

TAMARA LEMOS MAIA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA SEMI-QUANTITATIVA DO EFEITO DE
LUZ INTENSA PULSADA (LIP) E INJEÇÃO INTRADÉRMICA DE
DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE
FIBROBLASTOS E COLÁGENO NA PELE DE RATAS WISTAR**

CAMPO GRANDE

2013

TAMARA LEMOS MAIA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA SEMI-QUANTITATIVA DO EFEITO DE
LUZ INTENSA PULSADA (LIP) E INJEÇÃO INTRADÉRMICA DE
DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE
FIBROBLASTOS E COLÁGENO NA PELE DE RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-
Oeste da Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul, para obtenção do
título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Nakao Odashiro

CAMPO GRANDE

2013

TAMARA LEMOS MAIA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA SEMI-QUANTITATIVA DO EFEITO DE LUZ
INTENSA PULSADA (LIP) E INJEÇÃO INTRADÉRMICA DE DIÓXIDO DE
CARBONO (CO₂) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS E
COLÁGENO NA PELE DE RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Saúde e Desenvolvimento na Região
Centro-Oeste da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do título de Mestre.

Resultado: _____

Campo Grande, MS, _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos - Presidente
(Em substituição ao Prof. Alexandre Nakao Odashiro)
Instituição: UFMS

Prof. Dra Ana Maria Ferreira Roselino - Membro
Instituição: FMRP-USP

Prof. Dr. André Luis Alonso Domingos - Membro
Instituição: UFMS

Iandara Schettert Silva - Suplente
Instituição: UFMS

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Francisco Manoel Maia e Maria Terezinha Lemos Maia** por estarem sempre presentes, principalmente nas maiores dificuldades. Por sempre valorizarem o caráter, o estudo, a dedicação, o respeito e, principalmente, pela responsabilidade maior da minha formação humana.

Aos meus irmãos **Franter Lemos Maia, Francine Lemos Maia e Talita Lemos Maia**, com os quais compartilhei, por todos esses anos, o verdadeiro amor fraterno.

Ao meu marido, **Ernesto Antonio Figueiró Filho**, que sempre me apoiou incondicionalmente em todas as fases da minha vida, compartilhando as alegrias das vitórias e confortando-me nas tristezas. De forma sublime, dedica seu entusiasmo, amor e companheirismo, pelo qual se faz presente em todos os momentos de nossas vidas.

Aos meus filhos, **Tiago Maia Figueiró e Rafaela Maia Figueiró**, razões maiores da minha existência e pelos quais procuro construir um caminho que outrora poderá ser seguido. Que vocês trilhem pelas estradas do saber, do respeitar e, principalmente, do amor e do bem. Que esta Dissertação seja um trabalho despretensioso, talvez guardada em uma prateleira, que, por um dia descoberta, revele a vocês a dedicação para o conhecimento e que sirva como estímulo para que nunca desistam de seus sonhos. A vocês meu eterno carinho e meu amor incondicional.

Ao meu sobrinho e afilhado **Felipe Maia Rodrigues**, para que siga sempre no caminho do amor e do bem, sendo o estudo e a aquisição de conhecimentos estímulos constantes para alcançar todos os seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, que nos proporciona tão boas condições de saúde, trabalho, raciocínio e equilíbrio para realização de todos os projetos de nossas vidas.

Às médicas **Lílian Rezende Coelho e Ili Breda**, pela prestimosa colaboração na realização de todas as etapas desta pesquisa, sem as quais muito do trabalho se perderia. Mais do que auxílio, contribuíram com sensibilidade, responsabilidade e afinco nas minúcias do projeto.

A toda equipe do Laboratório de Patologia LAC, em especial ao professor orientador **Prof. Dr. Alexandre Nakao Odashiro** e a sua equipe técnica, que contribuíram de forma essencial para realização dos estudos histológicos.

