

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RAFAEL DO NASCIMENTO DE LIMA

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA APOPTOSE E ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO
TECIDO ADIPOSEO SUBMETIDAS A TOXICIDADE POR DOXORRUBICINA**

São Paulo, SP

2017

RAFAEL DO NASCIMENTO DE LIMA

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA APOPTOSE E ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO
TECIDO ADIPOSEO SUBMETIDAS A TOXICIDADE POR DOXORRUBICINA**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho, para obtenção do título de
Mestre em Biofotônica Aplicada às
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Andrey Jorge Serra

**São Paulo, SP
2017**

Lima, Rafael do Nascimento de.

Efeito do laser de baixa intensidade na apoptose e estresse oxidativo em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo submetidas a toxicidade por doxorrubicina. / Rafael do Nascimento de Lima. 2017.

41 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

Orientador (a): Prof. Dr. Andrey Jorge Serra.

1. Doxorrubicina. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Laser de baixa intensidade. 4. Insuficiência cardíaca.

I. Serra, Andrey Jorge. II. Título.

CDU 615.831

Sgo Paulo, 18 de dezembm de 2017.

TERMO DE APROVACAO

luno (a) : RAFAEL DO NASCIMENTO DE LIMA

Titulo da Disserta@o: "Laser de baixa intensidade reduz apoptose e estresse oxidativo em células-tronco meaeenquimais derivadas do tecido adiposo submetidas a toxicidade por doxorubicina'.

Presidents: PROF. DR. ANDREY JORGE SERRA _____

Membro: PROF. DR. JOSE ANTONIO SILVA JUI  _____

Memb/o: PAOF. DR. JOSE RENATO PII  _____

*Aos meus pais, Valdir e Dulce
e avós, Manoel e Verginia
pelo apoio e incentivo aos estudos.*

Agradecimentos

À Universidade Nove de Julho (UNINOVE) pelo acolhimento e oportunidade de realizar pós-graduação.

Ao Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíaca da UNIFESP pela parceria. Em especial à Doutora Stella de Souza Vieira por todo ensinamento de cultura celular e apoio nos experimentos.

À Fapesp, pelo financiamento desse projeto.

Ao Professor Doutor Andrey Jorge Serra por toda atenção, suporte e paciência, e também pela excelente orientação.

A todos os professores do programa de pós-graduação, sem os quais a minha formação e a de dezenas de outros alunos não seria possível. Em especial, ao Professor Doutor Paulo de Tarso Camillo de Carvalho pelo apoio técnico e fornecimento de equipamento. Também ao Professor Doutor José Antônio Silva Junior pela colaboração no aprimoramento deste trabalho.

Aos técnicos e colegas de laboratório, pelo auxílio na resolução de eventuais problemas relacionados aos experimentos.

À Mariana Teixeira Gomes pela ajuda na realização dos experimentos e apoio emocional no decorrer do curso.

Resumo

Contextualização: doxorubicina é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de doenças hematológicas e neoplasias. No entanto, a doxorubicina também causa danos em células saudáveis (exemplo cardiomiócitos), situação que é persistente mesmo após o fim de ministração da droga. Estas implicações justificam ferramentas que, de alguma forma, abrandem os efeitos adversos da doxorubicina em células não doentes, principalmente cardíacas. Destaque-se o emprego da terapia com células-tronco, em que efeitos cardioprotetores têm sido reportados. Todavia, a doxorubicina também impõe citotoxicidade às células-tronco transplantadas, reduzindo seu potencial terapêutico. **Objetivo:** analisar se o Laser de Baixa Intensidade (LBI) reduz apoptose e estresse oxidativo em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMA's) submetidas a toxicidade por doxorubicina. **Material e Métodos:** CTMA's na concentração de 1×10^5 /0,1 mL de DMEM foram plaqueadas em placa de 96 poços para composição dos seguintes sets experimentais: Controle - CTMA's não tratadas com doxorubicina e/ou LBI; D25 e D50 - CTMA's incubadas com doxorubicina nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente; D25 + LBI / D50 + LBI - CTMA's irradiadas com 0,2 J, 0,4 J e 0,7 J de LBI (660 nm) e incubadas com doxorubicina nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente. A viabilidade e apoptose celular foram determinadas por citometria de fluxo com marcação por 7AAD e Anexina V, respectivamente. A permeabilização celular com DCFH foi utilizada como marcador de espécies reativas de oxigênio (EROs). O conteúdo intracelular de ATP foi determinado em ensaio de luminescência em espectrofotômetro. As citocinas IL-6, IL-10 e TNF foram analisadas através de ELISA. **Resultados:** irradiações de 0,4 e 0,7 J resultaram em maior concentração de CTMA viáveis independente das concentrações de doxorubicina. Resultados similares foram observados para os ensaios de apoptose em células incubadas com 50 µg de doxorubicina e irradiadas com 0,2 e 0,4 J. Considerando que 0,4 J foi efetiva em aumentar a viabilidade e reduzir apoptose das CTMA's na concentração de 50 µg, nós direcionamos para continuar os experimentos somente com esta dose de energia e concentração da droga. Assim, 0,4 J inibiu o aumento de EROs nas CTMA's, porém, não resultou em maior concentração de ATP intracelular. Para IL-6, o grupo irradiado teve maior expressão quando comparado ao grupo controle. Para IL-10 e TFN, não houve diferença entre os grupos. **Conclusão:** o LBI reduziu a mortalidade, apoptose e estresse oxidativo de CTMA's submetidas a toxicidade por doxorubicina.

Palavras-chave: doxorubicina, células-tronco mesenquimais, laser de baixa intensidade, insuficiência cardíaca.

Abstract

Background: doxorubicin is a chemotherapy agent widely used on the treatment of hematologic diseases and neoplasia. However, doxorubicin causes cell damage in healthy cells (e.g. Cardiomyocytes), a situation that is persistent even after the end of drug administration. These implications justify tools that in some way lessen the adverse effects of doxorubicin on non-diseased cells, especially in the heart. We highlight the use of stem cell therapy, in which cardioprotective effects have been reported. However, doxorubicin also imposes cytotoxicity on transplanted stem cells, reducing its therapeutic potential. **Objective:** to analyze whether the Low Intensity Laser (LIL) reduces apoptosis and oxidative stress in mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (MSCA) submitted to doxorubicin toxicity. **Material and Methods:** MSCA at the concentration of 1×10^5 /0.1 mL of DMEM were plated in a 96-well plate for the composition of the following experimental sets: Control - MSCA untreated with doxorubicin and/or LIL; D25 and D50 - MSCA incubated with doxorubicin at concentrations of 25 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$, respectively; D25 + LIL/D50 + LIL - MSCA irradiated with 0.2 J, 0.4 J and 0.7 J LIL (660 nm) and incubated with doxorubicin at concentrations of 25 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Cell viability and apoptosis were determined by flow cytometry with 7AAD and Annexin V, respectively. Cell permeabilization with DCFH was used as a marker of reactive oxygen species (ROS). Intracellular ATP content was determined by spectrophotometer luminescence assay. Cytokines IL-6, IL-10 and TNF were analyzed by ELISA. **Results:** irradiations of 0.4 and 0.7 J resulted in a higher concentration of viable MSCA independent of doxorubicin concentrations. Similar results were observed for the apoptosis assays in cells incubated with 50 μg of doxorubicin and irradiated with 0.2 and 0.4 J. Considering that 0.4 J was effective in increasing the viability and reducing apoptosis of the MSCA at the concentration of 50 μg , we directed to continue the experiments only with this dose of energy and concentration of the drug. Thus, 0.4 J inhibited the increase of ROS in MSCA, however, it did not result in a higher concentration of intracellular ATP. For IL-6, the irradiated group increased expression when compared to the control group. For IL-10 and TNF, there was no difference between groups. **Conclusion:** LIL reduced mortality, apoptosis and oxidative stress of MSCA undergoing doxorubicin toxicity.

Keywords: doxorubicin, mesenchymal stem cells, low intensity laser, heart failure.

Sumário

1. Contextualização	11
2. Objetivo	15
3. Material e Métodos	16
3.1 Obtenção das CTMA's	16
3.2 Extração das CTMA's	16
3.3 Descongelamento	16
3.4 Cultivo	17
3.5 LBI	17
3.6 DOXO	18
3.7 Citometria de fluxo	19
3.7.1 Perfil fenotípico das CTMA's	19
3.7.2 Viabilidade celular	19
3.7.3 Marcador de apoptose	19
3.8 Estresse oxidativo	20
3.9 Concentração de adenosina trifosfato (ATP)	20
3.10 Concentração de IL-6, IL-10 e TNF	20
3.11 Análise estatística	20
4. Resultados	22
4.1 Perfil fenotípico	22
4.2 Viabilidade celular	22
4.3 Apoptose	23
4.4 Estresse oxidativo	24
4.5 Concentração de ATP	25
4.6 Concentração de IL-6, IL-10 e TNF	26
4.7 Caracterização morfológica	26

.....

5. Discussão	28
6. Conclusão	32
7. Referências Bibliográficas	33
8. Apêndices	40
8.1 Artigo publicado (2017)	40
8.2 Artigo publicado (2017)	40
8.3 Artigo publicado (2016)	41

Lista de Figuras

Figura 1. Expressão de marcador de superfície celular	22
Figura 2. <i>Plots</i> de citometria de fluxo com expressão de 7AAD	23
Figura 3. Expressão de CTMA's não viáveis, identificadas com 7AAD	23
Figura 4. <i>Plots</i> de citometria de fluxo com expressão de Anexina V	24
Figura 5. Expressão de CTMA's marcadas com Anexina V	24
Figura 6. Expressão de CTMA's marcadas com DCFH	25
Figura 7. Conteúdo de ATP dosado em CTMA's	26
Figura 8. Expressão de IL-6, IL-10 e TNF	26
Figura 9. Morfologia celular de CTMA's	27

Lista de Abreviaturas

CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal
CT	Células-tronco
CTMA's	Células-tronco Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo
Ctrl	Controle
DMEM	Meio de Cultura Dulbecco Modificado por Eagle
DOXO	Doxorrubicina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
LBI	Laser de Baixa Intensidade
PBS	Tampão Fosfato Salino
SFB	Soro Fetal Bovino
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

1. Contextualização

As antraciclinas são quimioterápicos amplamente utilizados no tratamento de doenças hematológicas e neoplasias. Dentre os fármacos disponíveis, a doxorubicina (DOXO) assume relevância devido a sua potente ação na replicação do DNA, o que reprime a proliferação e sobrevivência celular¹. Este agente antineoplásico possui ação efetiva para tratar distúrbios em populações pediátricas e adultas, particularmente de tumores sólidos, leucemia, linfomas e câncer cerebral². Apesar das ações terapêuticas positivas, a DOXO possui efeitos adversos potentes a longo prazo e pode resultar em citotoxicidade de diversas células não neoplásicas³.

