

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

CAMILA SOARES MALTA

**EFEITO DA BIOFOTOMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE BIOMARCADO-
RES EM CÉLULAS HUVEC SUBMETIDAS À HIPÓXIA EXPERIMENTAL**

São Paulo, SP
2017

CAMILA SOARES MALTA

EFEITO DA BIOFOTOMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES EM CÉLULAS HUVEC SUBMETIDAS À HIPÓXIA EXPERIMENTAL

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Profº Dr. José Antônio Silva Júnior.

**São Paulo, SP
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Malta, Camila Soares.

Efeito da biofotomodulação na expressão de biomarcadores em células HUVEC submetidas à hipóxia experimental. / Camila Soares Malta. 2017.

73 f.

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

Orientador (a): Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior.

1. HUVEC. 2. Hipóxia. 3. Biofotomodulação.

I. Silva Júnior, José Antônio. II. Título

CDU 616

São Paulo, 23 de fevereiro de 2017.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): **CAMILA SOARES MALTA**

Título da Dissertação: **EFEITO DA BIOMODULAÇÃO NA MORTE CELULAR, EXTRESSE OXIDATIVO E EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES EM CÉLULAS HUVEC SUBMETIDAS À HIPÓXIA EXPERIMENTAL**

Presidente: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR

Jose Antonio Silva Junior

Membro: PROFA. DRA. MARICILIA SILVA COSTA

Maricilia Silva Costa

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI

Maria Aparecida Dalboni

AGRADECIMENTOS

Na impossibilidade de criar uma lista de importância eu agradecerei em ordem cronológica:

A minha família que me apoia desde o início da caminhada. É com ela que eu mais aprendo.

Ao Profº Humberto Dellê que me deu a oportunidade de participar da Iniciação Científica. Além de um ótimo profissional, o Profº Humberto é uma pessoa admirável.

Aos colegas de mestrado e amigos, Rodrigo Barbosa, Yves Matos, Diego Souza, Luiz Matheus e Jacqueline Ferritto. Sem a participação dessas pessoas este trabalho não seria o mesmo.

Aos técnicos dos laboratórios, Angela Gomes, Giovanni, Alana Dias e Márcio Chaves. Eles sempre estiveram prontos a ajudar e solucionar problemas além de serem companheiros.

A Profª Kristiane Porta pela gentileza em ceder o equipamento de laser. Agradeço também os alunos Kaline Sousa, Agnelo Alves e Nadhia Costa, pois estavam sempre disponíveis a ajudar.

Ao Yurik Jackow não só pela ajuda, mas também pela compreensão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Profº José Antônio por ter me ensinado muito mais do que está escrito neste trabalho. Eu assumo que com dificuldade sou uma pessoa diferente daquela que iniciou o curso. Agradeço por me desafiar a fazer o que nunca fiz e agradeço por me tirar de uma zona de conforto, de fato é assim que mais crescemos.

*Quem me dera ouvir de alguém a voz humana,
Quem confessasse não um pecado, mas uma infâmia;
Que contasse, não uma violência, mas uma cobardia!
Não, são todos o Ideal, se os oiço e me falam.
Quem há neste largo mundo que me confesse que uma vez foi vil?
Ó príncipes, meus irmãos,*

*Arre, estou farto de semideuses!
Onde há gente no mundo?*

Então só eu que é vil e errôneo nesta terra?

Álvaro de Campos, heterônimo de Fernando Pessoa

RESUMO

INTRODUÇÃO: São crescentes os estudos sobre a aplicabilidade da biofotomodulação, pois seus resultados são satisfatórios tanto na pesquisa clínica quanto experimental. Sabe-se que *in vitro* o laser é capaz de melhorar a viabilidade celular, aumentar a proliferação e diminuir a morte. Entretanto, atualmente na literatura não foi descrito ainda a utilização do laser em células endoteliais como pré-tratamento. Estas células tem potencial angiogênico promissor às terapias de revascularização em casos de aterosclerose e isquemias. Sendo o laser capaz de modular o metabolismo celular torna-se uma alternativa terapêutica nestes casos. **OBJETIVO:** O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos da biofotomodulação em células endoteliais submetidas à hipóxia experimental. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Grupos de células Endoteliais de Cordão Umbilical Humano (HUVEC) foram irradiadas com laser de comprimento de onda de 660nm, potência 10 mW, DE 1,5 J/cm² por 6 segundos (grupos Laser e Laser + Hipóxia). Em seguida, grupos foram submetidas à hipóxia por 24h (grupos Hipóxia e Laser + Hipóxia). Após esse período foram realizadas as análises para viabilidade celular para apoptose (Iodeto de Propídio) e necrose (Anexina V), molécula de adesão leucocitária (CD11b) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo. As células e sobrenadantes foram coletados e processados para análise da expressão de VEGF por PCR em tempo real e ELISA, respectivamente. **RESULTADOS:** A hipóxia diminuiu a viabilidade das células HUVEC, porém, não foi possível observar diferença significativa quanto a viabilidade celular, expressão de CD11b e valores de ROS nos grupos pré-tratados com laser submetidas à hipóxia. No entanto, a expressão do RNAm do VEGF aumentou significativamente após a irradiação com laser em células submetidas à hipóxia, entretanto este aumento da expressão não foi detectado por ELISA em meio de cultura deste grupo. **CONCLUSÃO:** Demonstramos que o pré-tratamento com laser foi eficaz em aumentar a expressão de RNAm de VEGF em células HUVEC após o protocolo de hipóxia.

Palavras chave: HUVEC, hipóxia, biofotomodulação.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Studies about the applicability of laser therapy are increasing because their satisfactory results in clinical and experimental research. It is known that *in vitro* laser irradiation is capable of improving cell viability, increasing proliferation and decreasing death. However, there is no description in the literature about the use of laser in endothelial cells as a pretreatment. These cells have promising angiogenic potential for revascularization therapies in cases of atherosclerosis and ischemia. Therefore, laser is able to modulate the cellular metabolism becomes a therapeutic alternative in these cases. **PURPOSE:** The objective of the present study was to analyze the effects of photobiomodulation on endothelial cells submitted to experimental hypoxia. **MATERIALS AND METHODS:** Human Umbilical Cord Endothelial Cell (HUVEC) groups were irradiated with a 660nm wavelength laser, 10 mW, 1.5 J/cm² DE for 6 seconds (Laser and Laser + Hypoxia groups). Subsequently, groups were submitted to hypoxia for 24h (Hypoxia and Laser + Hypoxia groups). In sequence, cell viability analyzes for apoptosis (Propidium Iodide) and necrosis (Annexin V), leukocyte adhesion molecule (CD11b) and reactive oxygen species (ROS) were performed by flow cytometry. Cells and supernatants were collected and processed for analysis of VEGF expression by real-time PCR and ELISA, respectively. **RESULTS:** Hypoxia decreased cell viability in HUVEC cells. Therefore, laser-treated group submitted to hypoxia did not show significant differences in cell viability, CD11b expression and ROS values. However, VEGF mRNA expression increased significantly after laser irradiation in cells submitted to hypoxia. Increased VEGF expression was not detected by ELISA in culture medium of this group. **CONCLUSION:** We demonstrated that laser pretreatment was effective in increasing VEGF mRNA expression of HUVEC cells after hypoxia protocol.

Key words: HUVEC, hypoxia, photobiomodulation.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Valores relativos a apoptose, CD11b e dupla marcação de CD11b e apoptose (n=13)..... | 33 |
| Tabela 2. Tabela 2. Valores relativos a apoptose, necrose, apoptose tardia e viabilidade. (n=13)..... | 34 |
| Tabela 3. Valores relativos à expressão de CD11b, necrose, dupla marcação de CD11b e necrose, ausência de ambas as marcações (n=13) e ROS (n=5)..... | 36 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Descrição dos anticorpos utilizados para análises de citometria de fluxo..... | 26 |
| Quadro 2. Descrição do ensaio para avaliação de ROS..... | 28 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação do processo de inflamação e biomarcadores vasoativos..... | 6 |
| Figura 2. Representação de possíveis ações do TNF- α na célula. Após ligar-se ao receptor, o TNF- α estimula a ativação do NF-kB que atuará na síntese e liberação de moléculas envolvidas no processo inflamatório e imune..... | 7 |
| Figura 3. Fotomicrografia de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) em cultura em baixa e alta densidade de células..... | 9 |
| Figura 4. Representação do espectro visível e respectivos comprimentos de ondas..... | 16 |
| Figura 5. Caracterização das células HUVEC por citometria de fluxo com marcadores específicos de células endoteliais..... | 19 |
| Figura 6. Fotomicrografia de células HUVEC em cultura em confluência. Aumento de 10x..... | 21 |
| Figura 7. Fotografia de garrafas de cultivo de células HUVEC mostradas nos quatro grupos experimentais..... | 22 |
| Figura 8. Fotografia de garrafas de células HUVEC em cultura (grupos HIPÓXIA e LASER HIPÓXIA) em anaerobiose com kit AnaeroGen Compact..... | 23 |
| Figura 9. Fotografia do aparelho Twin FLEX-LASER (MMOptics Ltda, São Carlos, SP, Brasil) utilizado neste estudo..... | 24 |

| | |
|--|----|
| Figura 10. Representação da irradiação laser nas células HUVEC precipitadas por centrifugação no fundo do tubo cônico de polipropileno..... | 25 |
| Figura 11. Expressão de CD11b das células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia. (n=13)..... | 33 |
| Figura 12. Expressão de marcador de necrose nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia. (n=13)..... | 34 |
| Figura 13. Dupla marcação de apoptose e necrose caracterizando apoptose tardia das células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia. (n=13)..... | 35 |
| Figura 14. Viabilidade das células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia. (n=13)..... | 35 |
| Figura 15. Expressão de CD11b nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a necrose. (n=13)..... | 36 |
| Figura 16. Expressão de marcação referente a necrose nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=13)..... | 37 |
| Figura 17. Ausência de marcação para CD11b e necrose nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=13)..... | 37 |
| Figura 18. Análise de ROS nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=5)..... | 38 |
| Figura 19. Expressão de RNAm de VEGF nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=3) *0,01 em relação ao Controle; #0,05 em relação ao Controle, Laser e Hipóxia..... | 39 |
| Figura 20. Análise da concentração de VEGF no sobrenadante de células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=3)..... | 39 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP – Adenosina Difosfato
ATP – Adenosina Trifosfato
BSA – *Bovine Serum Albumin* (do inglês)
CD – *Cluster of Differentiation* (do inglês)
DCFH-DA – 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato

DE – Densidade De Energia
DP – Densidade de potência
ERK – *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (do inglês)
ET – *Endolectina* (do inglês)
HUVEC – *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (do inglês)
ICAM – *Intercellular Adhesion Molecule* (do inglês)
IL – Interleucina
LASER – *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation* (do inglês)
LBI – Laser de Baixa Intensidade
MIF – Média de intensidade de fluorescência
NF- κ B – *Factor Nuclear Kappa B* (do inglês)
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (do inglês)
pH – Potencial Hidrogeniônico
PI – Iodeto de Propídio
RNA_m – RNA mensageiro
ROS – *Reactive Oxygen Species* (do inglês)
SE-S – *Soluble Selectina* (do inglês)
SFB – Soro Fetal Bovino
Sp – *Specificity protein* (do inglês)
SPSS – *Statistical Package Social Sciences* (do inglês)
t – tempo
TNF- α – *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (do inglês)
VCAM – *Vascular Cell Adhesion Molecule* (do inglês)
VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (do inglês)

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| Infarto do miocárdio..... | 1 |
| Células endoteliais..... | 2 |
| Hipóxia..... | 9 |
| Biofotomodulação | 11 |
| Conceitos do laser e biofotomodulação | 12 |
| Ação do laser..... | 13 |
| Efeitos primários ou diretos do laser | 14 |
| Efeitos secundários ou indiretos do laser | 14 |
| OBJETIVO | 17 |
| Objetivos específicos | 18 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| Cultura celular | 18 |
| Indução de hipóxia..... | 21 |
| Irradiação laser..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| Citometria de fluxo para detecção de CD11B, Anexina V e Iodeto de Propídio | 25 |
| Citometria de fluxo para detecção de produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)..... | 27 |
| Análise da expressão gênica | 28 |
| Tratamento do RNA total e Integridade das amostras | 28 |
| Síntese de cDNA - Transcrição Reversa | 29 |
| Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR..... | 29 |
| Análise da expressão proteica..... | 31 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA | 31 |
| RESULTADOS..... | 32 |
| DISCUSSÃO | 39 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 43 |
| CONCLUSÃO | 44 |
| REFERÊNCIAS..... | 45 |

INTRODUÇÃO

Infarto do miocárdio

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no Brasil e no mundo (Rosamond et al., 2007). Apesar do crescente número de pesquisas para melhorar os métodos diagnósticos e tratamentos da insuficiência cardíaca congestiva, esta tem sido uma das doenças cardiovasculares com maior incidência, prevalência e grande mortalidade, e o infarto agudo do miocárdio é sua principal causa (Francis, 2001).