Ao **Prof Dr. Ricardo Dutra Aydos**, pela disponibilidade de substituição do Prof Alexandre Nakao Odashiro em minha banca de defesa da dissertação e pelas contribuições à dissertação na pré-defesa.

À Médica Veterinária e futura colega de profissão **Giovanna Pádoa de Menezes** pela indispensável contribuição, auxílio, amizade sempre presentes durante a realização da etapa experimental da pesquisa e pela forma responsável e cuidadosa no trato dos animais.

Ao acadêmico de medicina **Bruno Areco de Souza** pela ajuda na etapa experimental do estudo.

À **Dra Patrícia El Beitune**, pelas orientações oferecidas, pelo excelente trabalho estatístico, pela sua disponibilidade e, acima de tudo, pela sua amizade. A você meu sincero agradecimento.

Aos pequenos e inocentes **animais**, que seu sacrifício não seja em vão e proporcione passos importantes ao desenvolvimento científico.

*“Primeiro eles te ignoram, depois riem de você, depois brigam, e então, você
vence!”*

(Mahatma Gandhi)

“A melhor parte da beleza é aquela que nenhum quadro consegue expressar.”

(Francis Bacon)

RESUMO

Maia TL. Análise histológica semi-quantitativa do efeito da luz intensa pulsada (LIP) e da injeção intradérmica de dióxido de carbono (CO₂) sobre a proliferação de fibroblastos e colágeno na pele de ratas Wistar. Campo Grande; 2013. [Dissertação – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Introdução: Em anos recentes, o assim chamado “rejuvenescimento não-ablativo” vem sendo realizado com uso de *lasers* ou luz intensa pulsada (LIP) para estimular a produção de colágeno pelos fibroblastos dérmicos. A infusão intradérmica de CO₂ estimula os fibroblastos e a síntese de colágeno e elastina, contribuindo para a retração da pele e rejuvenescimento tecidual. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da LIP e da infusão intradérmica de CO₂ sobre a proliferação de fibroblastos e colágeno na pele de ratas. **Métodos:** Dezesseis ratas Wistar adultas foram divididas em dois grupos de oito animais. O Grupo 1 foi submetido a LIP e o grupo 2 a infusão intradérmica de CO₂. O tratamento teve duração de 8 semanas. Procedeu-se a uma punção em cada animal antes de qualquer procedimento (T0), outra na metade do tratamento, 4 semanas após o procedimento (T1), e outra no final do tratamento, 8 semanas após o procedimento (T2). Foram analisadas histopatologicamente as células envolvidas na inflamação, fibrose e vascularização do tecido lesionado. **Resultados:** Observaram-se proliferações estatisticamente significativas de fibroblastos e de colágeno quando se analisaram todos os 16 animais e também quando se consideram os dois grupos de estudo separadamente. **Conclusões:** Em ambos os grupos, a maior proliferação de fibroblastos coincidiu com períodos de maior produção de colágeno. Tanto o uso de LIP quanto o de infusão intradérmica de CO₂ estimularam a proliferação de fibroblastos e de colágeno na pele das ratas.

Palavras-chave: Colágeno, Fibroblastos, Dermatologia, Rejuvenescimento, Luz intensa pulsada, Injeção intradérmica, CO₂.