O mecanismo exato da citotoxicidade causada pela DOXO não está totalmente elucidado, mas sabe-se que ocorre ligação com o DNA formando compostos de ferro. Além disso, os dados disponíveis também situam a injúria mitocondrial em posição de destaque^{4,5}, em que o coração é particularmente afetado como resultado da abundância desta organela⁵. Acresça-se que a cardiotoxicidade induzida pela DOXO também é acompanhada por desregulação dos níveis intracelulares de cálcio que, somada às anormalidades mitocondriais, converge em aumento na geração de espécies reativas de oxigênio². Este cenário é acompanhado de estado redox impróprio para sobrevivência celular, em que o ambiente pró-oxidativo é acompanhado por redução de enzimas/proteínas antioxidantes^{6,7,8}. Tal circunstância é propícia para o desenvolvimento de remodelamento cardíaco patológico, comumente marcado por apoptose dos cardiomiócitos, fibrose, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca^{9,10}. Pesa, ainda, o fato dos efeitos citotóxicos da DOXO persistirem por mais de 10 anos após término da intervenção quimioterápica².

As informações precedentes ilustram a necessidade de ferramentas que propiciem, no mínimo, abrandar os efeitos citotóxicos da DOXO em células poupadas de neoplasias, sobretudo, o tecido miocárdico. Diversas alternativas não farmacológicas e farmacológicas são elencadas na tentativa de contrapor os efeitos adversos da DOXO^{11,12,13,14}. Em revisão bibliográfica realizada por Granados-Principal *et al.*¹³ foi observado que o uso de vitamina C diminuiu a apoptose, entretanto interferiu negativamente na eficácia antitumoral da DOXO. O mesmo estudo apontou a utilização de carotenoides, como o betacaroteno e

licopeno, que apresentaram aumento no efeito antitumoral da droga, mas sem evitar a disfunção cardíaca. Com relação as alternativas farmacológicas, o dexrazoxane pode ser utilizado em conjunto a quimioterapia devido ao fato de minimizar os efeitos cardiotoxicos^{15,16}, porém apresenta como desvantagem a ocorrência de efeitos colaterais sistêmicos (Bula). Acresça que, parcela substancial dos resultados positivos de diferentes intervenções são limitados a estudos experimentais e pormenorizados em estudos clínicos, o que abre precedente para análise de intervenções inovadoras¹⁷.

O uso de células tronco (CT) emerge como alternativa promissora para tratar diferentes doenças. Inicialmente preconizada no tratamento da insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica^{18,19,20}, a terapia com CT recebeu atenção como alternativa para o remodelamento cardíaco despertado pela DOXO^{3,21}. Assim, dados positivos para o uso de CT mesenquimais derivadas da medula óssea foram apresentados por Yu *et al.*³ e Gorji *et al.*²², em que as CT atenuaram a fibrose miocárdica induzida pela DOXO e aumentaram a expressão de proteínas anti-apoptóticas. Situação singular foi documentada por Gopinath *et al.*²¹, que mostraram reversão da hipertrofia de cardiomiócitos isolados cultivados com CT derivadas do cordão umbilical humano submetidas a DOXO. Resultados interessantes também foram divulgados por Oliveira *et al.*²³ ao analisarem a eficácia da terapia antioxidante em comparação a terapia celular em ratos que receberam DOXO. Os autores observaram efeitos superiores das CT para aprimorar o desempenho ventricular esquerdo. Outro resultado relevante encontrado pelo grupo perfaz a melhora da função do miocárdio tratado com CT para valores similares ao grupo controle.

Os achados prévios são cativantes para aceitar a utilização das CT no tratamento dos efeitos cardíacos adversos impostos pela DOXO. A margem desta questão reside os benefícios advindos da implementação precoce da terapia celular, quando ainda vigora o período quimioterápico²⁵. Imagina-se que tal medida constitua efeito protetivo para o remodelamento cardíaco adverso imposto pela DOXO. Todavia, esta proposta não é livre dos inconvenientes que comumente assolam a eficácia terapêutica das CT, em que parcela significativa das CT transplantadas no organismo *in vivo* pode ser perdida em condições de microambiente hostil. Este fenômeno foi bem documentado nas cardiopatias isquêmicas²⁶, mas não deve ser pormenorizado quando o alvo terapêutico

constitui a cardiopatia induzida pela DOXO. De fato, há informação suficiente acerca do efeito citotóxico da DOXO em diferentes linhagens de CT. Diferentes grupos de pesquisa reportaram redução da viabilidade, aumento do estresse oxidativo e apoptose em CT cultivadas com DOXO^{24,27}. Desses achados emerge a necessidade de estratégias que melhorem a resistência das CT à DOXO, o que é particularmente interessante na ocasião de transplante celular durante o regime quimioterápico. Essa linha de pensamento adere a um conceito tradicional conhecido como “pré-condicionamento”, em que o objetivo é potencializar as propriedades resistivas das células transplantadas ao ambiente inóspito do organismo receptor²⁸. Essa temática é pouco explorada no que concerne ao perfil protetivo das CT frente à citotoxicidade causada pela DOXO. O único trabalho identificado analisou as características de CT cardíacas encapsuladas em hidrogel, contendo potente varredor de espécies reativas de oxigênio - superóxido dismutase. O procedimento foi eficaz em atenuar a apoptose e normalizar a homeostase metabólica das CT expostas a DOXO²⁹.

De interesse é a possibilidade de utilização do laser de baixa intensidade (LBI) para aumentar as características citoprotetivas das CT, ideia que é motivada por dados indicando efeitos fisiológicos importantes do LBI em diferentes tipos de CT. Sabe-se que o LBI pode modular a proliferação e diferenciação de CT derivadas da medula óssea, adiposo, polpa dental, sistema nervoso e cordão umbilical³⁰. Desperta atenção os achados que conferem ao LBI propriedades citoprotetivas das CT expostas à agentes citotóxicos. Horvát-Karajz *et al.*³¹ analisaram a ação protetora do LBI em CT mesenquimais submetidas a incubação com agentes citostáticos. Os autores observaram que irradiações de 1,9 J/cm² foram eficazes em atenuar os efeitos deletérios dos fármacos na proliferação celular, indicando que o laser age estimulando a mitose e também acelerando este processo. Recentemente, nós demonstramos que o LBI normalizou a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em CT mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMA's) de homens e ratos submetidos à deficiência nutricional³². Em conjunto, os dados são estimulantes para aceitar que a irradiação das CT pode constituir alternativa útil para potencializar a eficácia da terapia celular. A ideia de pré-condicionar as CT com LBI para aumentar a

eficiência terapêutica pós-transplante não é inédita. Em 2009, Tuby *et al.*³³ irradiaram CT mesenquimais da medula óssea com LBI de comprimento de 810 nm e implantaram as células no coração de ratos infartados. Após três semanas de seguimento, os investigadores mostraram que o transplante celular reduziu o tamanho do infarto em 53% e resultou em imunomarcagem tecidual positiva para CT cerca de seis vezes maior do que no coração de ratos que receberam CT não irradiadas. Acresça-se que o potencial angiogênico das CT irradiadas também foi superior em comparação às CT sem intervenção. Ações similares de CT irradiadas com LBI foram recentemente divulgadas em outros modelos experimentais de injúria tecidual, onde foi observado efeito inibitório da apoptose e aumento na secreção parácrina de fatores angiogênicos e de crescimento celular^{34,35}. Estes mecanismos são importantes para a sobrevivência das CT no tecido em que serão transplantadas, tornando assim a terapia eficaz. Entretanto, para obtenção dos efeitos desejados da laserterapia é importante que se estabeleça parâmetros de irradiação, como comprimento de onda, potência e dose³⁰.

A originalidade deste projeto de pesquisa residiu em examinar se o LBI induziria resistência das CTMA's à toxicidade da DOXO. Devido ao ineditismo de informação nesta linha de investigação, estabelecemos a realização de experimentos *in vitro* centrados na análise da ação do LBI sobre a viabilidade das CTMA's submetidas a DOXO. Para explorar possíveis mecanismos mediadores da citoproteção, nós direcionamos atenção para avaliar o papel do LBI na modulação do estresse oxidativo. Este direcionamento foi pautado no seguinte argumento: níveis elevados de espécies reativas de oxigênio são críticos para diminuir a viabilidade celular e o engraftamento das CT³⁶. Deve-se mencionar que a opção por analisar a hipótese que o LBI poderia modular o estresse oxidativo não provém do acaso. Apesar da inexistência de estudos, há evidências sobre o potencial do LBI em atenuar o estresse oxidativo em outras linhagens celulares^{37,38,39,40}. Imagina-se que, ao abrandar o estresse oxidativo induzido pela DOXO, o LBI propicie melhora efetiva na sobrevivência de células pós-transplante. Ao considerar que o uso das CT emerge como opção terapêutica promissora no tratamento do paciente em quimioterapia, os resultados deste estudo possuem potencial translacional.

2. Objetivo

Analisar o efeito do Laser de Baixa Intensidade na apoptose e estresse oxidativo em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo submetidas a toxicidade por doxorubicina.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção das CTMA's

Foram utilizadas CTMA's provenientes de ratos machos isogênicos de linhagem Fisher 344, derivadas de um banco de células sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEUA 2130010214).