O infarto do miocárdio possui alto índice de causa de morte, e leva a grandes custos no sistema de saúde, sendo as doenças isquêmicas do coração representadas por 30% do total das mortes por doenças cardiovasculares nos países ocidentais (Rosamond et al., 2007). Seu crescimento acelerado nos países em desenvolvimento, como o Brasil, representa uma questão importante de saúde pública.

Por isso, tanto o infarto do miocárdio (IM) e a insuficiência cardíaca (IC) são doenças de significantes implicações sociais de interesse às pesquisas para elucidar a fisiopatologia e desta forma desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes.

Como tratamento para a isquemia do IM, para restabelecer o fluxo sanguíneo, é realizada uma desobstrução coronariana (farmacológica ou cirúrgica). Entretanto, essa técnica apresenta menor grau de eficiência podendo causar complicações (Abbate et al., 2007).

Devido à necrose isquêmica causada pelo IM, tanto no homem quanto no animal de experimentação, ocorre uma resposta inflamatória aguda com infiltração leucocitária, fagocitose das células necróticas e reabsorção dos componentes celulares e matriz extracelular comprometida, iniciando um processo de reparação tecidual (Frangogiannis et al., 2002). Em seguida há estruturação da nova matriz extracelular, em especial o colágeno, e formação da cicatriz do infarto (Sun et al., 2000).

Um grande número de métodos terapêuticos tem sido desenvolvidos para modular estes aspectos de disfunção tecidual visando melhora da função, redução de sintomas, melhora da qualidade de vida e aumento da sobrevida. Para tais estudos, o modelo mais utilizado é o modelo experimental de IM em animais já descrito há décadas por Johns e Olson (1954) para o qual é realizada uma cirurgia de oclusão da artéria coronária (Johns; Olson, 1954).

Células endoteliais

As células endoteliais revestem a superfície interna dos vasos sanguíneos. É através dos vasos que o oxigênio e os nutrientes são transportados pelo sangue para todos os tecidos, assim como outras moléculas, íons, compostos proteicos ou lipídicos, restos celulares, células do sistema imune e até mesmo células tumorais em processo de metástase, entre outros, circulam na corrente sanguínea. O endotélio está em contato direto com o sangue que transporta essas moléculas e componentes, por esse motivo pode sofrer alterações quando existe o contato. Essas alterações podem afetar gravemente o endotélio e reduzir suas chances de recuperação ou restringir mecanismos auxiliares, como a angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos, e

também a neoangiogênese que se trata da formação de novos vasos a partir de um vaso pré-existente. Estes dois mecanismos são essenciais ao crescimento tecidual e situações de patológicas de isquemia (Carmeliet & Jain, 2011; Folkman, 2007). Portanto, um endotélio prejudicado pode acarretar em maus prognósticos futuros.

Em um adulto saudável, é rara a formação de novos vasos. Entretanto, é possível que ocorra um remodelamento dos vasos (Adams & Alitalo, 2007; Augustin et al, 2009) e o metabolismo celular é acionado para a secreção de substâncias proangiogênicas até que as alterações fenotípicas celulares favoreçam a formação de um novo vaso ramificado (Carmeliet, 2003; Carmeliet & Jain, 2011; Eilken & Adams, 2010; Phng & Gerhardt, 2009). Uma das principais moléculas que medeiam o processo de angiogênese é o fator de crescimento endotelial (VEGF) (Arroyo & Iruela-Arispe, 2010). Altos níveis de VEGF tem relação direta com o aumento da biogênese mitocondrial, pois no processo de angiogênese há maior demanda de energia pelas células vasculares (Hagberg et al, 2010).

Além de proporcionar uma barreira física sobre a parede vascular e lúmen, o endotélio é considerado um órgão pertencente ao sistema neuroendócrino, cujas células exercem funções pró-inflamatórias e vasodilatadores, anticoagulantes, vasoconstritoras proliferativas e anti-proliferativas, angiogênicas e anti-angiogênicas, imunológicas e autoimunes, autócrinas, parácrinas e endócrinas; o endotélio é capaz de sintetizar moléculas com diferentes funções vasoativas e hormonais, neurotransmissores, citocinas, fatores de crescimento, fatores quimiotáticos, moléculas de adesão celular e receptores de membrana. Devido à síntese e secreção de diversas moléculas, o endotélio pode ser chamado de o órgão mais versátil do corpo humano (Avogaro et al, 2011; Moreira et al, 2009; De La Veja et al, 2007).

As disfunções endoteliais implicam no prejuízo funcional que pode evoluir e tornar-se estrutural fazendo o endotélio perder propriedades fisiológicas, tais como, capacidade de vasodilatação, fibrinólise e antiagregação plaquetária. E diferencia-se a disfunção endotelial do termo ativação endotelial, sendo a ativação endotelial uma resposta fisiológica para minimizar ou anular os efeitos nocivos de um estímulo prejudicial para o tecido vascular (Morales et al, 2010).

A aterosclerose foi descrita por Gomes (2012) como uma das disfunções endoteliais significativas à população brasileira com uma prevalência de 68,7 % na população com histórico familiar para hipertensão arterial e 46,7 % para diabetes, sendo uma doença de início ainda na adolescência e até mesmo na infância.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2013), a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de causa multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial. Inicia-se com a agressão do endotélio vascular por diversos fatores como dislipidemia, hipertensão arterial e tabagismo até a consolidação da placa aterosclerótica. Por consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade do tecido vascular às lipoproteínas plasmáticas possibilitando o acúmulo de lipídeos no endotélio. Estes lipídeos sofrem oxidação e assim expõem epítomos provocando assim uma resposta imunológica.

Outro sinal da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária no endotélio pela oxidação de lipoproteínas. As moléculas de adesão atraem monócitos e linfócitos. Nesta situação, os monócitos diferenciam-se em macrófagos e capturam as lipoproteínas oxidadas. Os macrófagos ativados secretam citocinas que aumentam o processo inflamatório. Linfócitos T, em menor quantidade que os macrófagos, também podem produzir citocinas que modulam o processo inflamatório local. Alguns mediadores da inflamação estimulam a produção de citocinas e

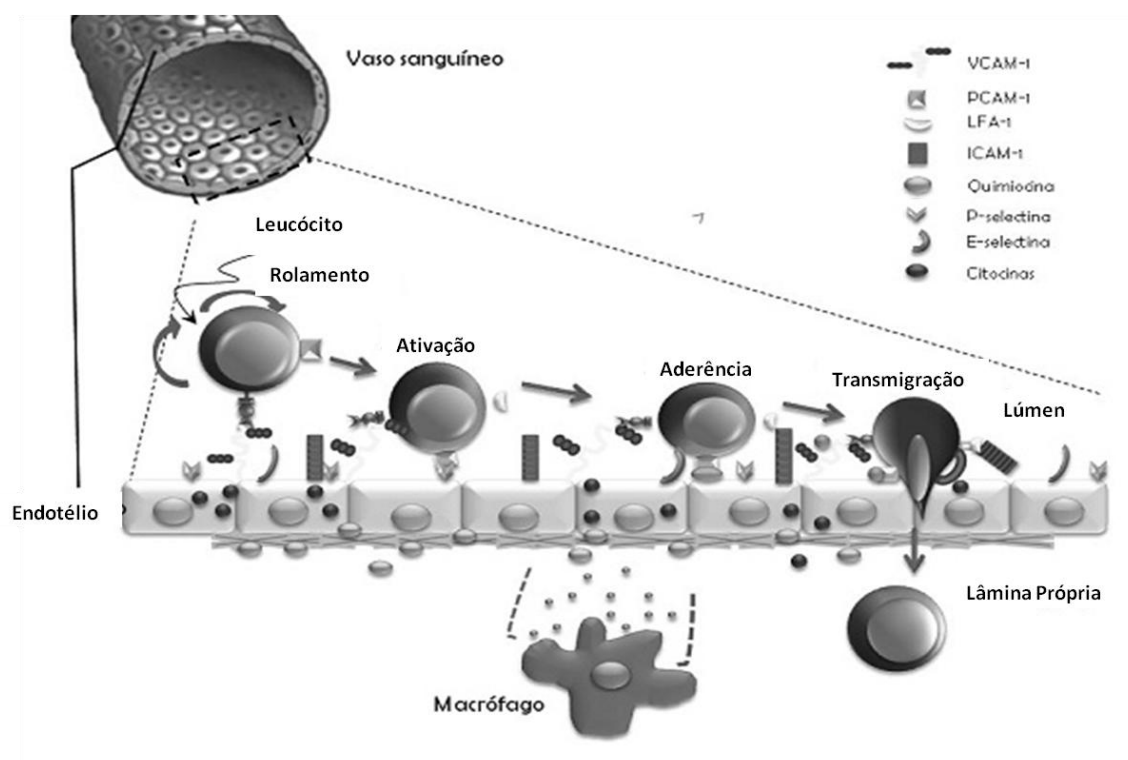
fatores de crescimento. Nas placas estáveis predominam colágeno espesso, células inflamatórias e núcleo lipídico e necrótico. Nas instáveis há atividade inflamatória intensa e atividade proteolítica, núcleo lipídico e necrótico com capa fibrótica. A ruptura desta capa libera esse material lipídico que pode levar à formação de um trombo na circulação (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013).

A fase inicial de uma disfunção endotelial consiste, portanto, no recrutamento de células inflamatórias e a sua migração através do endotélio. Este processo é regulado por moléculas de adesão celular que são expressas na superfície de leucócitos e células endoteliais. Entre as moléculas de adesão estão as selectinas (E-selectina e P-selectina), moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) e de adesão celular vascular-molecular (VCAM-1). As selectinas são expressas somente em células endoteliais ativadas em resposta a citocinas inflamatórias, como a interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Velarde et al, 2007).

A molécula CD11b (Mac-1, α M β 2) é a subunidade α da molécula de adesão de integrina β 2 (CD18) que é expressa na superfície de células mieloides. Nas células mieloides do sistema imune, o CD11b é responsável por facilitar a adesão celular e a transmigração através do endotélio e o tráfego para as regiões de inflamação mediando a resposta inflamatória (Schmid & Varner, 2012; Anderson et al, 1990; Barthel et al, 2006).

Segundo Schmid & Varner (2012), a inibição de CD11b em um ambiente tumoral reduz o recrutamento de células mieloides para a região e assim aumenta a resposta do tumor à radiação (Schmid & Varner, 2012). Sendo assim, o CD11b tem participação na tumorigênese e pode ser útil como biomarcador para a terapia de tratamento tumoral (Zhang et al, 2015).

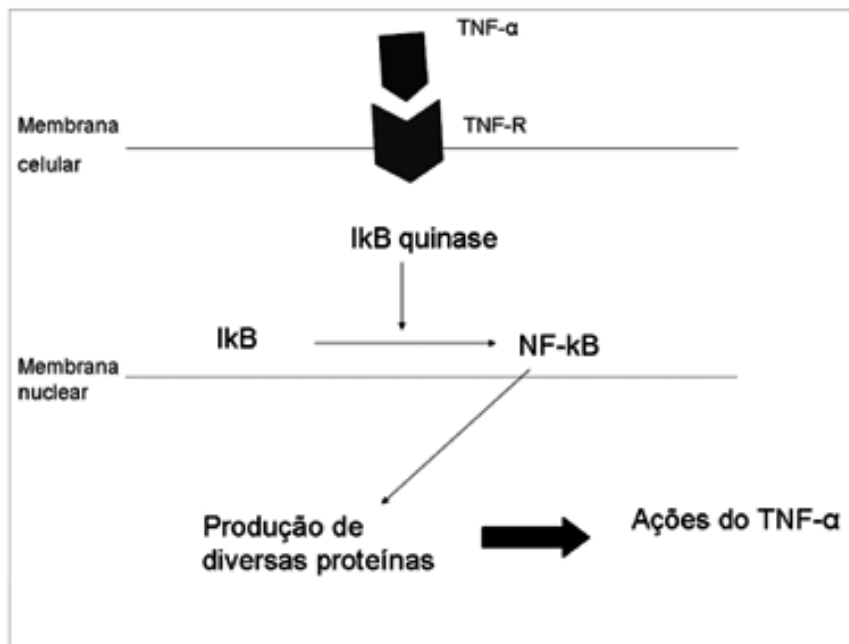
Figura 1. Representação do processo de inflamação e biomarcadores vasoativos.



Fonte: adaptado de Yadira et al, 2008.

Algumas dessas interações entre o endotélio e o meio resultam na produção de radicais superóxido, especialmente oxigênio, e estas moléculas são um indicador de lesão extracelular e intracelular. O oxigênio citoplasmático aumentado reage com o óxido nítrico transforma-se em peroxinitrito capaz de induzir a proteólise, e ubiquitinação da proteína I κ B (Glezer et al, 2000). A degradação dessa proteína resulta na ativação do fator de transcrição NF- κ B (do inglês, *factor nuclear kappa B*) iniciando a síntese e expressão de moléculas inflamatórias. As células endoteliais ativadas irão produzir dezenas de moléculas inflamatórias cujo efeito biológico irá refletir em um fenótipo de disfunção endotelial (Morales et al, 2010).