ABSTRACT

Maia TL. Histological semiquantitative analysis of the effect of Intense Pulsed Light (IPL) and Intradermal Injection of Carbon Dioxide (CO₂) upon fibroblasts and collagen proliferation on Wistar rat's skin. Campo Grande; 2013. [Dissertação – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Introduction: In recent years, so-called "non-ablative rejuvenation" has been carried out with the use of lasers or intense pulsed light (IPL) to stimulate collagen production by dermal fibroblasts. Intradermal infusion of CO₂ stimulates fibroblasts and the synthesis of collagen and elastin, contributing to the retraction of the skin and tissue rejuvenation. **Objective:** To evaluate the effects of IPL and the intradermal infusion of CO₂ on fibroblast proliferation and collagen in the skin of female rats. **Methods:** Sixteen adult female Wistar rats were divided into two groups of eight animals. Group 1 underwent IPL and group 2 underwent intradermal CO₂ infusion. There was a total of 8 weeks of treatment. We conducted a punch in each animal before any procedure (T0), another punch in the middle of treatment at 4 weeks post-procedure (T1) and a punch at the end of treatment at 8 weeks post-procedure (T2). The cells involved in inflammation, fibrosis and vascularization of the injured tissue by histopathology were analyzed. **Results:** There was statistically significant fibroblast proliferation and collagen proliferation noted when analyzing all 16 animals together and also when considering the two study groups separately. In both groups, the greatest proliferation of fibroblasts coincided with periods of increased collagen production. **Conclusion:** Both IPL and intradermal CO₂ infusion stimulated fibroblast and collagen proliferation in the skin of the rats studied.

Keywords: Collagen, Fibroblasts, Dermatology, Rejuvenation, Intense Pulsed Light, Intradermal injection, CO₂.

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1. Classificação para análise semi-quantitativa da proliferação fibroblástica e produção de colágeno.....	28
Tabela – 2. Expressão da proliferação fibroblástica e de colágeno nos três momentos analisados (T0, T1 e T2) considerando os dois grupos de estudo isoladamente.....	37
Tabela – 3. Comparação dos animais submetidos à Luz Intensa Pulsada e Injeção Intradérmica de CO ₂ quanto aos Graus de Proliferação Fibroblástica no meio (T1) e final (T2) do tratamento.....	38
Tabela – 4. Comparação dos animais submetidos à Luz Intensa Pulsada e Injeção Intradérmica de CO ₂ quanto aos Graus de Proliferação de Colágeno no meio (T1) e final (T2) do tratamento.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura – 1. Procedimentos experimentais em ratas Wistar: A) Preparo de área de cerca de 6 mm de diâmetro para remoção de um fragmento circular de pele da porção infralateral esquerda do dorso, designada T0, correspondendo a pele intacta de pré-tratamento isenta de intervenção. B e C) tratamento com infusão intradérmica de CO₂ foi aplicado uma vez por semana durante oito semanas na região supralateral direita do dorso logo após a raspagem. D) Cada animal foi submetido a seis aplicações de LIP na região supralateral direita da região dorsal, logo após a raspagem. O tratamento foi aplicado uma vez a cada duas semanas, durante oito semanas.....	30
Figura – 2. Avaliação de colágeno no grupo que recebeu LIP (G1), nos três momentos analisados: início (T0), ponto médio (T1) e final (T2) do tratamento. Hematoxilina-eosina (100x).....	31
Figura – 3. Avaliação de colágeno no grupo que recebeu LIP (G1), nos três momentos analisados: início (T0), ponto médio (T1) e final (T2) do tratamento. Hematoxilina-eosina(400X).....	32
Figura – 4. Avaliação de colágeno no grupo que recebeu injeção de CO₂ (G2), nos três momentos analisados: início (T0), ponto médio (T1) e final (T2) do tratamento. Hematoxilina-eosina (100X).....	33
Figura – 5. Avaliação de colágeno no grupo que recebeu injeção de CO₂ (G2), nos três momentos analisados: início (T0), ponto médio (T1) e final (T2) do tratamento. Hematoxilina-eosina (400X).....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA	Califórnia
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂ /CO2	Dióxido de Carbono
FAMED	Faculdade de Medicina
LIP	Luz Intensa Pulsada
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
USA	<i>United States of America</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
μm	Micrômetro
cm	Centímetro
G1	Grupo 1 – Luz Intensa Pulsada
G2	Grupo 2 – Injeção Intradérmica de CO ₂
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
T0	Tempo Zero (Controle)
T1	Metade do período de tratamento (4 semanas)
T2	Final do Período de tratamento (8 semanas)
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	14
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 – A pele.....	15
2.2 – O tecido conjuntivo da derme.....	16
2.3 – Colágeno como elemento da matriz extracelular.....	18
2.4 – A síntese do colágeno.....	19
2.5 – Luz Intensa Pulsada.....	20
2.6 – Injeção intradérmica de CO ₂	22
3 – OBJETIVOS.....	24
4 – ANIMAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 – Animais.....	25
4.2 – Local.....	25
4.3 – Condições locais e de acomodação dos animais.....	25
4.4 – Grupos.....	25
4.5 – Método anestésico.....	26
4.6 – Início do experimento e procedimentos diários.....	26
4.7 – Eutanásia.....	27
4.8 – Avaliação histológica e análise histopatológica.....	27
4.9 – Análise estatística.....	29
5 – RESULTADOS.....	35
6 – DISCUSSÃO.....	39
7 – CONCLUSÕES.....	42
8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO.....	48
APÊNDICE.....	50