3.2 Extração das CTMA's

Sob regime anestésico com mistura de cetamina (50 mg/Kg, Dopalen®, Vertbrands, Paulínia, SP, BRA) e xilazina (10 mg/Kg, Anesadan®, Vetbrands, Paulínia, SP, BRA), o tecido adiposo subcutâneo da região inguinal dos animais foi extraído e lavado com tampão fosfato salino (PBS). Os procedimentos de extração seguiram padronização descrita em trabalho recente de nosso grupo³⁰. O tecido foi dissociado com colagenase tipo IA e centrifugado a 1500 rpm. As células peletizadas foram recuperadas e plaqueadas em placa de cultura com poços de 10 cm². Após 24 horas, a cultura foi lavada com PBS 1x (NaCl 140 mM, KCl 2,5 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, pH 7.4) para remoção de eritrócitos e outras células não aderidas. As células foram re-incubadas em meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Invitrogen, EUA) a cada dois dias. Ao atingirem confluência de 80%, usual com 5-7 dias após o plaqueamento inicial (passagem 0), as células foram desaderidas da placa com tripsina-EDTA 0,25% e congeladas como previamente descrito^{41,42,43}.

3.3 Descongelamento

As CTMA's foram descongeladas com a adição de meio de cultura DMEM, transferidas para tubo cônico contendo 10 mL de DMEM suplementado com 9% de soro fetal bovino (Invitrogen, EUA) e, então centrifugada a 1500 rpm por cerca de 5 minutos. Seguiu-se com descarte do sobrenadante, ressuspensão das células em proporção 1×10⁵/0,1 mL de DMEM e, então, transferidas para garrafas de cultura T75. Posteriormente, as CTMA's foram mantidas em estufa (Thermo Electron Corporation, modelo 3110, USA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.4 Cultivo

O cultivo ocorreu em meio de cultura DMEM suplementado com 9% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (1000UI/ml-1000mg/ml, GIBCO BRL, Gaithersburg). As culturas foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A monitorização do crescimento celular foi realizada a cada 12 horas em microscópio de fase invertida Eclipse TE2000U (Nikon, Melville, NY, EUA). O subcultivo foi realizado em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil) quando a monocamada celular atingiu 90% de confluência. Assim, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com PBS 1x (NaCl 140 mM, KCl 2,5 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, pH 7,4) e tratadas com solução de tripsina-EDTA a 0,25% por 2 min (37 °C). A seguir, foi realizada lavagem com meio para inativação enzimática e posterior centrifugação a 1500 rpm a 20 °C por 5 min (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil). O sobrenadante foi desprezado, o precipitado celular desfeito e as células foram novamente plaqueadas em proporção de 1×10^5 /0,1ml de DMEM para cada poço em placa de 96 poços (07-200-627 GSA/VA Corning Life Sciences Plastic No.: 3916).

3.5 LBI

A irradiação das CTMA's foi realizada com o aparelho DMC Modelo Photon Laser III - InGaAIP, 1 minuto antes da incubação com DOXO. Este período de latência entre irradiação e adição do agente citotóxico é referido na literatura como propício para que os efeitos da LBI se manifestem em cultura de CT⁴⁴. Os parâmetros de irradiação são apresentados na Tabela 1. Foi estabelecido utilizar um dispositivo com comprimento de onda de 660 nm e irradiar as CT com doses de 0,2 J, 0,4 J e 0,7 J. Considera-se que tais parâmetros podem despertar características resistivas das CTMA's frente à DOXO. Esta hipótese foi pautada em estudos prévios, em que tais parâmetros foram efetivos em aumentar a proliferação de células-tronco derivadas da medula óssea e também CTMA's^{30,45,46}.

As irradiações foram aplicadas no sentido vertical, de cima para o fundo dos respectivos poços, em que a distância entre a *spot* de saída do laser e a superfície de aplicação foi mantido constante a 2 mm. Para garantir que as CTMA's aderidas no fundo dos poços recebessem a energia estipulada, nós analisamos se solução DMEM poderia abrandar a energia entregue com equipamento Thorlabs Thermal powermeter (Model S322C, Thorlabs, Newton, NJ, USA). Destes experimentos derivou a constatação que o DMEM, no volume que se utiliza nos poços, não interfere na quantidade de energia entregue as CTMA's. Durante as irradiações, o ambiente foi mantido com obscuridade parcial para não haver interferência de luz externa. Foram utilizadas placas de 96 poços transparentes (07-200-627 GSA/VA Corning Life Sciences Plastic No.: 3916) para irradiação, sendo que no plaqueamento foi deixado distância de 2 poços como garantia de não haver interferência no próximo poço com células.

Tabela 1 - Parâmetros de irradiações

Comprimento de onda: 660 nm		
Área do feixe: 0,028 cm ²		
Área irradiada: 0,32 cm ²		
Potência de saída: 30 mW		
Densidade de potência: 1,07 mW/cm ²		
Densidade de energia	Dose	Tempo de irradiação
10 J/cm ²	0,2 J	9 segundos
18 J/cm ²	0,4 J	16 segundos
27 J/cm ²	0,7 J	25 segundos

3.6 DOXO

As CTMA's foram expostas a DOXO decorrido 1 minuto da LBI. O meio de cultura DMEM padrão foi substituído por meio de cultura contendo o fármaco nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, doses que inibem consideravelmente a proliferação celular e são próximas da aplicação clínica⁴⁷. O objetivo foi trabalhar com definir uma concentração de DOXO apta a induzir reduções de viabilidade celular próximas a 40%. Foram aplicadas as três doses de irradiação (0,2; 0,4; 0,7 J) para cada concentração de DOXO, respectivamente. As culturas foram incubadas em estufa (HEPA

class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37 °C e atmosfera úmida de CO₂ 5%. A monitorização do crescimento celular foi conduzida a cada 24 horas em microscópio de fase invertida (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA). As análises foram realizadas após 48 horas de incubação, assim como no estudo de Qi *et al.*⁴⁷. O controle negativo foi realizado com o meio DMEM não enriquecido com DOXO.

3.7 Citometria de fluxo

As análises de viabilidade celular, apoptose e estresse oxidativo foram conduzidas no citômetro BD Accuri (C6 Sampler, CA, USA).

3.7.1 Perfil fenotípico das CTMA's

Para determinar o perfil fenotípico utilizou-se 5 µL dos marcadores CD90+ (positivo) e CD45- (negativo) para CTMA's. Após marcação, as amostras foram homogenizadas e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com ausência total de luz. O processo de quantificação das células foi realizado com base na expressão relativa de CD90+ (positivo).

3.7.2 Viabilidade celular

Foi analisado a viabilidade das CTMA's por marcação com 7 aminoactinomicina D (7AAD – BD PHARMINGEN, CA, USA). O fluorocromo permite identificar CTMA's não viáveis. A quantidade de CTMA's não viáveis foi calculada por meio da marcação positiva de 7AAD. As CTMA's foram ressuspensas em 200 µL de PBS 1x na concentração de 2x10⁵ células/0,1 mL. Após ressuspensas, foi adicionado 5 µL de 7AAD. As amostras foram homogenizadas e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com ausência total de luz. O percentual de CTMA's viáveis foi feito pelo cálculo da quantidade de células não viáveis, subtraída de valor absoluto, 100.

3.7.3 Marcador de apoptose

Na análise de apoptose em CTMA's foi utilizado protocolo de marcação com Anexina V (BD PHARMINGEN, CA, USA). Assim como a marcação com 7AAD, as CTMA's foram ressuspensas em 200 µL de PBS 1x na concentração de 2x10⁵ células/0,1 mL. Após ressuspensas, foi adicionado 5

μL de Anexina V. As amostras foram homogenizadas e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com ausência total de luz.

3.8 Estresse oxidativo

Para a marcação de espécies reativas de oxigênio (EROs) as células foram ressuspensas em 900 μL de PBS e marcadas com 100 μL de solução estoque contendo 10 μL a 3 mM de DCFH (2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, SIGMA-ALDRICH) e 820 μL de PBS 1x. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e incubadas por 30 minutos a 37 °C ao abrigo da luz. Após incubação, as amostras foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 200 μL de PSB 1x para leitura no citômetro de fluxo. Os resultados foram avaliados por mediana de fluorescência.

3.9 Concentração de adenosina trifosfato (ATP)

Após incubação com DOXO, 150 μL de DMEM foram coletados e, em seguida, as células foram tripsinizadas seguindo o protocolo de cultivo e adicionadas ao meio de cultura correspondente. As amostras foram plaqueadas em placa de 96 poços branca/opaca. A solução estoque foi preparada conforme instruções do quite ATPlite (PerkinElmer, MA, USA). Em seguida, foram adicionados 50 μL de solução mammalian cell lysis e agitados a 700 rpm por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 50 μL de solução substrato e agitados novamente seguindo o parâmetro anterior. Após agitação, as amostras foram mantidas ao abrigo da luz por 10 minutos e a quantificação de ATP foi realizada em espectrofotômetro Multireader Spectramax i3 (Molecular Devices, CA, USA).

3.10 Concentração de IL-6, IL-10 e TNF

As análises foram realizadas 48 horas após a incubação com a droga. Os grupos foram compostos por controle, D50 e D50 + 0,4 J em duplicata. A quantificação da IL-6, TNF e IL-10 no sobrenadante celular foi realizada por ELISA (BD OptEIA™ Rat IL-6 ELISA Set cat. 550319 e IL-10 cat. 555134 – BD Biosciences, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada em 450 nm utilizando o leitor de microplacas SpectraMax M2 Microplate Reader (Molecular Devices, USA).

3.11 Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média \pm DP. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificação da distribuição Gaussiana dos dados. A comparação dos resultados entre os diferentes grupos foi realizada com ANOVA uma via seguida por Student Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA). Um valor de $p \leq 0,05$ foi adotado como nível de significância.

4. Resultados

4.1 Perfil fenotípico

Para caracterização fenotípica de CTMA's foram utilizados os marcadores CD90 positivo (99,5%) e CD45 negativo (0%). A pureza da população celular pode ser observada em plots ilustrados na Figura 1.