Figura 2. Representação de possíveis ações do TNF- α na célula. Após ligar-se ao receptor, o TNF- α estimula a ativação do NF- κ B que atuará na síntese e liberação de moléculas envolvidas no processo inflamatório e imune.



Fonte: adaptado de Vitale RF, Ribeiro FAQ, 2007.

Diante da demanda energética de uma disfunção endotelial, espécies derivadas da oxidação de glicose podem gerar uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) e diminuição nos níveis do antioxidante hidrossolúvel glutathione reduzida (GSH) intracelular (Cruz et al, 2011; Lapolla et al, 2005).

Velarde et al (2007) realizaram um estudo que relacionou os níveis de selectinas em diabéticos tipo 2 com a possível associação destas moléculas a outros fatores de risco cardiovascular. Eles mostraram que estes pacientes apresentavam níveis elevados de SE-S (formas solúveis de selectinas) e ET-1 (endolectina-1 que se trata de uma molécula vasoconstritora), assim como moléculas marcadoras de ativação do endotélio. Diabéticos com elevado índice de massa corporal apresentaram aumento significativo na SE-S e ET-1, o que melhorou a disfunção endotelial nestes. O grau de controle glicêmico foi associado a níveis elevados de ET-1, confirmando que a hiperglicemia crônica pode afetar a vasodilatação dependente do endotélio. Estes resultados sugerem que a identificação precoce de marcadores bioquímicos de disfunção

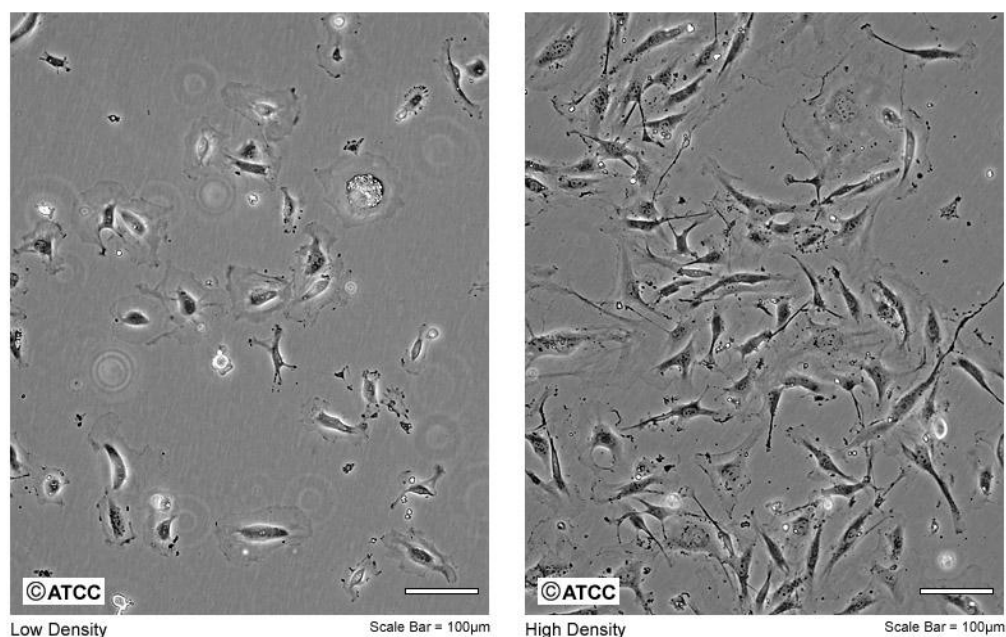
endotelial contribui para a prevenção de doenças cardiovasculares (Storino et al, 2014).

A angiogênese pode ser um alvo terapêutico para o tratamento de doenças cardiovasculares e cicatrização de feridas. Sabe-se que a biofotomodulação ativa a via ERK/Sp1 (proteína quinase, enzima que catalisa fosforilação/especificidade de sinal extracelular regulado 1) para promover a expressão de VEGF e proliferação das células endoteliais do vaso. Feng et al (2012) demonstraram que a biofotomodulação aumenta a atividade da via Sp1 nas células endoteliais dependente de ERK resultando na regulação positiva da expressão de VEGF. Além disso, a inibição dessas vias reduz a progressão e proliferação do ciclo celular na biofotomodulação. Estes resultados destacam a eficiência da biofotomodulação no processo terapêutico às doenças do sistema circulatório.

Na impossibilidade de estudar o tecido endotelial humano *in vivo* são utilizadas *in vitro* a linhagem de células endoteliais de cordão umbilical humana (HUVEC, do inglês *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Sendo células saudáveis, expressão naturalmente as moléculas já citadas e estas células são capazes de se diferenciar para formação de estruturas tubulares semelhantes a vasos sanguíneos mesmo em cultura celular se estiverem sob estímulo, sendo assim bem representativas a um organismo dinâmico (Sun et al, 2015).

Figura 3. Fotomicrografia de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) em cultura em baixa e alta densidade de células.

Fonte: adaptado do site comercial ATCC.



Hipóxia

Estudos realizados *in vitro* concluem que a situação de hipóxia celular nestes ambientes fechados reduz a diferenciação espontânea das células o que aumenta a igualdade de complexidade celular por homogeneidade genética (Forristal et al, 2010; Forsyth et al, 2006; Mathieu et al, 2011; Närvä et al, 2013). Esse dado é relevante à indústria da medicina regenerativa e terapias celulares, para as quais é necessária a padronização celular. Sendo assim, o mecanismo de hipóxia pode ser utilizado de forma benéfica modulando o fenótipo e genótipo celular. De tal forma, é fundamental o entendimento da condição de hipóxia celular podendo ser útil ao aumento de terapias do gênero (Agrawal et al, 2016) já sendo documentado o aumento de sobrevivência de células tronco

mesenquimais transplantadas se houver pré-condicionamento em situação de hipóxia (Muscari et al, 2013).

No organismo a hipóxia por ter origem na redução do aporte de oxigênio gerando asfixia no organismo, ou em menor escala, pode ser uma isquemia pontual que interrompe o fluxo sanguíneo de um microambiente. Durante esse estado de hipóxia, a pressão parcial de oxigênio está reduzida, abaixo do limiar aceitável, sendo assim o funcionamento dos órgãos, tecidos e metabolismo celular pode ser prejudicado. Em níveis normais de pressão parcial de oxigênio encontra-se de 150mmHg nas vias superiores a aproximadamente 5mmHg na retina, por exemplo, enquanto um valor menor que 40mmHg no sangue arterial representa hipóxia (Koh et al, 2008).

A formação de microambientes hipóxicos pode ocorrer em neoplasias, arteriosclerose, artrites e inclusive em reações inflamatórias em geral (Brown, 2002; Kaufman et al, 2004; Lewis et al, 1999). Contudo, a privação de oxigênio participa de uma via de sinalização de estímulo fisiológico para o crescimento tecidual natural dos mamíferos e também na embriogênese (Semenza, 2001;).

As células em hipóxia sofrem modificações que podem inviabilizar ou dificultar a recuperação tecidual e também tornar o tecido não funcional. Dependendo das condições e período de hipóxia esse tecido lesado não poderá recuperar a funcionalidade mesmo sendo aplicadas terapias de reconstrução (Burke et al, 2002; Griffiths et al, 2000). Sendo assim, a avaliação das adaptações celulares à hipóxia pode contribuir para melhorias de tratamentos que minimizem estes prejuízos.

Em neoplasias, a hipóxia pode acontecer de duas formas, pelo crescimento descontrolado de células que demandam aporte sanguíneo, gerando

uma massa celular sem vasos sanguíneos ao redor; ou a hipóxia pode ter início em um processo de oclusão de um vaso sanguíneo devido a células metastáticas utilizarem o sangue como meio de transporte para se estabelecerem em outro local, sendo assim a hipóxia é em parte responsável pelo mal prognóstico do paciente com câncer (Brown 2002; Feldmeier et al, 2003). Entretanto, a hipóxia também é nociva às células tumorais. Estudos demonstraram que a hipóxia induz morte celular por apoptose em linhagem de linfoma, células de adenocarcinoma e em fibroblastos transformados e sem mitocôndrias (Lewis et al, 1999). Também foi observado um grau de seleção e resistência celular à hipóxia para tal ambiente as células tumorais diminuem a morte por apoptose (Graeber et al, 1996).

O processo de hipóxia está envolvido na indução de várias citocinas produzidas pelas células tais como, por exemplo, a IL-6, o TNF- α e o VEGF (Crowther et al. 2001). O processo de hipóxia também é capaz de induzir a expressão de enzimas do metabolismo da glicose como tentativa de sobrevivência e manutenção das células na área de lesão tecidual aumentando a síntese de energia (Haroon et al, 2000). Todas essas alterações são decorrentes do ambiente hipóxico o qual as células estão presentes, como alterações adaptativas as células mudam o fenótipo e o genótipo (Koh et al, 2008).

Biofotomodulação

A biofotomodulação tem se mostrado uma alternativa terapêutica eficiente a modular vários processos biológicos dependendo de determinados critérios característicos a luz do laser e condições do tecido irradiado, sendo capaz

de efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e estimulador da cicatrização por proliferação celular (Lopes-Martins et al, 2006; Albertini et al, 2007; Aimbire et al, 2008; Bortone et al, 2007; Mafra de Lima et al, 2009; Xavier et al, 2010; Silva et al, 2011; Pires et al, 2011; Huang et al, 2010; Mesquita-Ferrari et al, 2011; Peplow et al, 2011).

Conceitos do laser e biofotomodulação

A palavra LASER é uma sigla do inglês “Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation”, que em português foi traduzido para “luz amplificada pela emissão de radiação estimulada”. Tal emissão de luz é de origem artificial e produzida pela excitação de elétrons presentes em inatividade numa determinada fonte de energia. Suas principais características (Mesquita-Ferrari et al, 2011) são:

- Radiação eletromagnética não ionizante;
- Fluxo luminoso de alta intensidade de energia;
- Luz monocromática, ou seja, um único comprimento de onda, dentro de uma pequena faixa do espectro de luz cujos efeitos às células que recebem tal emissão sejam de grande importância, se não essenciais, aos processos celulares e ativação de determinadas vias do metabolismo;
- Focalização: direcionalidade dos feixes de luz que, sendo assim, conduzam grande quantidade de energia para um ponto específico como alvo da radiação;
- Coerência: sincronicidade das ondas de luz no espaço e tempo.

De tal maneira, devido as suas características, os lasers de baixa intensidade também podem ser chamados de bioestimulantes ou fotobiomoduladores, pois com seu estímulo, as células que o recebem são capazes de aumentar sua resposta fisiológica. Contudo, essa resposta positiva aos mecanismos celulares é totalmente dependente da dosagem utilizada, podendo então ser nociva em altas quantidades com um efeito inibitório dessas atividades (Mesquita-Ferrari et al, 2011). Os lasers ainda podem ser térmicos ou não térmicos quando a sua emissão de calor, de irradiação contínua ou pulsada, e sendo os de baixa potência terapêuticos e alta potência de caráter cirúrgico (Pereira et al, 2012).

Ação do laser

No tecido biológico, parte da luz laser é espalhada e outra parte é absorvida agindo sobre a membrana das mitocôndrias, assim, estimulando a biomodulação.

Já em cirurgias, o laser não é terapêutico. Sendo assim, usado em alta potência com ação térmica com a finalidade de corte, coagulação, vaporização, evitando sangramentos de forma precisa ao mesmo tempo em que se mantém seguro e livre de contaminação (Pereira et al, 2012; Anwer et al, 2012).

A biofotomodulação é absorvida por cromóforos no tecido irradiado. Tal luz é convertida em energia para as células por meio de enzimas no processo de cadeia respiratória no interior das mitocôndrias. Essa cadeia respiratória se trata da cadeia de transporte de elétrons, na qual participam quatro complexos enzimáticos e citocromos. Estes últimos têm a como principal função nessa cadeia a conversão de ADP (adenosina difosfato) em ATP (adenosina trifosfato),

molécula energética vital ao nosso metabolismo celular como síntese proteica, replicação, tradução e manutenção do potencial da membrana celular, sendo assim a luz do laser convertida em energia às células. Toda essa energia transformada produz efeitos ditos como primários e secundários, ou diretos e indiretos, respectivamente (Kim et al, 2012, Wagner & Ho, 2007; Tuby et al, 2009).