1 INTRODUÇÃO

Após revisão bibliográfica a respeito da ação da Luz Intensa Pulsada e da Injeção Intradérmica de CO₂ sobre a proliferação fibroblástica e de colágeno, verificou-se que muitas lacunas existem no conhecimento a respeito deste tema.

Trabalhos que avaliam quantitativamente o efeito histológico proliferativo em peles submetidas aos diversos estímulos, com intuito de rejuvenescimento, ainda são necessários.

Com base nisso e considerando a grande relevância do tema no que tange as técnicas de rejuvenescimento, prevenção do envelhecimento cutâneo e cicatrização, é de extrema importância a realização de estudos experimentais amplos e aprofundados nos quais se avaliem os efeitos clínicos e histológicos da luz intensa pulsada e da Injeção Intradérmica de CO₂ sobre a pele. Com base nessas informações, o presente estudo traz conhecimentos sobre o assunto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A pele

A pele recobre a superfície do corpo e constitui-se de uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo e em continuidade com a derme está a hipoderme que lhe serve de suporte e união com os órgãos subjacentes (Batistela, Chorili e Leonardi, 2007). A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Além desse epitélio, a epiderme apresenta ainda três tipos de células: os melanócitos, as células de Langerhans e de Merkel (Sampaio e Rivitti, 2007) .

A espessura e estrutura da epiderme variam com o local estudado, e ela apresenta, da derme para a sua superfície, as camadas basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. Nas regiões onde a epiderme é mais fina e mais simples, freqüentemente faltam as camadas granulosa e lúcida, bem como a camada córnea é mais reduzida (Sampaio e Rivitti, 2007).

A derme é o tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme. A derme apresenta espessura variável de acordo com a região observada. Sua superfície externa é extremamente irregular, observando-se saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme. Essas saliências recebem o nome de papilas dérmicas. Acredita-se que a função das papilas seja aumentar a zona de contato derme-epiderme, trazendo maior resistência à pele (Sampaio e Rivitti, 2007).

Descrevem-se na derme duas camadas, de limites pouco distintos, que são a papilar e a reticular. A camada papilar, mais superficial, é delgada, constituída por fibras colágenas finas, fibras elásticas, numerosos fibroblastos e abundante substância fundamental, formando as papilas dérmicas que se amoldam aos cones epiteliais da epiderme. A camada reticular, mais profunda, apresenta feixes colágenos mais espessos dispostos, em sua maior parte, paralelos à epiderme. Há menor quantidade de fibroblastos e substância fundamental em relação à derme papilar (Sampaio e Rivitti, 2007).

Ambas as camadas contêm muitas fibras elásticas, responsáveis em parte pelas características de elasticidade da pele. Além dos vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, também são encontradas na derme as seguintes estruturas derivadas da epiderme: pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas (Sampaio e Rivitti, 2007).