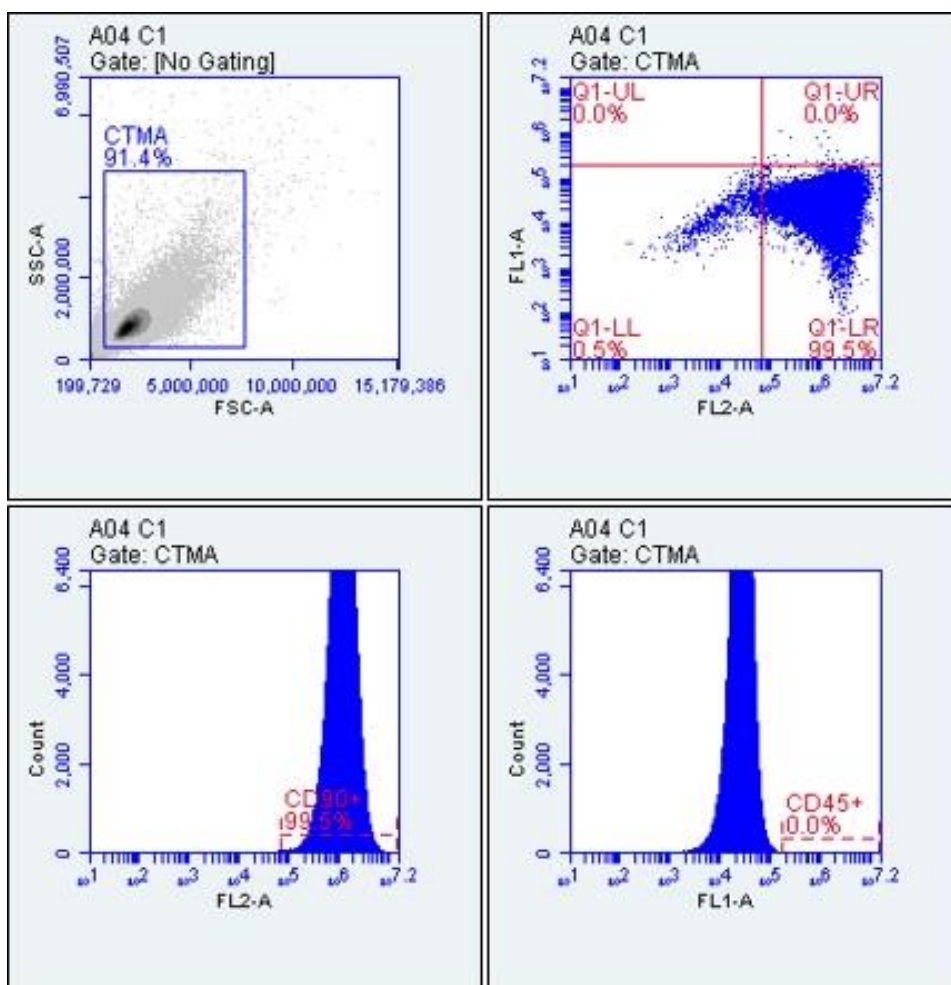


Figura 1. Expressão de marcador de superfície celular positivos (CD90) e negativos (CD45) para CTMA's.

4.2 Viabilidade celular

Ilustrações referentes aos plots de citometria de fluxo para estudo da viabilidade celular são ilustrados na Figura 2. Nota-se que as concentrações 25 μ g e 50 μ g de DOXO são citotóxicas para as CTMA's, em que a droga reduziu a viabilidade celular em cerca de 20% a 40%. Todavia, para os grupos irradiados com LBI nas doses de 0,2 J, 0,4 J e 0,7 J, houve redução significativa para permeabilização do marcador 7AAD nestes grupos conforme análise

quantitativa ilustrada na Figura 3. A única dose de LBI que não surtiu ação positiva correspondeu a 10 J para CTMA's, quando as células foram incubadas com 25 μg da droga.

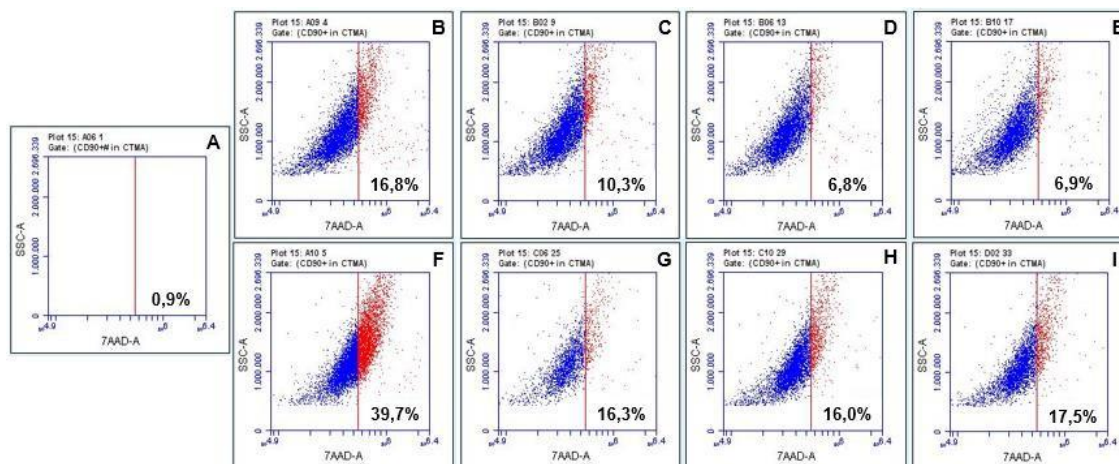


Figura 2. Plots de citometria de fluxo com expressão de 7AAD (%) em CTMA's. A: Controle, B: D25, C: D25 + 0,2 J, D: D25 + 0,4 J, E: D25 + 0,7 J, F: D50, G: D50 + 0,2 J, H: D50 + 0,4 J, I: D50 + 0,7 J.

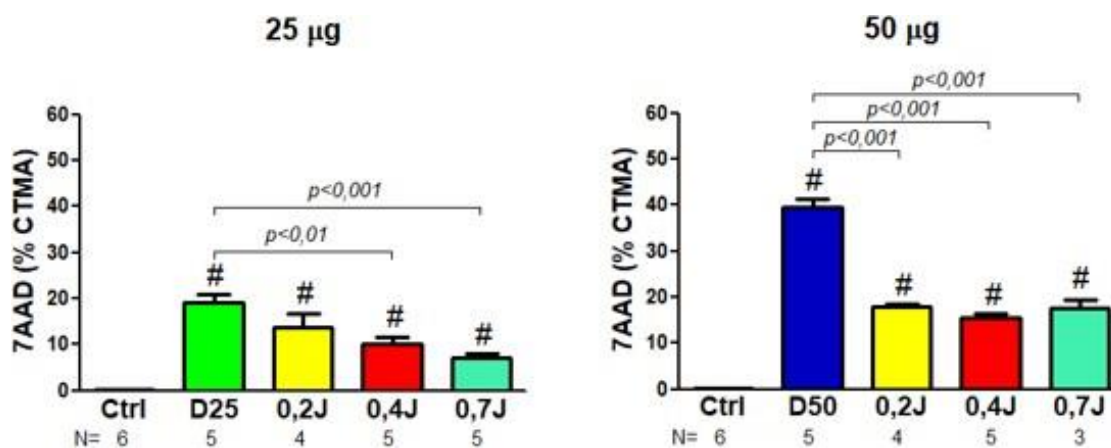


Figura 3. Expressão de CTMA's não viáveis, identificadas com marcação positiva para 7AAD nos grupos Controle (Ctrl), DOXO (D) e irradiados com diferentes doses de energia antes da incubação com DOXO. O gráfico da esquerda representa experimentos conduzidos com DOXO na dose de 25 μg e, a direita, é possível visualizar dados referentes a 50 μg de DOXO. O tamanho da amostra (N) é descrito abaixo dos grupos. #p<0,001 vs. grupo Ctrl.

4.3 Apoptose

A Figura 4 ilustra os dados referentes aos plots de citometria de fluxo para análises de Apoptose celular com marcação por Anexina V. A análise quantitativa dos dados é disponível na Figura 5, em que o aumento da morte celular foi evidente em CTMA's incubadas com DOXO. O LBI resultou em menor marcação para Anexina V em CTMA's irradiadas com 10 e 18 J/cm²,

quando incubadas com 50 μg de DOXO, enquanto que não houve efeito positivo das irradiações na dose de 25 μg de DOXO.

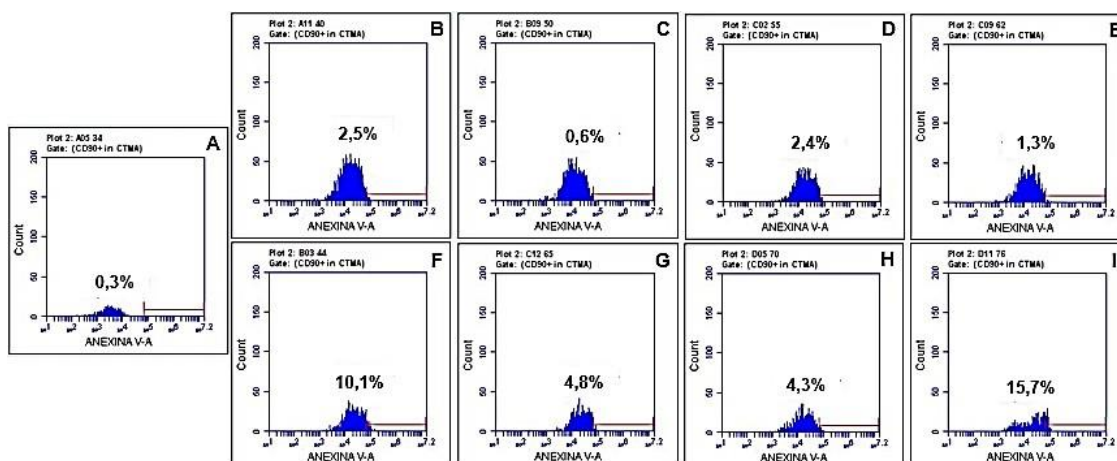


Figura 4. Plots de citometria de fluxo com expressão de Anexina V (%) em CTMA's. A: Controle, B: D25, C: D25 + 0,2 J, D: D25 + 0,4 J, E: D25 + 0,7 J, F: D50, G: D50 + 0,2 J, H: D50 + 0,4 J, I: D50 + 0,7 J.