Efeitos primários ou diretos do laser

Primeiramente, a energia produzida, é capaz de agir sobre substâncias mediadoras do processo inflamatório na sua liberação, tais como, a histamina, bradicinina e serotonina, também atua na excitação e inibição de reações enzimáticas, e nas mitocôndrias celulares aumentando a síntese de ATP. Esse aumento acelera a divisão celular e por consequência o consumo de oxigênio. Em tecidos inflamados se desenvolve, naturalmente, um processo de anaerobiose, aumento do pH por aumento da concentração de íons H^+ e por conseguinte a acidose local. De tal maneira que a respiração celular reduz esse processo de anaeróbio de privação de oxigênio e corrobora a recuperação deste tecido, também induz a liberação de fatores de crescimento através de macrófagos e aumento da proliferação juntamente a degranulação de mastócitos, o que auxilia numa melhor resposta imunológica às infecções (Karu, 1989).

Efeitos secundários ou indiretos do laser

Estes são consequências dos primários e colaboram com a elevação do fluxo sanguíneo e da drenagem linfática atuando até mesma em

microcirculação. O aumento da circulação sanguínea na região tem efeito anti-inflamatório, por aumentar a oferta de nutrientes e oxigênio, células sanguíneas de defesa e aumentar a eliminação de catabólitos nocivos ao tecido (Kim et al, 2012).

Para que o efeito do laser ocorra é muito importante se atentar a seu comprimento de onda, pois quanto maior esse comprimento, menor será a quantidade de energia que se espalha, sendo esse espalhamento uma dispersão de energia, o efeito biológico seria reduzido comparado a um comprimento menor (Mesquita-Ferrari et al, 2011).

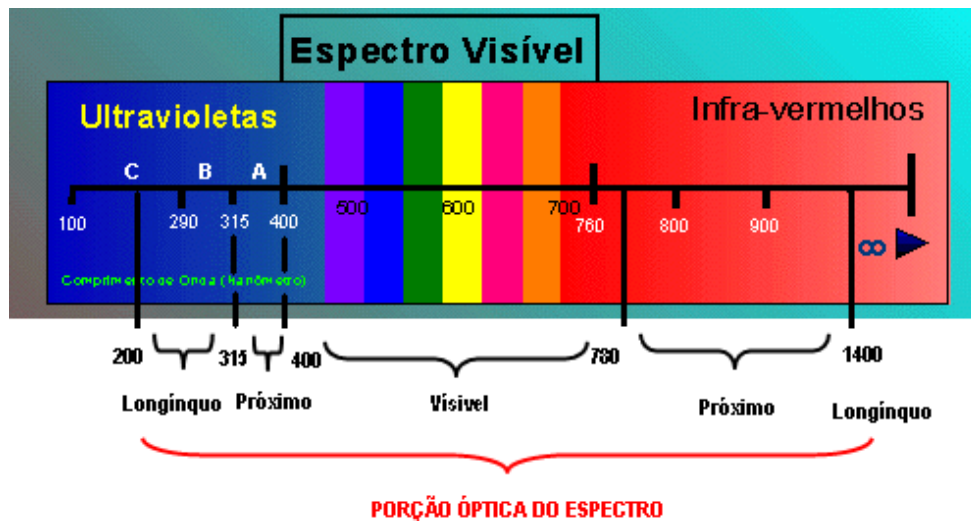
Sendo assim, é possível afirmar que a escolha do comprimento de onda é de suma importância à determinação da penetrabilidade do laser no tecido irradiado (Hou et al, 2008), e cada tecido, devido as suas especificidades, possuem graus diferentes de absorção para cada comprimento de onda (Kim et al, 2012). Sabe-se que os lasers de espectro de luz vermelha trabalham melhor os processos de cicatrização dos tecidos e os dentro de um espectro de luz chegando ao infravermelho são capazes de atuar de forma analgésica (Kim et al, 2012).

A porção utilizada para biofotomodulação, apresentada na figura 1 como “porção óptica do espectro”, a qual promove bioestimulação dos tecidos irradiados, está na faixa de 200nm até 1400nm, o que inclui, portanto, as seguintes porções:

- ultravioleta (UV) 200nm – 400nm;
- visível 400nm – 780nm;
- infravermelho (IR) 780nm – 1400nm.

A ação dos lasers acontece no intervalo de comprimento de onda de 600 a 900nm (Wagner & Ho AD, 2007; Tuby et al, 2009). Ainda sim, dentro dos trechos ultravioleta e infravermelho existem subdivisões de próximo e longínquo apresentadas na figura abaixo;

Figura 4. Representação do espectro visível e respectivos comprimentos de ondas.



Fonte: adaptado de <http://www.anf.net.br>

Com a finalidade terapêutica, além da escolha do tipo de irradiação, pulsada ou contínua e comprimento de onda, deve-se notar outros parâmetros importantes a fim de obter sucesso no tratamento, tais como:

- Potência (mW), que é a quantidade de energia (em watt – W) por unidade de tempo (t) e sua quantidade de fótons emitidos;
- Densidade de potência (DP) ou irradiância, que é a potência óptica do laser por área irradiada dada em W/cm²;
- Densidade de energia (DE) ou fluência, sendo a densidade de potência pelo tempo de exposição (em segundos), ou seja, trata-se da quantidade de energia em uma superfície específica (J/cm²). Sendo essa uma escolha determinante à efetividade do tratamento, pois, se ela for menor que 0,1 J/cm² não

se obtém resultados, porém, doses muito altas podem promover resultados negativos, não estimuladores e até mesmo inibitórios (Wagner & Ho, 2007 e Tuby et al, 2009).

Assim, o presente trabalho foi delineado com o objetivo de analisar se o pré-tratamento com biofotomodulação (pré-condicionamento) de células endoteliais pode resultar em uma linhagem com maiores predicados em relação às células sem estímulos em uma possível terapia celular após o infarto do miocárdio. Para tal, foram realizadas análises referentes à viabilidade, estresse oxidativo e morte celular de células HUVEC após a irradiação laser e hipóxia experimental.

OBJETIVO

Analisar os efeitos da biofotomodulação às células endoteliais submetidas à hipóxia experimental.

Objetivos específicos

- Analisar a expressão de Anexina V (marcador de apoptose) e Iodeto de Propídio (marcador de necrose) por citometria de fluxo em células endoteliais pré-tratadas com biofotomodulação;
- Analisar a produção de ROS em células endoteliais submetidas à hipóxia pré-tratadas com biofotomodulação;
- Analisar a expressão de CD11b (marcador de molécula de adesão de leucócitos) nas células HUVEC submetidas à hipóxia pré-tratadas com biofotomodulação;
- Analisar a expressão gênica e proteica de VEGF após biofotomodulação e hipóxia experimental.

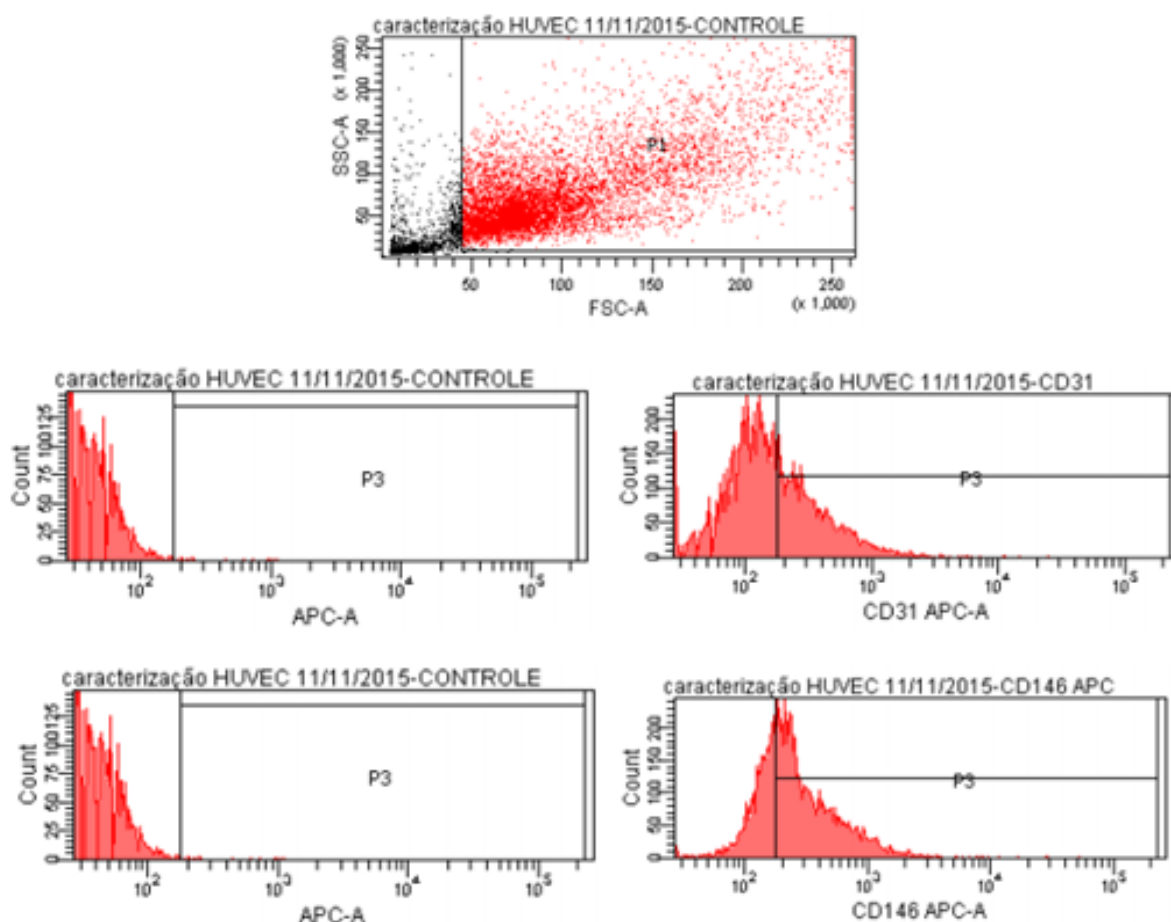
MATERIAL E MÉTODOS

Cultura celular

Foram utilizadas células imortalizadas da linhagem endotelial de cordão umbilical humano (HUVEC, do inglês *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni. As células foram

caracterizadas pela expressão de CD31 APC e CD146 APC pelo método de citometria de fluxo.

Figura 5. Caracterização das células HUVEC por citometria de fluxo com marcadores específicos de células endoteliais.



Todo o cultivo celular foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular do Mestrado em Medicina Universidade Nove de Julho (UNINOVE). As células foram descongeladas em água aquecida a 37° C sob agitação por 2 minutos, o conteúdo celular foi transferido para um tubo cônico contendo 9 mL de meio de cultura (RPMI Medium 1640, Vitrocell pH 7.4) 10 mmol/L de HEPES (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, NY, USA), 2 mmol/L de L-Glutamine (Merck, Darmstadt, Germany), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, BRL, Life Technologies, USA), 10 % de soro fetal bovino (Vitrocell) e centrifugadas 125 g por 5 minutos. Após a centrifugação, foi

desprezado o sobrenadante e as células sedimentadas foram ressuspensas em 12 mL de meio de cultura, e mantidas a 37° C com 5 % de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até que a concentração de células atingisse confluência. Após proliferação as células foram tratadas com 5 mL de tripsina (0,5%) por 5 minutos e após o desprendimento celular foi acrescentado 5 mL de meio de cultura suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB). O conteúdo celular foi transferido para um tubo graduado para 50 mL e centrifugado a 125 g por 5 minutos, em seguida foi realizado teste de viabilidade celular utilizando o corante Azul de Tripán e feita a contagem das células. As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² e, para os experimentos de hipóxia, foram soltas da garrafa e transferidas para garrafas de 25 cm².

Figura 6. Fotomicrografia de células HUVEC em cultura em confluência. Aumento de 10x.



Indução de hipóxia

A indução de hipóxia foi realizada artificialmente com a utilização de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Para tal, as células HUVEC, mantidas em cultura, foram soltas de uma garrafa matriz e semeadas em garrafas de 25 cm² na quantidade 1x10⁶ células cada uma nos seguintes grupos:

CONTROLE (C): células cultivadas em meio RPMI com 10 % de SFB, sem estímulo.

LASER (L): células cultivadas em meio RPMI com 10 % de SFB submetidas ao pré-tratamento com laser.

HIPÓXIA (H): células cultivadas em meio RPMI com 10 % de SFB submetidas ao procedimento de hipóxia por anaerobiose.

LASER-HIPÓXIA (LH): células cultivadas em meio RPMI com 10 % de SFB submetidas ao pré-tratamento com laser e ao procedimento de hipóxia por anaerobiose.

Figura 7. Fotografia de garrafas de cultivo de células HUVEC mostradas nos quatro grupos experimentais.



Após um período de 24 horas para aderência das células, ao atingirem confluência de aproximadamente 80% e o grupo específico passar pelo pré-tratamento com laser, os grupos H e LH foram colocadas em sacos plásticos de fecho com o saquete capturador de oxigênio AnaeroGen. Dentro desse sistema, as garrafas permaneceram com as tampas semiabertas por 24 horas, período este designado adequado para efetividade da hipóxia sem grande perda celular (Cesário et al, 2016).