2.2 O tecido conjuntivo da derme

O tecido conjuntivo caracteriza-se, morfológicamente, por apresentar diversos tipos de células, separadas por abundante material intercelular sintetizado por elas. Esse material é representado por uma parte com estrutura microscópica definida, as fibras do conjuntivo, e por uma parte não-estruturada, a substância fundamental amorfa. Banhando as células, as fibras e a substância amorfa, há uma pequena quantidade de fluido, o plasma intersticial (Sampaio e Rivitti, 2007).

As fibras do tecido conjuntivo são de três tipos principais: colágenas, reticulares e elásticas. Como as fibras colágenas e as reticulares são constituídas pela proteína colágeno, existem na realidade dois sistemas de fibras: o sistema colágeno e o sistema elástico (Sampaio e Rivitti, 2007).

O conjuntivo possui células próprias e células vindas do sangue. A divisão de trabalho entre as células do conjuntivo determina o aparecimento de vários tipos celulares, cada um com características morfológicas e funcionais próprias. Essas células são: fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos (Sampaio e Rivitti, 2007; Chu, 2012).

A célula mais comum no tecido conjuntivo e a principal responsável pela formação das fibras e do material intercelular amorfo é o fibroblasto, o qual sintetiza colágeno, elastina, proteoglicanas e glicoproteínas estruturais. É uma célula dotada de mobilidade, porém sua movimentação é muito lenta. Há dois tipos extremos de fibroblastos, separados por tipos intermediários. A célula, em intensa atividade sintética, tem morfologia diferente do fibroblasto que já sintetizou muito e que se situa entre as fibras por ele fabricadas. Certos autores reservam a designação de fibroblasto para a célula mais ativa, chamando a célula “inativa” de fibrócito (Chu, 2012). Havendo um estímulo adequado, como ocorre nos processos de cicatrização, o fibrócito pode voltar a

sintetizar fibras, reassumindo o aspecto descrito para o fibroblasto. No conjuntivo do adulto, os fibroblastos não se dividem com frequência, entrando em mitose apenas quando ocorre uma solicitação, como por exemplo, nas lesões do tecido conjuntivo. (Berry *et al.*, 1998; Sampaio e Rivitti, 2007; Chu, 2012).

Com relação à matriz extracelular, ela é o conteúdo que une as células constituintes do tecido. É composta por um conjunto heterogêneo de macromoléculas produzidas pelas próprias células dos tecidos. O tipo de macromolécula, bem como sua organização e quantidade relativa, determinam as propriedades físicas e funcionais dos tecidos. A matriz pode constituir a maioria do tecido como, por exemplo, na pele, ossos ou cartilagem, ou a minoria, como no tecido nervoso. Atualmente, sabe-se que a matriz não é apenas um componente passivo do tecido, mas pelo contrário, pode influenciar as suas células no que diz respeito a vários fenômenos biológicos importantes como migração, proliferação, desenvolvimento, forma e função (Sampaio e Rivitti, 2007; Chu, 2012).

Didaticamente, pode-se dividir as macromoléculas da matriz em duas classes distintas: fibrilares e não-fibrilares. Os componentes fibrilares podem ser subdivididos em dois subgrupos, as proteínas estruturais e as de adesão, também chamadas glicoproteínas de matriz. As proteínas estruturais são, principalmente, o colágeno e a elastina. O colágeno confere resistência tênsil ao tecido e a elastina, sua elasticidade. As proteínas de adesão promovem a ligação das células aos diferentes elementos da matriz. Pode-se citar como exemplo a laminina, que une as células epiteliais à sua membrana basal, e a fibronectina, que liga e promove a adesão dos fibroblastos com a matriz extracelular do tecido conjuntivo, através de um grupo especial de proteínas integrais da membrana chamadas de integrinas (Sampaio e Rivitti, 2007).

Os componentes não-fibrilares são representados pelas glicosaminoglicanas e proteoglicanas. As primeiras são polissacarídeos de alto peso molecular e grande quantidade de cargas negativas. As glicosaminoglicanas são encontradas, em sua maioria, ligadas a proteínas e, neste caso, denominam-se proteoglicanas. Tais moléculas promovem um meio hidratado, similar a um gel, que permite livremente a difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios entre a corrente sanguínea e as células, além de conferir resistência compressiva aos tecidos (Sampaio e Rivitti, 2007).