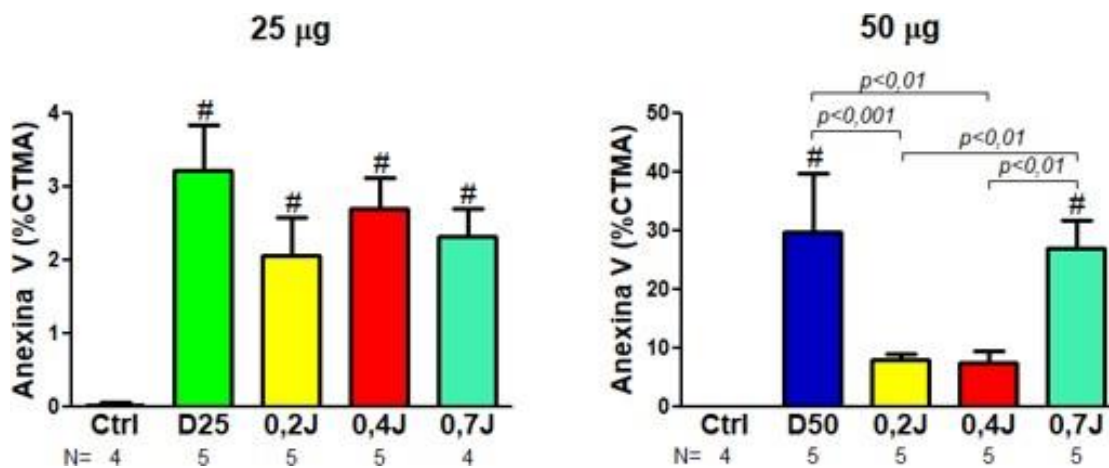


Figura 5. Expressão de CTMA's marcadas com Anexina V nos grupos Controle (Ctrl), DOXO (D) e irradiados com diferentes doses de energia antes da incubação com DOXO. O gráfico da esquerda representa experimentos conduzidos com DOXO na dose de 25 μg e, a direita, é possível visualizar dados referentes a 50 μg de DOXO. O tamanho da amostra (N) é descrito abaixo dos grupos. # $p < 0,0001$ vs. grupo Ctrl.

4.4 Estresse oxidativo

A Figura 6 é representativa dos resultados de experimentos conduzidos com o fluorocromo DCFH, empregado para marcação de EROs nas CTMA's. Nota-se que as duas concentrações de DOXO resultaram aumento significativo na produção de EROs. Esses achados corroboram dados apresentados por outros investigadores (Octavia *et al.*²). Ao analisar o papel protetor do LBI é

possível notar que 10 J/cm² de energia foi hábil a inibir o aumento de DCFH em células incubadas com 20 µg de DOXO. Entretanto, em células submetidas a 50 µg de DOXO, todas as doses de LBI foram eficientes em inibir o aumento de DCFH.

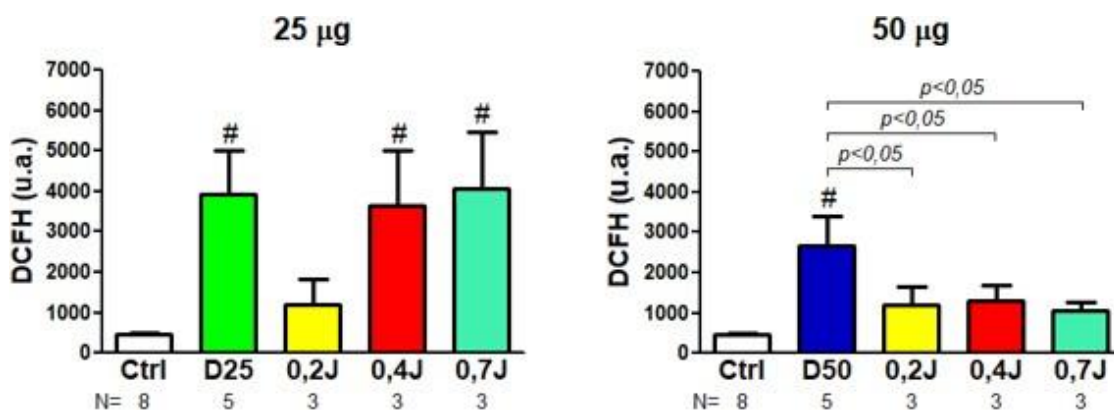


Figura 6. Expressão de CTMA's marcadas com DCFH nos grupos Controle (Ctrl), DOXO (D) e irradiados com diferentes doses de energia antes da incubação com DOXO. O gráfico da esquerda representa experimentos conduzidos com DOXO na dose de 25 µg e, a direita, é possível visualizar dados referentes a 50 µg de DOXO. O tamanho da amostra (N) é descrito abaixo dos grupos. # $p < 0,001$ vs. grupo Ctrl.

4.5 Concentração de ATP

Com base nos resultados anteriores, em que 50 µg de DOXO constituiu a concentração que reduziu a viabilidade em ~ 40% e, que irradiações com LBI na dose de 0,4 J surtir resultados positivos na viabilidade, apoptose e estresse oxidativo, os experimentos seguintes foram conduzidos a margem desses protocolos.

Como ilustrado na Figura 7, a DOXO resultou em concentrações de ATP significativamente reduzidas em comparação ao grupo Ctr em amostras coletadas com 24 e 48 horas de incubação. Para todos os momentos de análise, a aplicação do LBI não resultou em alterações positivas na concentração de ATP (Figura 7).

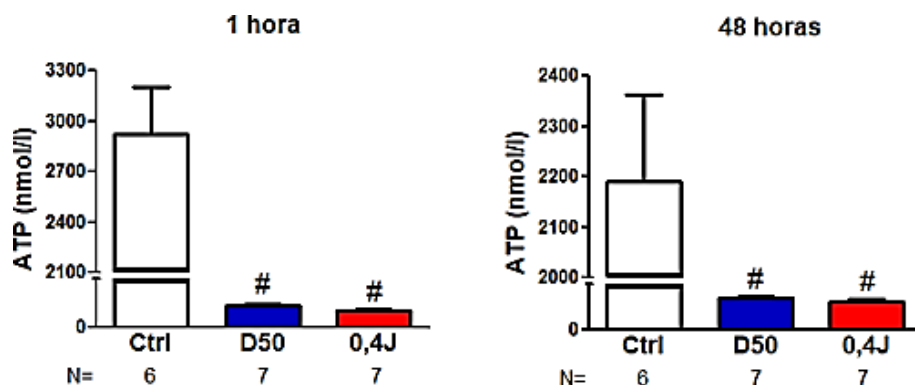


Figura 7. Conteúdo de ATP dosado em CTMA's viáveis nos grupos Controle (Ctrl), DOXO (D) na concentração de 50 µg não irradiadas (D50) e irradiadas com 0,4 J antes da incubação com DOXO. Análises foram realizadas em amostras coletadas com 1 hora e 48 horas de incubação com DOXO. O tamanho da amostra (N) é descrito abaixo dos grupos. #p<0,0001 vs. grupo Ctrl.

4.6 Concentração de IL-6, IL-10 e TNF

A expressão de IL-6, IL-10 e TNF foi analisada por ELISA. Nota-se na Figura 8 que a DOXO resultou em aumento da concentração de IL-6, circunstância que foi potencializada pelo LBI. A DOXO e LBI não resultaram em alterações significativas no teor de IL-10 e TNF, respectivamente.

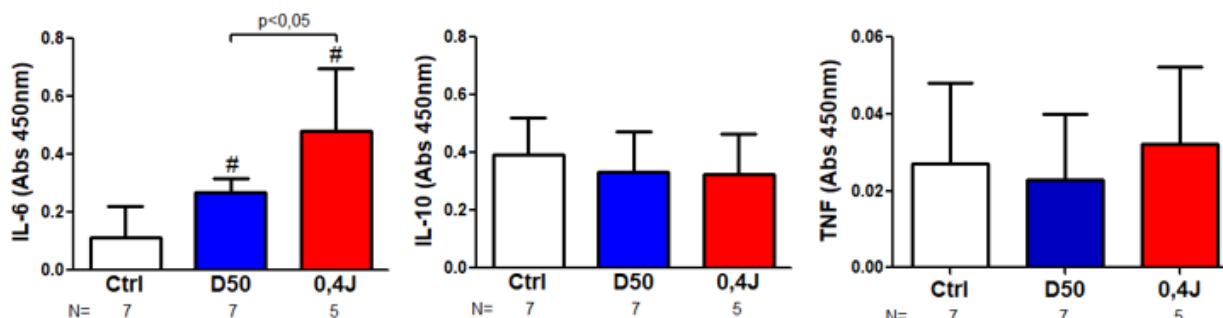


Figura 8. Expressão de IL-6, IL-10 e TNF nos grupos Controle (Ctrl), DOXO (D) na concentração de 50 µg não irradiadas (D50) e irradiadas com 0,4 J antes da incubação com DOXO. O tamanho da amostra (N) é descrito abaixo dos grupos. #p<0,0001 vs. grupo Ctrl.

4.7 Caracterização morfológica

As análises morfológicas ilustram característica fibroblastoide das CTMA's quando aderidas ao plástico (Figura 9). Os painéis A-C indicam a forma das células 24 h antes da incubação com DOXO nos grupos controle, DOXO 50 µg e DOXO 50 µg precedida de irradiações de 0,4 J, respectivamente. Abaixo (D-F), os grupos anteriormente citados, 24h após a incubação com a droga. É possível observar redução do tamanho e quantidade de CTMA's nos painéis E e F devido ao efeito citotóxico da DOXO. Não houve

diferença aparente entre o grupo tratado com o LBI quando comparado ao grupo sem tratamento.