Com o término das 24 horas, as células foram desaderidas (tripsina 0,5% durante 5 minutos a 37°C). Após a contagem de células na câmera de Neubauer com corante vital azul de Trypan (0,4%), parte das células e seu sobrenadante foram congelados a -80°C, enquanto a outra parte das células foi usada para os ensaios de citometria de fluxo. O cultivo de células foi mantido até o encerramento dos experimentos.

Figura 8. Fotografia de garrafas de células HUVEC em cultura (grupos HIPÓXIA e LASER HIPÓXIA) em anaerobiose com kit AnaeroGen Compact.



Irradiação laser

O equipamento de laser usado na irradiação das células foi o aparelho Twin FLEX-LASER, MMOptics Ltd (São Carlos, SP, Brasil). Foi realizada única aplicação nos respectivos grupos, L e HL, após centrifugação em meio de cultura RPMI mais SFB a 125 x g por 5 minutos. Os parâmetros utilizados para a irradiação foram os mesmos utilizados por de Oliveira et al., 2015:

Comprimento de onda: 660nm

Potência: 10 mW

Densidade de energia: 1,5 J/cm²

Tempo de aplicação: 6 segundos

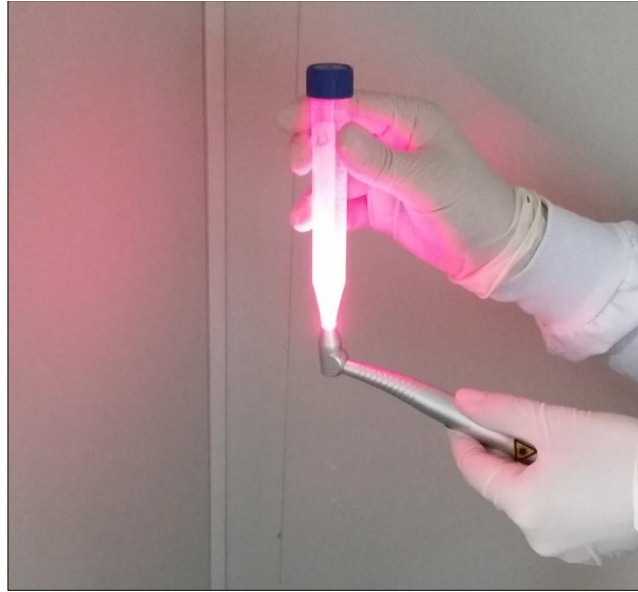
Área irradiada: 0,04 cm²

Figura 9. Fotografia do aparelho Twin FLEX-LASER (MMOptics Ltda, São Carlos, SP, Brasil) utilizado neste estudo.



As células HUVECS tripsinizadas foram centrifugadas no próprio meio de cultura em tubos plásticos de acondicionamento. A caneta do laser foi posicionada na extremidade preeminente do tubo onde se concentraram as células, e assim, iniciada a irradiação. Os grupos C e H não receberam a irradiação do laser.

Figura 10. Representação da irradiação laser nas células HUVEC precipitadas por centrifugação no fundo do tubo cônico de polipropileno.



Citometria de fluxo para detecção de CD11B, Anexina V e Iodeto de Propídio

Após o período de incubação de 24 horas de hipóxia para os grupos H e LH, enquanto os grupos C e L permaneceram na estufa de cultura, todas as células foram soltas separadamente com 4 mL de tripsina a 0,5 % por 5 minutos a 37°C. Os grupos foram distribuídos em tubos e centrifugados a 125 g por 10 minutos. Todos os grupos foram contados separadamente com auxílio da câmara de Neubauer usando corante azul de Trypan (0,4%). Após a contagem, foram calculadas 5×10^5 células para cada um dos grupos e acomodadas em tubos 12x75 mm. Na sequência foram centrifugados a 500 g por 10 minutos tendo sido descartado seus sobrenadantes ao final. Acrescentou-se 100 µL de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*, BD Pharmingen, Cat 349202) com a finalidade de lavagem e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Posteriormente, foram acrescentados 100 µL de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*, BD Pharmingen, Cat 349202). A

seguir, foram adicionados os anticorpos CD11b (detecção de moléculas para adesão de leucócitos), Anexina V (marcador de apoptose) e Iodeto de Propídio (PI, marcador de necrose), todos os tubos foram incubados por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 500 g por 10 minutos, e seus sobrenadantes foram descartados. Adicionou-se 200 µL de solução de PBS 1% AZIDA e a detecção da expressão destes receptores foram realizadas no citômetro de fluxo (Accuri C6, BD) imediatamente com o término do procedimento de marcação.

Quadro 1: Descrição dos anticorpos utilizados para análises de citometria de fluxo.

| PAINEL | GRUPO | MARCA-DOR | QUANTI-DADE | FLUORO-CROMO | FIL-TRO | FABRI-CANTE |
|---------------------|-------|--------------------------|-----------------------|-----------------|-------------------|---------------------------|
| NÃO MAR-CADO | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| TUBO 1 | C | CD11b Anexina V PI | 20 µL 5 µL 5 µL | PE FITC - | FL2 FL1 FL3 | Santa Cruz/ Invitrogen |
| TUBO 2 | L | CD11b Anexina V PI | 20 µL 5 µL 5 µL | PE FITC - | FL2 FL1 FL3 | Santa Cruz/ Invitrogen |
| TUBO 3 | H | CD11b Anexina V PI | 20 µL 5 µL 5 µL | PE FITC - | FL2 FL1 FL3 | Santa Cruz/ Invitrogen |
| TUBO 4 | LH | CD11b Anexina V PI | 20 µL 5 µL 5 µL | PE FITC - | FL2 FL1 FL3 | Santa Cruz/ Invitrogen |

O equipamento de citometria escolhido possibilitou a inclusão de todos os anticorpos no mesmo microambiente, pois cada marcador possui sua leitura realizada em um filtro diferente. Assim, inviabiliza a sobreposição de marcações, o que originaria resultados dúbios e, confere um microambiente mais próximo de um organismo dinâmico, para o qual, as células que expressam vários antígenos simultaneamente podem ser identificadas e submetidas a essa análise diferenciada.

Citometria de fluxo para detecção de produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Foram transferidas 3×10^5 células para um tubo de 12x75 mm. Os tubos foram centrifugados a 500 g por 10 min a 4°C e descartado o sobrenadante. Acrescentou-se 900 µL de PBS. A seguir, foram adicionados 100 µL de solução contendo reagente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) na concentração de 0,3 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA). As amostras foram incubadas por 30 minutos em água aquecida a 37°C ao abrigo da luz. Em seguida os tubos foram centrifugados e o sobrenadante desprezado. Adicionou-se 500 µL de PBS (Sigma, Cat P3744-1PAK). A detecção da produção de ROS foi realizada no citômetro de fluxo imediatamente após a marcação.

Quadro 2: Descrição do ensaio para avaliação de ROS.

| PAINEL | GRUPO | PBS | DCFH-DA (0,3 mM) | FABRICANTE | CATÁ- LOGO |
|------------------------------|-------|---------|---------------------|------------------------------|---------------|
| NÃO MAR- CADO | --- | 1000 µL | --- | --- | --- |
| TUBO 5 | C | 900 µL | 100 µL | Sigma, St. Louis, MO, USA | D6883 |
| TUBO 6 | L | 900 µL | 100 µL | Sigma, St. Louis, MO, USA | D6883 |
| TUBO 7 | H | 900 µL | 100 µL | Sigma, St. Louis, MO, USA | D6883 |
| TUBO 8 | LH | 900 µL | 100 µL | Sigma, St. Louis, MO, USA | D6883 |

Análise da expressão gênica

As células dos grupos experimentais, após desadesão, foram coletadas e centrifugadas e os precipitados foram misturados em Trizol[®] Reagent para extração do RNA total conforme instruções do fabricante. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados ao homogenato, e a mistura foi agitada vigorosamente por 15 seg. Em seguida, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5min. As amostras foram centrifugadas por 15min, 12000g a 4°C. A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5ml estéril, e foram adicionados 500 µl de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10min, e foram novamente centrifugadas (12000g/4°C/10 min). Os sobrenadantes foram retirados, e os *pellets* de RNA foram lavados com 1ml de etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato, DEPC, 0,01%). As amostras foram novamente centrifugadas (12000g/4°C/10 min), e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* secaram ao ar livre, sendo então ressuspensos com 50 µl de água DEPC, e armazenado a -80 ° C até a realização da Transcrição Reversa.

Tratamento do RNA total e Integridade das amostras

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho NanoDrop ND-2000 espectrofotômetro (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) sendo que 1U A260 corresponde a 40µg de RNA/mL. Foram utilizadas

apenas amostras livre de contaminantes ($A_{260}/A_{230} \sim 1,8$) e de proteínas ($A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$). A integridade do RNA total foi avaliada pela observação da proporção das bandas referentes aos rRNA 18S e 28S em eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Life technologies). Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1 μ g de RNA total (8 μ l) foi incubado com 1 unidade (1 μ l) de *DNase I/RNase Free* – (Invitrogen, EUA), na presença 1 μ l de solução contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 2 mM MgCl₂ por 15 min a 37 °C, seguido de incubação a 65°C durante 10 minutos para inativação da DNase I.

Síntese de cDNA - Transcrição Reversa

Logo após o tratamento acima descrito, foi realizada a reação de transcrição reversa (RTqPCR), para síntese do cDNA. Em 1 μ g de RNA total tratado foram adicionados 2 μ l de tampão de incubação (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,4, 20 mM e MgCl₂ 2,5 mM), 1 unidade de transcriptase reversa (1 μ l) (Invitrogen), 2 μ l de Random Primer (Invitrogen) 0,8 μ l de oligonucleotídeos (dNTPs, 100 mM) e 4,2 μ l de H₂O ultra pura para uma reação final de 20 μ l. As amostras foram então submetidas às seguintes incubações: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min. Após a reação, as amostras de cDNA foram mantidas a -20°C para futura realização da PCR em tempo Real.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR

A reação de polimerização em cadeia em tempo real (Real-Time PCR) combina a amplificação do PCR com detecção fluorescente automatizada,

realizada como auxílio do aparelho de detecção da sequência. A amplificação e aquisição dos dados foram realizadas com o corante SYBR Green em equipamento Abi Prism 7500 Fast (Applied Biosystems) como descrito previamente (Santana et al. 2016). Neste processo de excitação, a captação de fluorescência das fitas duplas é realizada em cada ciclo de amplificação do PCR, fornecendo uma quantificação em tempo real das sequências do gene de interesse. O protocolo utilizado para a reação de PCR em tempo real foi o seguinte: em 1,0 µl de cDNA, foram adicionados 5 µl de Solução Fast Master Mix 2X (Applied Biosystems, EUA) e água suficiente para 10 µl de reação em cada poço da placa com 96 poços. As amostras aplicadas em duplicata e então incubadas a 95°C por 20s, e passaram por 40 ciclos térmicos a 95°C por 3s, 60°C por 30s. Os iniciadores (primers) utilizados para a reação de PCR foram: VEGF (5'-GCTCTACTT-CCCCAAATCACTG-3'/ 5'-CTCTGACCCCGTCTCTCTCTT-3') e β -actina (5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3'/ 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3').

O resultado, expresso em valor de CT, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção. A expressão de VEGF foi normalizada pelo nível de expressão do gene *housekeeping* β -actina, cuja expressão mostra-se inalterada nas condições experimentais. O “software” SDS 1.4 *Software for the 7500 Fast System* (Applied Biosystems) foi utilizado para o processamento dos dados.

Os valores de ΔC_t das amostras foram determinados pela subtração do valor de C_t médio do mRNA do gene VEGF a partir do valor médio de C_t do gene *housekeeping* β -actina. O parâmetro $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizado para expressar os dados de expressão relativos.

Análise da expressão proteica

A quantidade de VEGF em sobrenadantes de culturas de células HUVEC foi determinada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Resumidamente, o sobrenadante foi sujeito à precipitação de proteína com acetona. As proteínas foram secas e ressuspensas em tampão RIPA modificado e 100 µg foram usados para revestir uma placa de poliestireno de microtitulação (NUNC, Dinamarca). A análise de cada amostra foi realizada em triplicada. O VEGF recombinante (200 ng) foi utilizado como controlo positivo. O anticorpo anti-VEGF monoclonal humano (Santa Cruz Biotechnology, EUA) foi usado como anticorpo primário. Após 20 min da adição de solução de substrato (BM azul POD, Roche, Alemanha), a absorbância dos poços da placa foi analisada para determinar a presença e a quantidade de VEGF, utilizando espectrofotômetro a um comprimento de onda de 405 nm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para todas as variáveis resultando em dados paramétricos para todos os grupos. Os resultados foram expressos em valores relativos para melhor compreensão. Para testar as diferenças entre os grupos estudados, foi utilizado o Teste ANOVA *One-Way* com *Post-Hoc* de Bonferroni. Foi estabelecido o valor de $p < 0,05$ para significância estatística. As análises foram realizadas utilizando o software SPSS (Statistical Package Social Sciences) versão 18.0 para Windows.