2.3 Colágeno como elemento da matriz extracelular

Como componente majoritário da matriz extracelular da pele e ossos, os colágenos são as proteínas mais abundantes nos mamíferos, respondendo por 25% da massa protéica total do organismo. No microscópio eletrônico, verifica-se que as fibrilas colágenas apresentam uma estriação transversal típica. Essa estriação aparece como períodos de 67nm, cada período formado por duas faixas, uma clara e outra escura. Observadas no microscópio de luz, as fibras colágenas são acidófilas, corando-se de róseo pela técnica da hematoxilina-eosina. As fibras colágenas são constituídas por uma glicoproteína estrutural denominada colágeno, que tem composição de aminoácidos bem característica (Sampaio e Rivitti, 2007; Chu, 2012).

A molécula do colágeno é constituída por três cadeias, denominadas cadeias- α . Cada uma delas é composta pela combinação de três aminoácidos sintetizados em sequencia repetidamente, sendo o primeiro deles sempre a glicina. Estas três cadeias são enroladas em torno uma das outras formando uma tripla-hélice. A riqueza de glicina (33,5% dos aminoácidos totais do colágeno) e de prolina/hidroxiprolina (12%/10%) confere propriedades especiais à tripla-hélice, graças as suas características moleculares. A primeira, por ser o menor aminoácido existente, permite uma aproximação maior entre as cadeias- α , mantendo-as bem unidas, e o segundo, devido a sua estrutura molecular cíclica, permite uma maior estabilidade helicoidal a cada cadeia- α (Chu, 2012).

Devido às inúmeras combinações possíveis dos três aminoácidos iniciais, poderia, teoricamente, existir mais de 10.000 subtipos de colágeno, contudo, até hoje, foram descobertos por volta de 21 subtipos apenas, nomeados com algarismos romanos (exemplo: colágeno tipo I, tipo II, tipo III, etc.). O colágeno tipo I representa mais de 90% do colágeno total e é o principal colágeno da pele e ossos (Chu, 2012).

2.4 A síntese do colágeno

O colágeno, a proteína mais abundante do corpo humano, é sintetizado por diversos tipos celulares, dentre eles os fibroblastos. As fibras colágenas são constituídas por uma escleroproteína com composição de aminoácidos (Chu, 2012).

Um dos passos mais críticos na formação do colágeno é a formação da tríplice-hélice de três cadeias de pró-colágeno unidas pelo peptídeo terminal após a translação, assumindo configuração globular. À medida que as cadeias se formam, ocorre hidroxilação de alguns resíduos de lisina e prolina selecionados para tal. Tanto na porção amino-terminal, quanto na porção carbono-terminal, são sintetizados aminoácidos adicionais denominados peptídeos de registro. Esses alinham as cadeias- α entre si de modo a formar a tripla-hélice e a impedem de polimerizar (formar fibrilas) com as outras tripla-hélices intracelularmente. A tripla-hélice já formada, ainda com os peptídeos de registro, é denominada procolágeno. Posteriormente, as moléculas de procolágeno são transportadas ao complexo de Golgi, onde são separadas em vesículas de secreção e transportadas para a periferia da célula por microtúbulos do citoesqueleto celular (Chu, 2012).