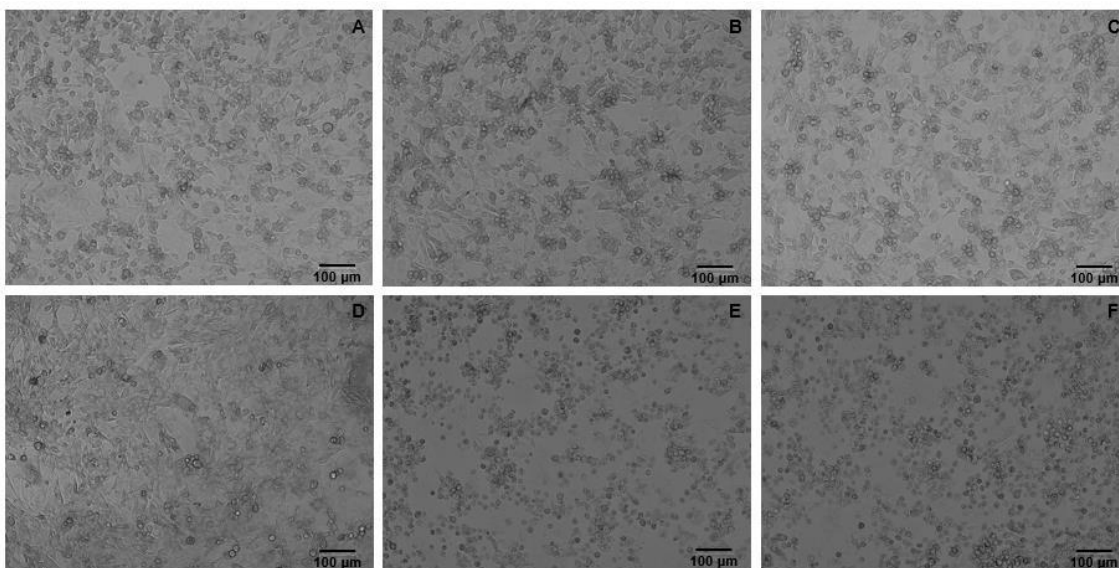


Figura 9. Morfologia celular de CTMA's. Imagens de cima, 24h após o plaqueamento, onde A: Controle, B: D50, C: D50 + 0,4 J. Imagens de baixo, 24h após incubação com DOXO, onde D: Controle, E: D50, F: D50 + 0,4 J.

5. Discussão

Esse projeto de pesquisa foi conduzido para determinar se a irradiação com LBI poderia conferir citoproteção de CTMA's submetidas a toxicidade causada por DOXO *in vitro*. De fato, a incubação das CTMA's com DOXO em concentrações de 25 e 50 µg resultou em reduções de 20 a 40% da viabilidade celular empregando-se a marcação com 7AAD (Fig. 3). Destaque-se o papel da fotobiomodulação, em que exerceu citoproteção para apoptose (Fig. 5) e estresse oxidativo (Fig. 6) em CTMA's irradiadas com LBI, em que o efeito benéfico pode ser dose dependente.

Nossos dados estão em acordo com achados prévios da literatura acerca do potencial citotóxico da DOXO, em que efeitos adversos também foram divulgados para células de câncer de mama, cardiomiócitos e células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea quando incubadas na concentração de 5 µmol/L²¹. De acordo com os estudos de Mvula *et al.*⁴⁸ e Peng *et al.*⁴⁹ há aumento da viabilidade celular de CTM's irradiadas com luz de baixa intensidade, mas estas não foram submetidas a nenhuma forma de estresse. O estudo de Giannelli *et al.*⁵⁰ apresentou resultados interessantes quanto à proliferação celular, de forma que esta variável foi aumentada no grupo de células estromais mesenquimais irradiadas com laser de diodo, em condições normais. Estes achados podem explicar a prevenção de redução da viabilidade em CTMA's incubadas com DOXO, uma vez que tanto a morte quanto a proliferação celular estão associadas à viabilidade celular.

A cultura de CTMA's com 25 µg de DOXO resultou em 3 a 4% apoptose por marcação com Anexina V, enquanto que a concentração de 50 µg resultou em maiores valores de apoptose (30-40%) (Fig. 5). Outros investigadores²⁷ também demonstraram indução de apoptose em CTM's derivadas da medula óssea incubadas com DOXO a 1, 3 e 10 µM. Similar as nossas condições experimentais, nesse mesmo trabalho²⁷, os autores incubaram as células por 48 horas após adição da droga. Com relação a ação do laser, um estudo recente que também avaliou apoptose com o marcador Anexina V⁵¹ observou o efeito anti-apoptótico do laser em CTM's que foram incubadas por 24 e 48 horas com 5-fluorouracil para desencadear o processo.

A DOXO aumentou os níveis de EROs e outros peróxidos em relação ao grupo sem a droga, de acordo com a marcação de DCFH (Fig. 6). Para a

concentração de 50 µg o LBI reduziu significativamente os compostos marcados por DCFH, corroborando com Biasibetti *et al.*⁵² que estudou o efeito do LBI no estresse oxidativo em ratos com insuficiência cardíaca induzida. As antraciclinas possuem alta afinidade com a membrana interna da mitocôndria, o que leva a alterações na cadeia de transporte de elétrons e consequente aumento na produção de EROs⁵³. O LBI age aumentando a atividade enzimática de importantes proteínas envolvidas no processo antioxidante das células, como por exemplo superóxido dismutase e glutathione-S-transferase. Além disso, estimula a respiração celular via atividade da enzima citocromo C oxidase. O processo desencadeado pela laserterapia resulta em diminuir os níveis de estresse oxidativo, porém, não há dados que comprovem o restabelecimento total deste parâmetro⁵⁴.

Com base nos dados de viabilidade celular, apoptose e estresse oxidativo foram escolhidas as doses de 50 µg de DOXO e 0,4 J de laser para os experimentos posteriores. A DOXO reduziu significativamente a produção de ATP quando comparado as células Ctrl (Fig. 7). Segundo Wu *et al.*⁵⁵, a DOXO administrada em altas concentrações ocasiona diminuição significativa dos níveis de ATP em células de linhagem SMMC-7721. O processo pode ser explicado devido à ativação de PARP (poly(ADP-ribose) polimerase)⁵⁵, uma enzima importante que atua nos processos de transcrição, replicação e reparo do DNA. A hiperativação desta proteína resulta em morte celular via cadeia respiratória. Também há alto consumo de NAD⁺, interferindo diretamente a produção de ATP⁵⁶. É importante mencionar que nossos achados de melhores níveis de viabilidade celular em CTMA's irradiadas com LBI conduziram a acreditar que encontraríamos maiores níveis de ATP. De fato, a maior concentração de CTMA's viáveis no grupo submetido a 0,4 J poderia, *per se*, resultar em maior concentração de ATP. Além disso, muitos dos diferentes efeitos biológicos benéficos da fotobiomodulação são atribuídos a potencialização da produção de ATP^{51,57}. Em nossas condições esse preceito não foi evidente, o que não é inédito em ensaios conduzidos com CTMA's humanas irradiadas com LBI⁵¹.

É bem conhecido que a DOXO exerce efeitos inflamatórios importantes em diferentes tipos de células *in vitro*^{58,59} e *in vivo*^{60,61}. Nessa perspectiva, o conteúdo das citocinas IL-6, TNF e IL-10 foi dosado no sobrenadante das

CTMA's incubadas com DOXO. A ideia é pautada em determinar se a DOXO alterava a secreção das CTMA's e, se o LBI poderia modular a ação do fármaco. Dessas análises, a única modificação significativa foi documentada para IL-6, em que o aumento induzido pela DOXO foi potencializado com a irradiação prévia com LBI (Fig. 8). A IL-6 é uma citocina que age em vários processos fisiológicos associados à inflamação. O aumento da produção de IL-6 pelas CTM's incubadas com DOXO não constitui achados inéditos, sendo que já foi mostrado que o ambiente inflamatório causado pela adição do fármaco faz com que as CTM's expressem citocinas inflamatórias^{62,63,64}. Todavia, a potencialização da expressão da IL-6 com aplicação do LBI é um achado original. Esses achados são intrigantes, na medida que a literatura comumente atribui ao LBI ação anti-inflamatória, como descrito por diversos autores^{51,65,66,67}. A explicação para esses achados ainda carece de investigação, mas a ação parácrina da IL-6 sobre as CTMA's é balizada por efeitos controversos. Pricola *et al.*⁶³ constatou que esta citocina tem papel fundamental na manutenção fisiológica de CTM's humana, influenciando no aumento de proliferação e taxa de regeneração. Além disso, foi visto que IL-6 possui efeito citoprotetor contra apoptose e inibe a diferenciação condrogênica e adipogênica, mantendo as características de CT. Esses dados podem também justificar os resultados encontrados no presente estudo, onde foi observada maior viabilidade celular, menor apoptose e estresse oxidativo em células irradiadas com LBI.

A expressão de IL-10 não foi alterada pela DOXO ou sua associação com o LBI em relação ao controle (Fig. 8). Esta é uma citocina anti-inflamatória⁶⁸, em que o conteúdo mostrou-se elevado em CTMA's humanas submetidas a irradiações com LBI em situação inflamatória causada por LPS⁶⁹. Quanto ao TNF, a literatura apresenta dados controversos em relação a sua expressão ou não pelas CTM's^{70,71}. Apesar de Ma *et al.*⁷⁰ mostrarem que as CTM's não expressam, mas respondem ao TNF, segundo Xing *et al.*⁷¹, foi detectada produção de TNF quando adicionado LPS na cultura das CTM's. Como a DOXO desencadeia uma reação inflamatória, assim como o LPS, acreditava-se que o TNF poderia ser expresso nessas condições. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos irradiado e não irradiado (Fig. 8), uma vez que a baixa expressão desta citocina, mesmo após estímulo

inflamatório causado pela DOXO, não possibilitou repercussão da laserterapia. Segundo Lima *et al.*⁷² o LBI não foi capaz de reduzir a expressão de TNF- α em lesão cutânea de ratos, corroborando com o presente estudo. Entretanto, Yin *et al.*⁶⁹ detectou redução de citocinas pró-inflamatórias quando CT mesenquimais foram irradiadas, assim como aumento das citocinas anti-inflamatórias como descrito anteriormente.

Além das alterações biomoleculares causadas pela DOXO, também foi observada mudança nas características morfológicas das CTMA's (Fig. 9). Segundo Ladeira *et al.*⁷³, essas células possuem aparência fusiforme assemelhando-se a fibroblastos e crescem em uma única camada aderida ao plástico. 24 horas após incubação com o quimioterápico, as células sofreram redução em seu tamanho e apresentaram formato arredondado, demonstrando alta toxicidade da droga. Visualmente, a irradiação com LBI não interferiu na morfologia das CTMA's.

A terapia com CTMA's surge como importante ferramenta no campo da medicina regenerativa. Diversos estudos mostram sua eficácia nos processos de reparo tecidual devido ao fato de serem células multipotentes com fácil aplicabilidade e expansão em cultura. Além de seus benefícios, a obtenção destas células torna-se viável, pois o tecido adiposo abriga grande quantidade de CT e é acessível por cirurgias de lipoaspiração^{73,74,75}. O trabalho com células é limitado pela ausência de efeito sistêmico, já que não há interação com outros tipos celulares que podem interferir nos processos analisados neste estudo.

