372-379, dez., 2016.

SILVEIRA, P. C. L. et al. Efeitos da laserterapia de baixa potência na reposta oxidativa epidérmica induzida pela cicatrização de feridas. **Rev Bras de Fisiot**, v. 13, n. 4, jun, 2008.

SILVEIRA, P. C. et al. Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. **Free Radic Res**, v. 50, n. 5, p. 503-513, 2016.

SINHA, K. et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent

pathways of apoptosis. **Arch Toxicol**, v. 87, n. 7, p.1157-1180, 2013.

SHIRATO, K. et al. Anti-Inflammatory Effect of ETAS®50 by Inhibiting Nuclear Factor- κ B p65 Nuclear Import in Ultraviolet-B-Irradiated Normal Human Dermal Fibroblasts. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2018, doi: 10.1155/2018/5072986.

SORREL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **J Cell Sci**, v. 117, n. 5, p. 667-675, 2004.

SOUZA, R.O de. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade fotoquimioprotetora da fração de *Byrsonima crassifolia* e da +(-) catequina contra os danos induzidos pela radiação UVB**. 2015, 41f.. Tese (doutorado em ciências farmacêuticas)-Univesidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2015.

SOUZA, J. R. M. et al. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arq Bras Cardiol**, v. 90, n. 2, 2008.

SULEIMAN, L. et al. Guaraná Supplementation Modulates Triglycerides and Some Metabolic Blood Biomarkers in Overweight Subjects. **Ann Obese Disord**, v. 1, n. 1, 2016.

SZEZERBATY, S. K. F., et al. The effect of low-level laser therapy (660 nm) on the gene expression involved in tissue repair. **Lasers Med Sci**, v. 33, p. 315–321, 2018.

SZWED, D. N.; SANTOS, V. L. P. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. **Cad Esc Saúde**, v.1, n.15, p. 7-17, 2015.

TANIGAWA, T. et al. (+)-Catechin protects dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis. **BMC Complement Altern Med**. v. 8, n. 14, p. 133, 2014.

TEIXEIRA, I. N. D. O.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Rev Ciênc Saúde Colet**, v. 15, n. 6, p. 2845-2857, 2010.

THEOBALD, M.; OFFRINGA, R. Anti-p53-directed immunotherapy of malignant disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 5, n. 11, p. 1-13, 2003.

THOMSON, J. et al. Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors. **Semin Cell Dev Biol**. 2018, doi: 10.1016/j.semcdb.2018.07.016.

VASCONCELOS, J. C. de **Doença autoimune da tireoide (doença de graves e tireoidite de Hashimoto): estudo de marcadores celulares de apoptose e proliferação celular e a relação com características clínicas, laboratoriais e anatomopatológicas**. 2017, 75 f. Dissertação (mestrado em clínica médica), Universidade Estadual de Campinas, 2017.

VITALE, G., et al. Oxidative stress and the ageing endocrine system. **Nat Rev Endocrinol**, v.9, n.1, p. 228–240, 2013.

VELARDE, M. C. Epidermal barrier protects against age-associated systemic inflammation. **J Invest Dermat**, v. 137, n.6, p. 1206 -1208, 2017.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface on nanoparticle-cell interactions. **Small**. v. 6, n. 1, p. 12-21, 2010.

VESKOUKIS, A. S.; TSATSAKIS, A. M.; KOURETAS, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. **Cell Stress Chap**, v.17, n.1, p. 11 – 21, 2012.

XU, X. et al. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. **Bone Res**, v.31, n.1, p.2 -8, 2018.

ZACHARY, C. B. Facial Rejuvenation: 40th anniversary review. **Semin Cutan Med Surg**, v. 35, n. 6, p.122-124, 2016.

ŽERAŇSKA, J. et al. A study of the activity and effectiveness of recombinant fibroblast growth factor (Q40P/S47I/H93G rFGF-1) in anti-aging treatment. **Postepy Dermatol Alergol**, v. 33, n. 1, p. 28-36, 2016.

ZHANG S.; DUAN E. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. **Cell Transpl**, v.27, n.5, p.729-738, 2018.

ZIMMERMANN, M. et al. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNF- α cooperate in the induction of keratinocyte apoptosis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, 1, p. 200 – 207, 2011.

YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart. **Molec**, v.12, n.1, p.1950-1963, 2007.

YAN, J. et al. Fibroblast growth factor 21 delayed endothelial replicative senescence and protected cells from H₂O₂-induced premature senescence through SIRT1. **Am J Transl Res**. v. 9, n. 2, p. 4492-4501, 2017.

YANG, L., et al. Basic fibroblast growth factor influences epidermal homeostasis of living skin equivalents through affecting fibroblast phenotypes and functions. **Skin Pharmacol Physiol**. v. 31, n.5, p. 229–237, 2018.

YIN, K. et al. Low-Level Laser Effect on Proliferation, Migration, and Antiapoptosis of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells Dev**. v. 26, n. 10, p. 762-775, 2017.

YONEKURA, L. et al. Bioavailability of catechins from guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. **Food Funct**, v. 7, n. 7, p. 2970 – 2978, 2016.

YU, L. S., et al. Expression of KGF-1 and KGF-2 in skin wounds and its application in forensic pathology. **Am J Forensic Med Pathol**. v. 0, n. 0, p. 01-12, 2017.

YUN, S.H.; KWOK, S. J. J. Light in diagnosis, therapy and surgery. **Nat Biomed Eng**, 2017, doi: 10.1038/s41551-016-0008.

ANEXO A- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1

Lasers in Medical Science

In vitro effect of low-level laser therapy on the old-fibroblasts proliferative, apoptosis modulation and oxi-inflammatory markers hydrogen peroxide-induced

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	LIMS-D-18-00283
Full Title:	In vitro effect of low-level laser therapy on the old-fibroblasts proliferative, apoptosis modulation and oxi-inflammatory markers hydrogen peroxide-induced
Article Type:	Original Article
Keywords:	Skin. Aging. Fibroblast. Low-level laser
Corresponding Author:	Fernanda Barbisan Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, BRAZIL
Order of Authors:	Daise R Maldaner Verônica F. Azzolin Fernanda Barbisan Moisés H. Mastella Cibele F. Teixeira Alexandre Diehl Thiago Duarte Neida L. Pellenz Carla M U Negretto Ivana B M da Cruz Marta MMF Duarte
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Santa Maria
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Daise R Maldaner
First Author Secondary Information:	
Order of Authors Secondary information:	