RESULTADOS

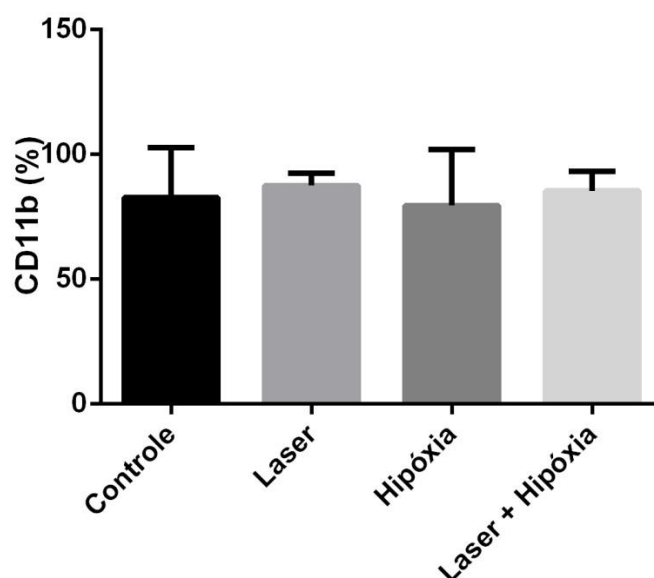
Não foi possível observar modulação significativa da ação do laser sobre as células HUVEC com relação a apoptose, a expressão de CD11b, dupla marcação à apoptose e CD11b ou ausência de ambas na mesma célula (Tabela 1, Figura 11, Figura 12 e Figura 13).

Tabela 1. Valores relativos a apoptose, CD11b e dupla marcação de CD11b e apoptose. (n=13)

| | CONTROLE | LASER | HIPÓXIA | LASER HIPÓXIA |
|--------------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| Apoptose (%) | 0,00 ±0,0 | 0,00 ±0,0 | 0,00 ±0,0 | 0,00 ±0,0 |

| | | | | |
|---------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| CD11b (%) | 82,83 ± 19,9 | 87,55 ± 4,8 | 79,5 ± 22,4 | 85,45 ± 7,8 |
| CD11b+Apoptose (%) | 0,75 ± 1,4 | 0,83 ± 2,0 | 1,25 ± 1,8 | 1,0 ± 1,0 |

Figura 11. Expressão de CD11b das células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia. (n=13)



Quanto aos processos de necrose, apoptose e apoptose tardia não foi possível observar modulação significativa do laser. Porém, houve significância estatística do grupo Hipóxia comparado ao grupo Controle, onde o processo de hipóxia significativamente reduziu a viabilidade celular (Tabela 2, Figura 14, Figura15 e Figura16).

Tabela 2. Valores relativos a apoptose, necrose, apoptose tardia e viabilidade. (n=13)

| | CONTROLE | LASER | HIPÓXIA | LASER HIPÓXIA |
|----------------------------|-----------------|--------------|----------------|----------------------|
| Apoptose (%) | 0,00 ± 0,0 | 0,00 ± 0,0 | 0,08 ± 0,2 | 0,15 ± 0,5 |
| Necrose (%) | 22,36 ± 9,6 | 23,17 ± 10,8 | 30,75 ± 13,3 | 28,67 ± 12,2 |
| Apoptose Tardia (%) | 0,25 ± 0,6 | 0,42 ± 0,9 | 0,25 ± 0,4 | 0,42 ± 0,9 |
| Viabilidade (%) | 83,4 ± 8,6 | 79,83 ± 7,7 | 68,62 ± 16,2 | 77,7 ± 8,4* |

*p<0,01 vs. todos os grupos.

Figura 12. Expressão de marcador de necrose nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia. (n=13)

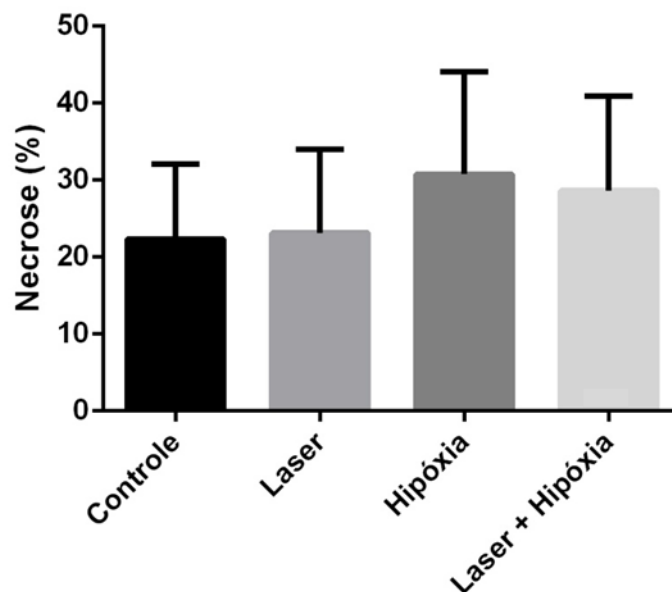


Figura 13. Dupla marcação de apoptose e necrose caracterizando apoptose tardia das células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia. (n=13)

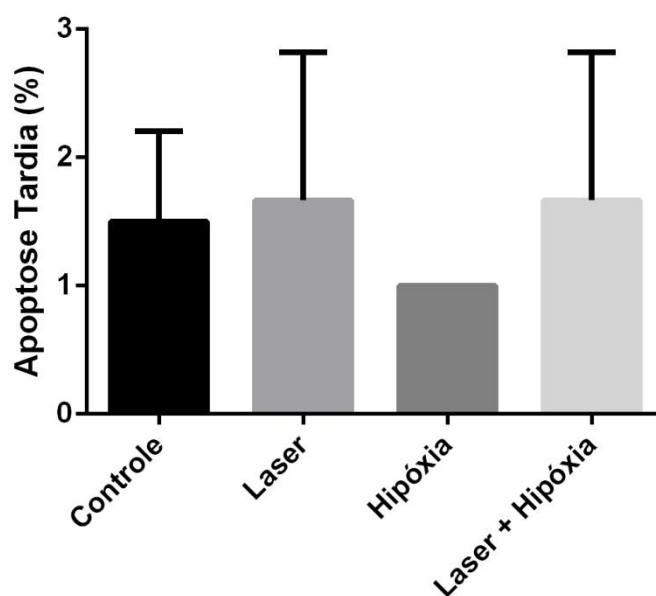
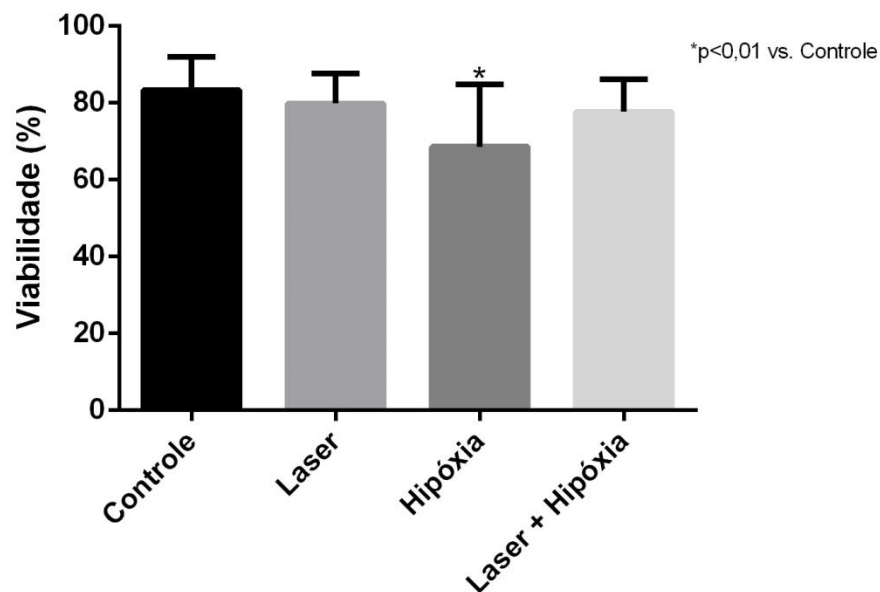


Figura 14. Viabilidade das células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia. (n=13)



Não foi possível observar diferença estatística quanto à correlação de CD11b e necrose celular, tanto a expressão isoladamente quanto em conjunto e ausência de ambas as marcações. Os valores de ROS também não apresentaram significância estatística entre os grupos. (Tabela 3, Figura 17, Figura 18, Figura 19 e Figura 20).

Tabela 3. Valores relativos à expressão de CD11b, necrose e dupla marcação de CD11b e necrose (n=13) e ROS (n=5).

| | CONTROLE | LASER | HIPÓXIA | LASER HIPÓXIA |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| CD11b (%) | 70,0 ±15,1 | 65,55 ±16,1 | 54,36 ±16,8 | 53,83 ±22,2 |
| Necrose (%) | 1,17 ±0,9 | 0,92 ±0,9 | 1,46 ±0,9 | 1,92 ±1,7 |
| CD11b+Necrose (%) | 28,36 ±18,5 | 27,33 ±14,8 | 34,83 ±15,4 | 31,0 ±15,5 |
| ROS (MIF) | 3742 ±1386 | 3441 ±1112 | 3901 ±1797 | 3930 ±1635 |

Figura 15. Expressão de CD11b nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a necrose. (n=13)

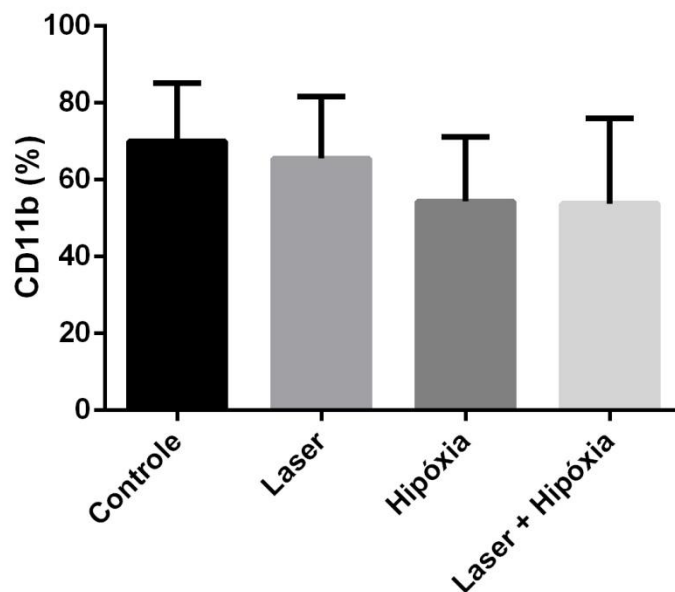


Figura 16. Expressão de marcação referente a necrose nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=13)

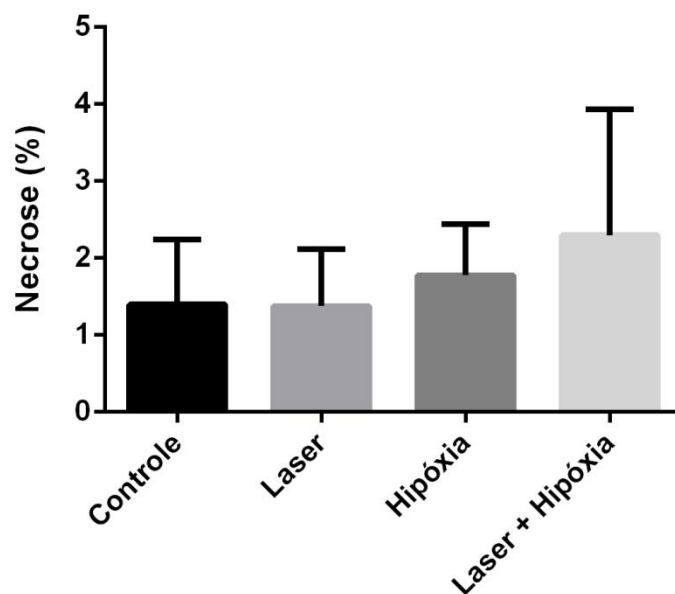


Figura 17. Ausência de marcação para CD11b e necrose nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=13)