Como agente potencializador da terapia celular, o laser mostra-se um método valioso. Seu custo-benefício e fácil manuseio possibilitam a reprodução de diversos tratamentos em um curto período de tempo, além da translocação da técnica para estudos *in vivo* e aplicabilidade clínica. No entanto, mais estudos são necessários para explicar quais mecanismos atuam na otimização das células. Uma sugestão é avaliar a expressão de proteínas relacionadas aos processos de apoptose e balanço oxidativo celular. Desta forma, este trabalho abre novos questionamentos e caminhos para pesquisa futura.

6. Conclusão

Este estudo mostrou que 0,4 J foi a melhor dose do laser de baixa intensidade para reduzir a mortalidade, apoptose e estresse oxidativo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo submetidas a 50 µg de doxorrubicina.

7. Referências Bibliográficas

1. Kluza J, Marchetti P, Gallego MA, Lancel S, Fournier C, Loyens A, Beauvillain JC, Bailly C. Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells. **Oncogene**. 2004, 23:7018-7030.
2. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **J Mol Cell Cardiol**. 2012, 52(6):1213-1225.
3. Yu Q, Li Q, Na R, Li X, Liu B, Meng L, Liutong H, Fang W, Zhu N, Zheng X. Impact of repeated intravenous bone marrow mesenchymal stem cells infusion on myocardial collagen network remodeling in a rat model of doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. **Mol Cell Biochem**. 2014, 387:279-285.
4. Govender J, Loos B, Marais E, Engelbrecht AM. Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review of the protective role of melatonin. **J Pineal Res**. 2014, 57(4):367-380.
5. Jean SR, Tulumello DV, Riganti C, Liyanage SU, Schimmer AD, Kelley SO. Mitochondrial Targeting of Doxorubicin Eliminates Nuclear Effects Associated with Cardiotoxicity. **ACS Chem**. 2015; 18;10(9):2007-15.
6. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. **N Eng J Med**. 1991, 324(12):808-8015.
7. Hottz JL, Lima DVM. Monitoração da ocorrência de extra-sístoles ventriculares relacionadas à infusão de antraciclinas como ferramenta para a enfermagem. **61º Congresso Brasileiro de Enfermagem, Fortaleza-CE**. 2009, trabalho 623.
8. Mohamed RH, Karam RA, Hagrass HA, Amer MG, El-Haleem MRA. Anti-apoptotic effect of spermatogonial stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. **Gene**. 2015, 561:107-114.
9. Kanorev EA, Vanamala S, Kalyanaraman B. Differences in Doxorubicin-Induced Apoptotic Signaling in Adult and Immature Cardiomyocytes. **Free Radic Biol Med**. 2008; 45(12):1723-1728.
10. Singla DK. Akt-mTOR pathway inhibits apoptosis and fibrosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity following embryonic stem cell transplantation. **Cell Transplantation**. 2014.
11. Silva MSV, Bocchi EA, Guimarães GV, Padovani CR, Silva MHGG, Pereira SF, Fontes RD. Benefits of exercise training in the treatment of heart failure. Study with a control group. **Arq Bras Cardiol**. 2002, 79(4):357-362.

12. Ferraz AS, JUNIOR PY. Prescrição do exercício físico para pacientes com insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**. 2006, ano XV nº9.
13. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidante nutrients. **Food Chem Toxicol**. 2010, 48(6):1425-1438.
14. Nayak PG, Paul P, Bansal P, Kutty NG, Pai KSR. Sesamol prevents doxorubicin-induced oxidative damage and toxicity on H9c2 cardiomyoblasts. **J Pharm Pharmacol**. 2013, 65:1083-1093.
15. CARDIOXANE: cloridrato de dexrazoxano. Alexandre Endringer Ribeiro. Bélgica: CENEXI - Laboratoires Thissen S.A, 2014. Bula de remédio.
16. Vachhani P, Shin S, Baron J, Thompson JE, Wetzler M, Griffiths EA, Ontiveros EP, Spangenthal EJ, Wang ES. Dexrazoxane for cardioprotection in older adults with acute myeloid leucemia. **Leuk Res Resp**. 2017, 7:36-39.
17. Van-Dalen EC, Caron HV, Dickinson HO, Kremer LCM. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. **Cochrane Database Syst Rev**. 2011, 15:CD003917.
18. Karpov AA, Uspenskaya YK, Minasian SM, Puzanov MV, Dmitrieva RI, Bilibina AA, Anisimov S.V., Galagudza M.M. The effect of bone marrow - and adipose tissue - derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodeling in the rat model of ischaemic heart failure. **Int J Exp Path**. 2013, 94:169-177.
19. Cai B, Wang G, Chen N, Liu Y, Yin K, Ning C, Li X, Yang F, Wang N, Wang Y, Pan Z, Lu Y. Bone marrow mesenchymal stem cells protected post-infarcted myocardium against arrhythmias *via* reversing potassium channels remodeling. **J Cell Mol Med**. 2014, 18(7):1407-1416.
20. Miao Q, Shim W, Tee N, Lim SY, Chung YY, Ja MPMM, Ooi TH, Tan G, Kong G, Wei H, Lim CH, Sin YK, Wong P. iPSC-derived human mesenchymal stem cells improve myocardial strain of infarcted myocardium. **J Cell Mol Med**. 2014, 18(8):1644-1654.
21. Gopinath S, Vanamala SK, Gondi CS, Rao JS. Human umbilical cord blood derived stem cells repair doxorubicin-induced pathological cardiac hypertrophy in mice. **Biochem Bio Res Comm**. 2010, 395:367-372.
22. Gorji SM, Malekshah AAK, Hashemi-Soteh MB, Rafiei A, Parivar K, Aghdami N. Effect of mesenchymal stem cells on doxorubicin-induced fibrosis. **Cell J**. 2012, 14(2):142-151.
23. Oliveira MS, Melo MB, Carvalho JL, Melo IM, Lavor MS, Gomes DA, de Goes AM, Melo MM. Doxorubicin Cardiotoxicity and Cardiac Function

Improvement After Stem Cell Therapy Diagnosed by Strain Echocardiography. **J Cancer Sci Ther.** 2013, 5(2):52-57.

24. Oliveira MS, Carvalho JL, Campos ACDA, Gomes DA, Goes AM, Melo MM. Doxorubicin has *in vivo* toxicological effects on *ex vivo* cultured mesenchymal stem cells. **Toxicology Letters.** 2014, 224:380-386.

25. Ezquer F, Gutiérrez J, Ezquer M, Caglevic C, Salgado HC, Calligaris SD. Mesenchymal stem cell therapy for doxorubicin cardiomyopathy: hopes and fears. **Stem Cell Res Ther.** 2015, 6:116.

26. Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, Santos L, Becker C, Gonçalves GA, Vassallo PF, Schettert IT, Tucci PJ, Krieger JE. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. **PLoS One.** 2009, 4(6):e6005.

27. Yang F, Chen H, Liu Y, Yin K, Wang Y, Li X, Wang G, Wang S, Tan X, Xu C, Lu Y, Cai B. Doxorubicin caused apoptosis of mesenchymal stem cells via p38, JNK and p53 pathway. **Cell Physiol Biochem.** 2013, 32:1072-1082.

28. Lu HH, Li YF, Sheng ZQ, Wang Y. Preconditioning of stem cells for the treatment of myocardial infarction. **Chin Med J (Engl).** 2012, 125(2):378-384.

29. Liu TCK, Ismail S, Brennan O, Hastings C, Duffy GP. Encapsulation of cardiac stem cells in superoxide dismutase-loaded alginate prevents doxorubicin-mediated toxicity. **J Tissue Eng Regen Med.** 2013, 7:302-311.

30. Emelyanov AN, Kiryanova VV. Photomodulation of proliferation and differentiation of stem cells by the visible and infrared light. **Photomed Laser Surg.** 2015, 33(3):164-174.

31. Horvát-Karajz K, Balogh Z, Kovács V, Drrernat AH, Sréter L, Uher F. In vitro effect of carboplatin, cytarabine, paclitaxel, vincristine, and low-power laser irradiation on murine mesenchymal stem cells. **Lasers Surg Med.** 2009, 41(6):463-469.

32. Oliveira TS, Serra AJ, Manchini MT, Bassaneze V, Krieger JE, Carvalho PTC, Antunes DE, Bocalini DS, Tucci PJF, Silva JAJ. Effects of low level laser therapy on attachment, proliferation, and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 of adipocyte-derived mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency. **Lasers Med Sci.** 2015, 30(1):217-223.

33. Tuby H, Maltz L, Oron U. Implantation of low-level laser irradiated mesenchymal stem cells into the infarcted rat heart is associated with reduction in infarct size and enhanced angiogenesis. **Photomed Laser Surg.** 2009, 27(2):227-233.

34. Park IS, Mondal A, Chung PS, Ahn JC. Vascular regeneration effect of adipose-derived stem cells with light-emitting diode phototherapy in ischemic tissue. **Lasers Med Sci.** 2015, 30(2):533-541.