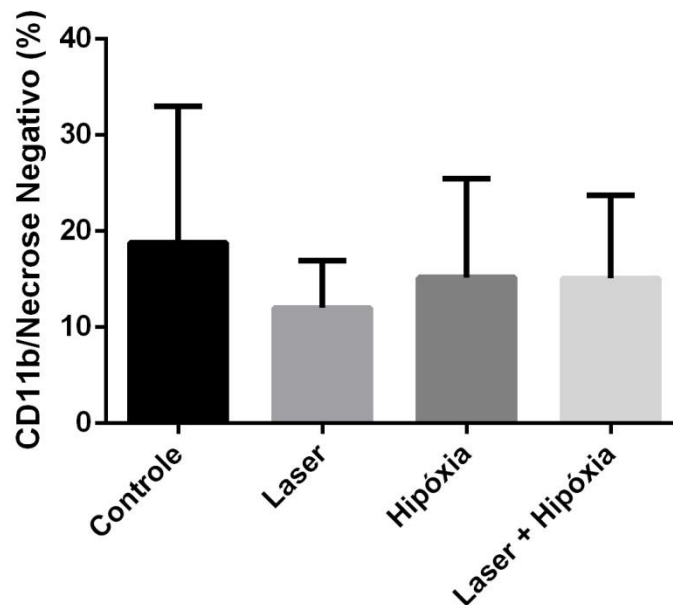
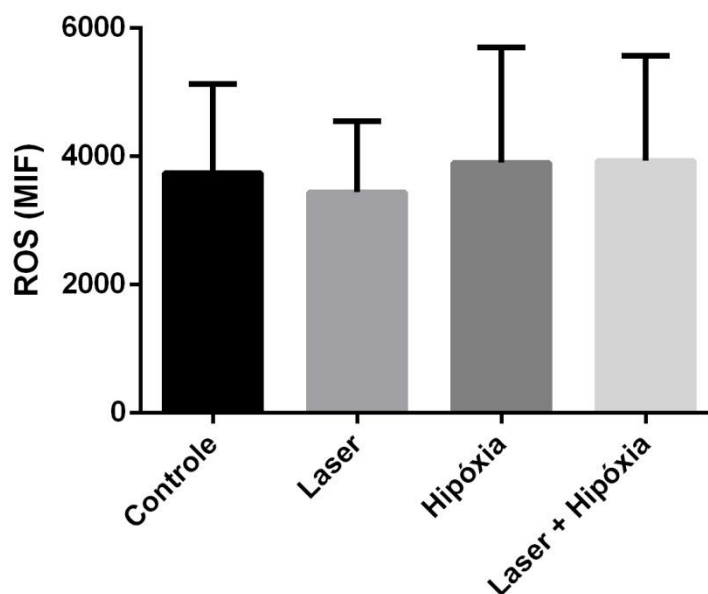


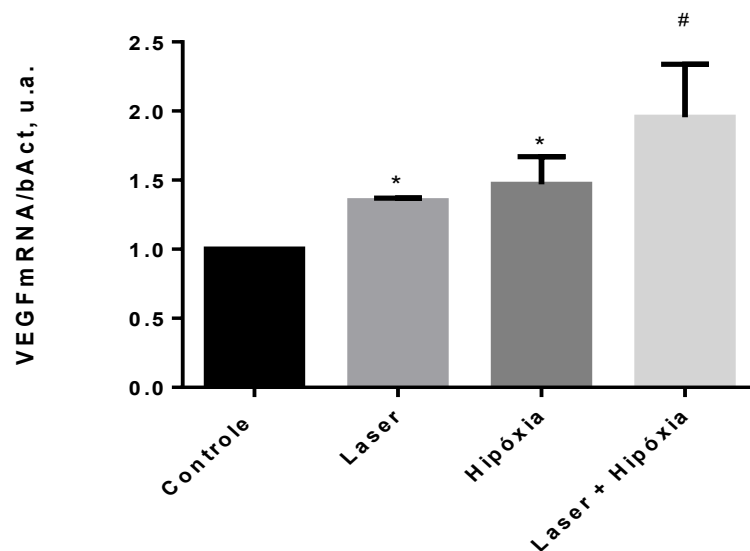
Figura 18. Análise de ROS nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=5)



A expressão de RNAm de VEGF foi determinada por PCR em tempo real. A biofotomodulação aumentou significativamente a expressão de VEGF após 24 horas da irradiação. No grupo em hipóxia, os níveis de RNAm de VEGF permaneceram aumentados em relação ao controle, entretanto, sem diferença significativa entre o grupo

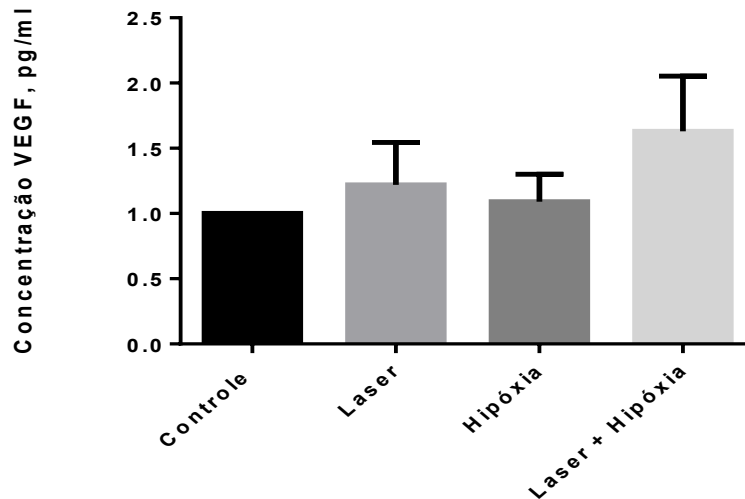
apenas irradiado. Os níveis de VEGF após fotobioestimulação e hipóxia apresentaram maiores em relação a todos os grupos experimentais.

Figura 19. Expressão de RNAm de VEGF nas células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=3) *0,01 em relação ao Controle; #0,05 em relação ao Controle, Laser e Hipóxia.



A análise de expressão proteica nos sobrenadantes dos grupos experimentais não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

Figura 20. Concentração de VEGF no sobrenadante de células HUVEC dos grupos Controle, Laser, Hipóxia e Laser + Hipóxia na correlação a expressão de CD11b. (n=3)



DISCUSSÃO

Células de origem mesenquimal podem ser usadas no tratamento de doenças isquêmicas quando não há a possibilidade de outros tipos de revascularização. Entretanto, a técnica tem baixa eficácia devido aos baixos índices de sobrevivência das células transplantadas. Uma das estratégias para aumentar a viabilidade celular é realizar um pré-condicionamento destas células em choque térmico, estresse oxidativo ou hipóxia (Sart et al, 2014). Este pré-condicionamento hipóxico é capaz de proteger cardiomiócitos e células endoteliais dos danos causados pela hipóxia (Bellis et al, 2009). Espécies reativas de oxigênio como superóxido e o peróxido de hidrogênio induzem a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais ativadas. Esse processo é comum na aterogênese onde há inflamação crônica iniciada pela ativação das células endoteliais (Nakahara et al, 2016).

Bader et al (2015) desenvolveram um protocolo de hipóxia capaz de aumentar a tolerância isquêmica e melhorar o perfil angiogênico de células mesenquimais do cordão umbilical humano *in vitro*. Diferentemente do presente estudo,

Bader usou uma incubadora de gás controlado mantendo as concentrações de O_2 e CO_2 em 1% e 5%, respectivamente. A técnica de anaerobiose utilizada no presente estudo foi um saquete de captura de O_2 em um saco plástico selado. O fabricante do produto garante a absorção do O_2 com a geração simultânea de CO_2 , em estudos anteriores observamos a efetividade do método de hipóxia em linhagem humana de câncer de bexiga (Cesário et al, 2016). O saquete reduz o nível de O_2 para menos de 1% em 30 minutos e o nível de CO_2 resultante será entre 9% e 13%. As células de Bader foram mantidas em meio de cultura sem glicose e sem SFB, entretanto, corroborando trabalho de Cesário et al (2016), observamos que para a linhagem celular HUVEC é inviável a ausência de SFB, pois a viabilidade celular é insuficiente para a continuidade dos experimentos.

Segundo Mavroeidis et al (2015), o processo de hipóxia grave com 0,1% de O_2 confere resistência à ação antiproliferativa de tratamentos antiangiogênicos em células HUVEC por modulação do ciclo celular, estacionando-o em G1, e modulação de apoptose intrínseca via Akt. Portanto, células de potencial angiogênico não respondem a um tratamento antiproliferativo quando submetidas à hipóxia grave. É possível que para o presente estudo os níveis de O_2 estivessem entre 0,9% e 0,1%, semelhante ao estudo de Mavroeidis et al (2015). Este dado corrobora com o resultado não significativo da ação do pré-tratamento com laser à hipóxia, no qual as células não apresentaram melhora de viabilidade quando comparadas ao grupo hipóxia. Porém, o processo de apoptose intrínseca exige a participação da mitocôndria, esta organela também é essencial à ação do laser. A mitocôndria tendo sofrido alteração no seu metabolismo pela hipóxia pode ter ocasionado o resultado não significativo do laser. Entretanto,

não observamos eficiência do pré-tratamento do grupo que não passou por hipóxia.

Em um ensaio *in vivo*, Cury et al (2013) observaram aumento da angiogênese, da expressão de HIF-1 α , de VEGF e diminuição na atividade de um marcador de remodelação de tecido (metaloproteinase de matriz do tipo 2, MMP-2), todos estes foram dependentes dos comprimentos de onda do laser utilizado, 660 nm e 780 nm em 30 e 40 J/cm². Na literatura, dois trabalhos analisaram o efeito da irradiação de laser em células HUVEC (Góralczyk et al, 2016; Chen et al, 2008). O primeiro mostrou a reversão de biomarcadores inflamatórios pela biofotomodulação em células HUVEC submetidas à hiperglicemia. Já Chen et al (2008) mostraram que a biofotomodulação aumenta a migração e secreção de óxido nítrico de células HUVEC irradiadas. Nenhum deles, porém mostrou o efeito da biofotomodulação na expressão de VEGF. Diante dos resultados do presente estudo é necessária uma caracterização mais completa do comportamento das células HUVEC à ação do laser e normatização dos parâmetros de irradiação nesta linhagem.

A angiogênese é um processo descrito por vários autores após a biofotomodulação. Em trabalho prévio, a irradiação de laser em células tronco derivadas de tecido adiposo humano e de rato mostramos a eficácia em estimular a transcrição do gene de VEGF e de seu receptor (de Oliveira et al., 2015). Em nosso estudo, também observamos o aumento do conteúdo de RNA mensageiro de VEGF em células HUVEC irradiadas. A própria indução de hipóxia também aumentou a quantidade de RNAm para VEGF, corroborando estudo de Yang et al (2009), onde foi observado um aumento da expressão de VEGF após 24h da indução de hipóxia.

Mais interessante, porém, foi o aumento da expressão de RNAm de VEGF no grupo irradiado e submetido à hipóxia experimental. Neste grupo, os níveis de RNAm para VEGF aumentaram de forma significativa em relação a todos os grupos experimentais. Este resultado indica uma somatória de efeitos indutores de produção da mensagem para a produção de VEGF. Entretanto, não detectamos aumento da secreção de VEGF pelas células HUVEC nos grupos experimentais, diferentemente de Yang et al. (2009), que observaram um aumento da concentração de VEGF no sobrenadante de células epiteliais de retina humana submetidas à hipóxia. Acreditamos que um aumento de tempo de análise poderia evidenciar este achado em nosso estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo de pré-tratamento com laser não foi efetivo para aumentar a viabilidade celular diante de uma situação de hipóxia, não foi possível observar resultados significativos com relação à morte celular, molécula de adesão leucocitária e ROS em células HUVEC. Observamos, porém, um aumento da expressão de RNAm para VEGF nas amostras irradiadas e ou submetidas à hipóxia. Este aumento não foi seguido pelo aumento de VEGF secretado no meio de cultura das células HUVEC. Esta linhagem celular, apesar de ainda precisar de padronização para a utilização do laser de forma efetiva, apresentou potencial para a melhora da condição celular em cultura após irradiação\hipóxia, possivelmente contribuindo para os processos de angiogênese e migração celular.

CONCLUSÃO

A biofotomodulação aumentou a produção de RNAm para VEGF em sinergia com o pré- condicionamento hipóxico.