35. Park IS, Mondal A, Chung PS, Ahn JC. Prevention of skin flap necrosis by use of adipose-derived stromal cells with light-emitting diode phototherapy. **Cytotherapy**. 2015, 17(3):283-292.
36. George S, Heng BC, Vinoth KJ, Kishen A, Cao T. Comparison of the response of human embryonic stem cells and their differentiated progenies to oxidative stress. **Photomed Laser Surg**. 2009, 27(4):669-674.
37. Huang YY, Nagata K, Tedford CE, Hamblin MR. Low-level laser therapy (810 nm) protects primary cortical neurons against excitotoxicity in vitro. **J Biophotonics**. 2014, 7(8):656-664.
38. Lim WB, Kim JS, Ko YJ, Kwon H, Kim SW, Min HK, Kim O, Choi HR, Kim OJ. Effects of 635nm light-emitting diode irradiation on angiogenesis in CoCl₂-exposed HUVECs. **Lasers Surg Med**. 2011, 43(4):344-352.
39. Lim W, Kim J, Lim C, Kim S, Jeon S, Karna S, Cho M, Choi H, Kim O. Effect of 635 nm light- emitting diode irradiation on intracellular superoxide anion scavenging independent of the cellular enzymatic antioxidant system. **Photomed Laser Surg**. 2012, 30(8):451-459.
40. Souza NH, Marcondes PT, Albertini R, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Aimbire F. Low-level laser therapy suppresses the oxidative stress-induced glucocorticoids resistance in U937 cells: relevance to cytokine secretion and histone deacetylase in alveolar macrophages. **J Photochem Photobiol B**. 2014, 130:327-336.
41. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Afonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Bio Cell**. 2002,13(12):4279-4295.
42. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. **Las Surg Med**. 2007, 39:373-378.
43. Bassaneze V, Barauna VG, Lavini-Ramos C, Kalil J, Schettert IT, Miyakawa AA, Krieger JE. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev**. 2010, 19(3):371-378.
44. Moskvin SV, Kliuchnikov DI, Antipov EV, Volchkov SE, Kiseleva ON. The influence of pulsed low-intensity laser radiation of the red (635 nm) and infrared (904 nm) spectra on the human mesenchymal stem cells in vitro. **Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult**. 2014, 6:40-47.
45. Ginani F, Soares DM, Barreto MPV, Barboza CAG. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. **Lasers Med Sci**. 2015.

46. Soares DM, Ginani F, Henriques ÁG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. **Lasers Med Sci.** 2015, 30(3):1171-1174.
47. Qi Z, Zhang Y, Liu L, Guo X, Qin J, Cui G. Mesenchymal stem cells derived from different origins have unique sensitivities to different chemotherapeutic agents. **Cell Biol Int.** 2012, 36:857-862.
48. Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. **Laser Med Sci.** 2010, 25:33-39.
49. Peng F, Wu H, Zheng Y, Xu X, Yu J. The effect of noncoherent red light irradiation on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. **Laser Med Sci.** 2012, 27:645-653.
50. Giannelli M, Chellini F, Sassoli C, Francini F, Pini A, Squecco R, Nosi D, Bani D, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action. **J Cell Physiol.** 2013, 228(1):172-81.
51. Yin K, Zhu R, Wang S, Zhao RC. Low level lasers effect on proliferation, migration and anti-apoptosis of mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev.** 2017, 26(10):762-775.
52. Biasibetti M, Rojas DB, Hentschke VS, Moura DJ, Karsten M, Wannmacher CMD, Saffi J, Lago PD. The influence of low-level laser therapy on parameters of oxidative stress and DNA damage on muscle and plasma in rats with heart failure. **Lasers Med Sci.** 2014, 29(6):1895-906.
53. Cappetta D, Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, Rossi F, Berrino L, Naviglio S, Urbanek K. Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: a common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** 2017, 2017:1-13.
54. Monich VA, Bavrina AP, Malinovskaya SL. Modification in oxidative processes in muscle tissues exposed to laser- and light-emitting diode radiation. **Lasers Med Sci.** 2017.
55. Wu L, Zhao J, Cai H, Wang J, Chen J, Li W, Liu X. Dahuang zhechong pill combined with doxorubicin induces cell death through regulating energy metabolism in human hepatocellular carcinoma cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** 2017, 2017:1-8.
56. Morales JC, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA. Review of poly (adp-ribose) polymerase (parp) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** 2014, 24(1):15-28.

57. Passarella S, Casamassima E, Pastore MD, Quagliariello E, Catalano IM, Cingolani A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS LETTERS**. 1984, 175(1):95-99.
58. Wang S, Wang Y, Zhang Z, Liu Q, Gu J. Cardioprotective effects of fibroblast growth factor 21 against doxorubicin-induced toxicity via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway. **Cell Death Dis**. 2017, 8(8):e3018.
59. Yuan YP, Ma ZG, Zhang X, Xu SC, Zeng XF, Yang Z, Deng W, Tang QZ. CTRP3 protected against doxorubicin-induced cardiac dysfunction inflammation and cell death via activation of Sirt1. **J Mol Cell Cardiol**. 2017, 114:38-47.
60. Kim YS, Sung SH, Tang Y, Choi EJ, Choi YJ, Hwang YJ, Park PJ, Kim EK. Protective effect of taurine on mice with doxorubicin-induced acute kidney injury. **Adv Exp Med Biol**. 2017, 975:1191-1201.
61. Olson RD, Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. **Faseb J**. 1990, 4(13):3076-3086.
62. Bernard A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Guitierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. **Immunity**. 1994, 1(9):725-731.
63. Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. **J Cell Biochem**. 2009, 108(3):577-588.
64. Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. **Rev Bras Anestesiol**. 2011, 61(2):255-265.
65. Chu YH, Chen SY, Hsieh YL, Teng YH, Cheng YJ. Low-level laser therapy prevents endothelial cells from TNF- α /cycloheximide-induced apoptosis. **Lasers Med Sci**. 2017.
66. Hamblin MR. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. **Photochem Photobiol**. 2017.
67. Lee JH, Chiang MH, Chen PH, Ho ML, Lee HE, Wang YH. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy on human periodontal ligament cells: in vitro study. **Lasers Med Sci**. 2017.
68. Kapur SK, Katz AJ. Review of the adipose derived stem cell secretome. **Biochimie**. 2013, 95(12):2222-8.
69. Yin K, Zhu R, Wang S, Zhao RC. Low level laser (LLL) attenuate LPS-induced inflammatory responses in mesenchymal stem cells via the suppression of NF- κ B signaling pathway in vitro. **PLoS ONE**. 2017, 12(6):e0179175.

70. Ma S, Xie N, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death and Differentiation**. 2014, 21:216-225.
71. Xing J, Hou T, Jin H, Luo F, Chang Z, Li Z, Xie Z, Xu J. Inflammatory microenvironment changes the secretory profile of mesenchymal stem cells to recruit mesenchymal stem cells. **Cell Physiol Biochem**. 2014, 33:905-919.
72. Lima AA, Spínola LG, Bacchan G, Correia K, Oliva M, Vasconcelos JF, Soares MB, Reis SR, Medrado AP. Evaluation of corticosterone and IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α expression after 670-nm laser photobiomodulation in rats. **Lasers Med Sci**. 2014, 19(2):709-15.
73. Ladeira PRS, Isaac C, Nakamura YM, Tutihashi RMC, Paggiaro AO, Ferreira MC. Cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo: uma análise crítica. **Rev Med**. 2012, 91(4):246-52.
74. Blydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2009, 31(1):25-35.
75. Souza CF, Napoli P, Han SW, Lima VC, Carvalho ACC. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Rev Bras Cardiol Invasiva**. 2010, 18(3):344-53.

8. Apêndices

8.1 Artigo publicado (2017)

DOI: 10.1590/1806-9282.63.01.29

ORIGINAL ARTICLE

Experimental burns: Comparison between silver sulfadiazine and photobiomodulation

MARIANA TEIXEIRA GOMES¹, GABRIELA RUSSO SOEIRO CAMPOS¹, NATÁLIA PICCOLO², CRISTIANE MIRANDA FRANÇA⁴, GUELTON HIRANO GUEDES¹, FABIO LOPES¹, RENATA A. BELOTTO^{1,3}, CHRISTIANE PAVANI⁴, RAFAEL DO NASCIMENTO DE LIMA⁴, DANIELA DE FÁTIMA TEIXEIRA DA SILVA^{1*}

¹Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho (Uninove), São Paulo, SP Brazil

²MD, Uninove, São Paulo, SP Brazil

³Sector of Gynecology of the Women's Health Reference Center, Hospital Pérola Byington, São Paulo, SP Brazil

8.2 Artigo publicado (2017)

DOI: 10.3389/fphys.2017.00023



ORIGINAL RESEARCH
published: 30 January 2017
doi: 10.3389/fphys.2017.00023



Low-Level Laser Application in the Early Myocardial Infarction Stage Has No Beneficial Role in Heart Failure

Martha T. Manchini^{1,2*}, Ednei L. Antônio², José Antônio Silva Junior³, Paulo de Tarso C. de Carvalho¹, Regiane Albertini², Fernando C. Pereira¹, Regiane Feliciano¹, Jairo Montemor², Stella S. Vieira^{1,2}, Vanessa Grandinetti¹, Amanda Yoshizaki², Marcio Chaves¹, Moisés P. da Silva¹, Rafael do Nascimento de Lima¹, Danilo S. Bocalini⁴, Bruno L. de Melo², Paulo J. F. Tucci² and Andrey J. Serra^{1,2}

¹Laboratory of Biophotonic, Nove de Julho University, São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Laboratory of Cardiac Physiology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Medicine Program, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil,

⁴Translational Physiology Laboratory, Brazil Physical Education and Aging Science Program, Sao Judas Tadeu University, São Paulo, Brazil

8.3 Artigo publicado (2016)

DOI: 10.2174/1874192401610010057

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

The Open Cardiovascular Medicine Journal, 2016, 10, 57-63

57

 	<h2>The Open Cardiovascular Medicine Journal</h2> <p>Content list available at: www.benthamopen.com/TOCMI/</p> <p>DOI: 10.2174/1874192401610010057</p>	
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Does Stroke Volume Increase During an Incremental Exercise? A Systematic Review

Stella S. Vieira¹, Brunno Lemes¹, Paulo de T. C. de Carvalho², Rafael N. de Lima², Danilo S. Bocalini³, José A. S. Junior⁴, Gisela Arsa⁵, Cezar A. Casarin², Erinaldo L. Andrade³ and Andrey J. Serra^{2,*}

¹*Universidade Federal de São Paulo, Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíaca, São Paulo, SP, Brazil*

²*Universidade Nove de Julho, Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada a Ciências da Saúde, São Paulo, SP, Brazil*

³*Laboratório de Fisiologia Transacional dos Programas de Pós Graduação em Educação Física e Ciências do Envelhecimento, São Paulo, SP, Brasil*

⁴*Universidade Nove de Julho, Programa de Pós-Graduação em Medicina, São Paulo, SP, Brazil*

⁵*Universidade Federal do Mato Grosso, Programa de Mestrado em Educação Física, Cuiabá, MT, Brazil*

Received: August 22, 2015

Revised: September 20, 2015

Accepted: October 22, 2015