REFERÊNCIAS

- Abbate A, Biondi-Zoccai GGL, Agostoni P, Lipinski MJ, Vetrovec GW. Recurrent angina after coronary revascularization: A clinical challenge. *Eur Heart J*. 2007; 28(9):1057-65.
- Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 464-78.
- Agrawal R, Dale TP, Al-Zubaidi MA,, Benny Malgulwar P, Forsyth NR, Kulshreshtha R. Pluripotent and Multipotent Stem Cells Display Distinct Hypoxic miRNA Expression Profiles. *PLoS One*. 2016 11(10):e0164976. doi: 10.1371.
- Aimbire F, Ligeiro de Oliveira AP, Albertini R, Corrêa JC, Ladeira de Campos CB, Lyon JP, Silva JA Jr, Costa MS. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1beta levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation*. 2008 Jun;31(3):189-97. doi: 10.1007/s10753-008-9064-4.
- Albertini R, Villaverde AB, Aimbre F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA, Costa M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2008 19-24. doi: 10.1089/pho.2007.2119.
- Anderson DC, Rothlein R, Marlin SD, Krater SS, Smith CW. Impaired transendothelial migration by neonatal neutrophils: abnormalities of Mac-1 (CD11b/CD18)-dependent adherence reactions. *Blood*. 1990 2613-21.
- Anwer AG, Gosnell ME, Perinchery SM, Inglis DW, Goldys EM. Visible 532 nm laser irradiation of human adipose tissue-derived stem cells: effect on proliferation rates, mitochondria membrane potential and autofluorescence. *Lasers Surg Med*. 2012 769-78. doi: 10.1002/lsm.22083.
- Arroyo AG, Iruela-Arispe ML. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res*. 2010 86(2):226-35. doi: 10.1093.
- Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 165-77. doi: 10.1038/nrm2639.
- Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, de Kreutzenberg S, Fadini GP. Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care*. 2011 Suppl 2:S285-90. doi: 10.2337/dc11-s239.
- Bader AM, Klose K, Bieback K, Korinth D, Schneider M, Seifert M, Choi YH, Kurtz A, Falk V, Stamm C. Hypoxic Preconditioning Increases Survival and Pro-Angiogenic Capacity of Human Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *PLoS One*. 2015 Sep 18;10(9):e0138477. doi: 10.1371/journal.pone.0138477.

Barthel SR, Annis DS, Mosher DF, Johansson MW. Differential engagement of modules 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) by integrins $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/29) and $\alpha M\beta 2$ (CD11b/18) of eosinophils. *J Biol Chem*. 2006 32175-87.

Bellis A, Castaldo D, Trimarco V, Monti MG, Chivasso P, Sadoshima J, et al. Cross-talk between PKA and Akt protects endothelial cells from apoptosis in the late ischemic preconditioning. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(8):1207–12. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.184135.

Bortone F, Santos HA, Albertini R, Pesquero JB, Costa MS, Silva JA Jr. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2008 206-10. doi: 10.1016/j.intimp.2007.09.004.

Brown JM. Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2002 453-8.

Burke B, Tang N, Corke KP, Tazzyman D, Ameri K, Wells M, Lewis CE. Expression of HIF-1 α by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J Pathol*. 2002 204-12.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003 653-60.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 473(7347):298-307. doi: 10.1038/nature10144.

Cesário JM, Brito RB, Malta CS, Silva CS, Matos YS, Kunz TC, Urbano JJ, Oliveira LV, Dalboni MA, Dellê H. A simple method to induce hypoxia-induced vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) expression in T24 human bladder cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2016.

Chen CH, Hung HS, Hsu SH. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers Surg Med*. 2008; 40(1):46-54. doi: 10.1002/lsm.20589.

Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol*. 2001 478-90.

Cruz HJ, Licea ME, Hernandez GP, Abraham ME, Yanes QM. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*. 2011 58:4-15.

Cury V, Moretti AIS, Assis L, Bossini P, Crusca JS, Neto CB, Fangel R, Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *J Photochem Photobiol B*. 2013 Aug 5; 125: 164–170. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.06.004.

de La Veja VM, Rodríguez MG, Quintana MG. La disfunción endotelial: una propuesta hacia el cambio. *Argentina Intermedicina*. 2007.

de Oliveira TS, Serra AJ, Manchini MT, Bassaneze V, Krieger JE, de Tarso Camillo de Carvalho P, Antunes DE, Bocalini DS, Ferreira Tucci PJ, Silva JA Jr. 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):217-23. doi: 10.1007/s10103-014-1646-9.

Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 617-25. doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.010.

Feldmeier J, Carl U, Hartmann K, Sminia P. Hyperbaric oxygen: does it promote growth or recurrence of malignancy? *Undersea Hyperb Med.* 2003 1-18.

Feng J, Zhang Y, Xing D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. *Cell Signal.* 2012 1116-25. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.013.

Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med* 2001, 1May 7;110 Suppl 7A:37S-46S.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002; 53(1):31-47.

Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007 273-86.

Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction.* 2010 85-97. doi: 10.1530/REP-09-0300.

Forsyth NR, Musio A, Vezzoni P, Simpson AH, Noble BS, McWhir J. Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. *Cloning Stem Cells.* 2006 16-23.

Glezer I, Marcourakis T, Avellar MCW, Gorenstein C, Scavone C. O fator de transcrição NF-kappaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2000 26-30.

Gomes, RD. Doenças cardiovasculares. 2012. Ministério da Saúde. Portal Brasil. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares>>. Acesso em: 25 Nov.13.

Góralczyk K, Szymańska J, Szot K, Fisz J, Rość D Low-level laser irradiation effect on endothelial cells under conditions of hyperglycemia. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(5):825-31.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 1996 88-91.

Griffiths L, Binley K, Iqbal S, Kan O, Maxwell P, Ratcliffe P, Lewis C, Harris A, Kingsman S, Naylor S. The macrophage - a novel system to deliver gene therapy to pathological hypoxia. *Gene Ther*. 2000 255-62.

Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I, van Meeteren LA, Samen E, Lu L, Vanwildemeersch M, Klar J, Genove G, Pietras K, Stone-Elander S, Claesson-Welsh L, Ylä-Herttuala S, Lindahl P, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature*. 2010 917-21. doi: 10.1038/nature08945.

Haroon ZA, Raleigh JA, Greenberg CS, Dewhirst MW. Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. *Ann Surg*. 2000 137-47.

Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg Med*. 2008 726-33. doi: 10.1002/lsm.20709.

Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer*. 2010 575-85. doi: 10.1038/nrc2894.

Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response*. 2009 358-83. doi: 10.2203/dose-response.09-027.

Johns T, Olson B. Experimental myocardial infarction I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*. 1954; 140(5):675-82.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989 691-704.

Kaufman B, Scharf O, Arbeit J, Ashcroft M, Brown JM, Bruick RK, Chapman JD, Evans SM, Giaccia AJ, Harris AL, Huang E, Johnson R, Kaelin W Jr, Koch CJ, Maxwell P, Mitchell J, Neckers L, Powis G, Rajendran J, Semenza GL, Simons J, Storkebaum E, Welch MJ, Whitelaw M, Melillo G, Ivy SP. Proceedings of the Oxygen Homeostasis/Hypoxia Meeting. *Cancer Res*. 2004 3350-6.

Kim H, Choi K, Kweon OK, Kim WH. Enhanced wound healing effect of canine adipose-derived mesenchymal stem cells with low-level laser therapy in athymic mice. *J Dermatol Sci*. 2012 149-56. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.09.013.

Klimenko VV, Knyazev NA, Moiseenko FV, Rusanov AA, Bogdanov AA, Dubina MV. Pulse mode of laser photodynamic treatment induced cell apoptosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016 Mar;13:101-7. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.01.003.

Lapolla A, Reitano R, Seraglia R, Sartore G, Ragazzi E, Traldi P. Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. *Mol Nutr Food Res*. 2005 685-90.

Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol.* 1999 889-900.

Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC Jr, Muscará MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol* (1985). 2006 283-8.

Mafrá de Lima F, Costa MS, Albertini R, Silva JA Jr, Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT): attenuation of cholinergic hyperreactivity, beta(2)-adrenergic hyporesponsiveness and TNF-alpha mRNA expression in rat bronchi segments in *E. coli* lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF-kappaB dependent mechanism. *Lasers Surg Med.* 2009 68-74. doi: 10.1002/lsm.20735.

Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M, Liu A, Vessella R, Rostomily R, Born D, Horwitz M, Ware C, Blau CA, Cleary MA, Rich JN, Ruohola-Baker H. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res.* 2011 4640-52. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3320.

Mavroeidis L, Sheldon H, Briasoulis E, Marselos M, Pappas P, Harris AL. Metronomic vinorelbine: Anti-angiogenic activity in vitro in normoxic and severe hypoxic conditions, and severe hypoxia-induced resistance to its anti-proliferative effect with reversal by Akt inhibition. *Int J Oncol.* 2015 Aug;47(2):455-64. doi: 10.3892/ijo.2015.3059.
Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NH, Silva CA, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KP. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. *Indian J Exp Biol.* 2011 423-8.

Morales VE, Di G, Briguori C, Fuster V, Martínez M. Endotelio, aterotrombosis y estatinas. Atlas Ilustrado. Primera Edición, Aguascalientes, Ags. 2010.

Moreira ED Jr, Neves RC, Nunes ZO, de Almeida MC, Mendes AB, Fittipaldi JA, Ablan F; Venezuelan Diabetes Investigators' Group. Glycemic control and its correlates in patients with diabetes in Venezuela: results from a nationwide survey. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 407-14. doi: 10.1016/j.diabres.2009.12.014.

Muscari C, Giordano E, Bonafè F, Govoni M, Pasini A, Guarnieri C. Priming adult stem cells by hypoxic pretreatments for applications in regenerative medicine. *J Biomed Sci.* 2013 20:63. doi: 10.1186/1423-0127-20-63.

Nakahara R, Makino J, Kamiya T, Hara H, Adachi T. Caffeic acid phenethyl ester suppresses monocyte adhesion to the endothelium by inhibiting NF-κB/NOX2-derived ROS signaling. *J Clin Biochem Nutr.* 2016 May;58(3):174-9. doi: 10.3164/jcbrn.15-94.

Närvä E, Pursiheimo JP, Laiho A, Rahkonen N, Emani MR, Viitala M, Laurila K, Sahla R, Lund R, Lähdesmäki H, Jaakkola P, Lahesmaa R. Continuous hypoxic culturing of human embryonic stem cells enhances SSEA-3 and MYC levels. *PLoS One.* 2013 e78847. doi: 10.1371/journal.pone.0078847.

Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.* 2012 118-48. doi: 10.1089/pho.2011.3142.

Pereira LO, Longo JP, Azevedo RB. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. *Arch Oral Biol.* 2012 1079-85. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.02.012.

Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell.* 2009 196-208. doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.015.

Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva JA Jr, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011 85-94. doi: 10.1007/s10103-010-0811-z.

Rosamond T, Wetzel LH, et al. IntraCameral right coronary artery: detection by 64 slice coronary computed tomographic angiography and implications for radiofrequency ablation of atrial dysrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol*, v.30, n.12, Dec, p.1571-4. 2007.

Sart S, Ma T, Li Y. Preconditioning stem cells for in vivo delivery. *Biores Open Access.* 2014;3(4):137–49. doi: 10.1089/biores.2014.0012.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 2001 345-50.

Silva MP, Bortone F, Silva MP, Araújo TR, Costa MS, Silva Júnior JA. Inhibition of carrageenan-induced expression of tissue and plasma prekallikreins mRNA by low level laser therapy in a rat paw edema model. *Rev Bras Fisioter.* 2011 1-7.

Sociedade Brasileira de Cardiologia, Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, Fonseca FA, dos Santos JE, Santos RD, Bertolami MC, Faludi AA, Martinez TL, Diamant J, Guimarães A, Forti NA, Moriguchi E, Chagas AC, Coelho OR, Ramires JA. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol.* 2013 Oct;101(4 Suppl 1):1-20. doi: 10.5935/abc.2013S010.

Schmid MC, Varner JA. Myeloid cells in tumor inflammation. *Vascular Cell.* 2012 4:14. doi:10.1186/2045-824X-4-14.

Storino MA, Contreras MA, Rojano J, Serrano R, Nouel A. Complicaciones de la diabetes y su asociación con el estrés oxidativo: un viaje hacia el daño endotelial. *Rev. Colomb. Cardiol.* 2014 21(6): 392-398.

Sun Y, George J, Rocha S. Dose-dependent effects of allopurinol on human foreskin fibroblast cells and human umbilical vein endothelial cells under hypoxia. *PLoS One.* 2015 e0123649. doi: 10.1371/journal.pone.0123649.

Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med.* 2000; 135(4):316-23.

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 227-33. doi: 10.1089/pho.2008.2272.

Velarde MS, Prado MM, Carrizo TR, Abregú AV, Sánchez SS. Evaluación de disfunción endotelial en pacientes con diabetes tipo 2. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 2007.

Vitale RF, Ribeiro FAQ. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2007 123-127.

Xavier M, David DR, de Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, Silva JA Jr, Salgado MA, Aimbire F, Albertini R. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med.* 2010 553-8. doi: 10.1002/lsm.20896.

Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.* 2007 239-48.

Yadira, MU, Aracely LM, Ángel RL. Trypanosoma Cruzi Y Endotelio: ¿Paraíso O Campo De Batalla?. *Rev. Revista De Divulgación Científica Y Tecnológica De La Universidad Veracruzana.* v. 23, n. 3, . 2008 72-78.

Yang XM, Wang YS, Zhang J, Li Y, Xu JF, Zhu J, Zhao W, Chu DK, Wiedemann P. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1 α and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(4):1873-9. doi: 10.1167/iovs.08-2591.

Zhang QQ, Hu XW, Liu YL, Ye ZJ, Gui YH, Zhou DL, Qi CL, He XD, Wang H, Wang LJ. CD11b deficiency suppresses intestinal tumor growth by reducing myeloid cell recruitment. *Sci Rep.* 2015 15948. doi: 10.1038/srep15948.