Ao sofrerem exocitose, ou seja, agora no meio extracelular, as moléculas de procolágeno sofrem ação da enzima procolágeno peptidase, que separa as cadeias- α dos seus peptídeos de registro. A tripla-hélice, agora denominada tropocolágeno, sofre polimerização umas com as outras, formando as fibrilas de colágeno. As características da polimerização do tropocolágeno promovem regiões periódicas, onde ocorrem sobreposição de várias moléculas de tropocolágeno ao longo de toda a espessura da fibrila, ao lado de regiões que apresentam espaços livres entre duas dessas moléculas. Dentro de cada fibrila ocorrem ligações cruzadas entre os resíduos de lisina intramolecularmente (dentro da mesma molécula de tropocolágeno). Quanto maior o número dessas ligações, maior será a resistência tênsil que o tecido poderá suportar. As fibrilas são, então, organizadas segundo a orientação desejada e segundo a função que desempenham no tecido. O fibroblasto é responsável por tal organização e para isso dispõe de dois mecanismos: síntese de outros componentes da matriz que agem sobre as

fibrilas recém-sintetizadas e tração mecânica das fibrilas com formação de recessos citoplasmáticos ou migração celular (Sampaio e Rivitti, 2007).

Finalmente, após orientar um grupo de fibrilas na mesma direção, esse grupo pode ser chamado de fibras de colágeno e num estágio mais tardio as fibras podem ser organizadas formando verdadeiros cabos na matriz extracelular, denominados feixes, ou serem organizadas em camadas com orientações tridimensionais diferentes, umas sobre as outras, que formam a estrutura da maioria dos órgãos (Sampaio e Rivitti, 2007).

Com o envelhecimento, ocorre redução da capacidade de transporte da pele e subsequente atrofia e perda de elasticidade secundárias à redução da produção de colágeno (Oriá *et al.*, 2003; Ferreira, Haddad e Tavares, 2008). Várias técnicas propostas para o rejuvenescimento da pele envolvem elevar a proliferação de colágeno utilizando métodos baseados em *laser*, luz pulsada e injeção intradérmica de CO₂ (Prieto *et al.*, 2005; Catorze, 2009).

2.5 Luz Intensa Pulsada

A luz intensa pulsada (LIP) consiste em um feixe de luz não-coerente cujo espectro de radiação abrange diversos comprimentos de onda simultaneamente. O feixe policromático é capturado por diferentes cromóforos associados a diferentes comprimentos de onda ou cores, geralmente entre 500 e 1200 nm do espectro eletromagnético, abrangendo todo o setor de luz visível e parte dos infravermelhos. Isso, juntamente com os outros aspectos referidos, amplia o espectro terapêutico coberto por LIP (Goldberg, 2000; Goldberg e Cutler, 2000; Patriota, Rodrigues e Cucé, 2011; Goldberg, 2013).

Já a energia laser se caracteriza pela emissão de fótons com um mesmo comprimento de onda (exemplo: laser rubi tem comprimento de onda de 695 nm). Esta característica determina que o laser seja contínuo, monocromático, colimado, coerente, com luminosidade focalizada. A energia emitida por um aparelho de LIP é descontínua, policromática, não colimada e não coerente (Goldberg, 2013).

Tanto a tecnologia laser como a LIP são os produtos da emissão estimulada de radiação. Enquanto os aparelhos laser obtêm esta energia a partir de elementos sólidos, líquidos ou gasosos, a LIP obtém a partir de elemento gasoso (Goldberg, 2013).

A LIP, assim como os lasers não ablativos, opera com o princípio da fototermólise seletiva. O princípio envolvido é a absorção da radiação com comprimento de onda específico por um determinado cromóforo que esteja situado profundamente na derme, sem lesão (ou com mínima lesão) da epiderme e da derme ao redor da estrutura alvo, que pode ser um pêlo, telangiectasias, o pigmento de uma tatuagem ou manchas hiperocrômicas. Os cromóforos naturais da pele (a água, a hemoglobina e a melanina) têm seus espectros de absorção próprios para cada comprimento de onda (Prieto *et al.*, 2005; Prieto, Zhang e Sadick, 2005).

Ao escolher a luz intensa pulsada ideal, deve-se optar pelo intervalo de comprimento de onda no qual o cromóforo-alvo tenha absorção máxima, enquanto os demais cromóforos tenham menor absorção. Também se deve levar em consideração a profundidade da estrutura-alvo, que deve corresponder à penetração daquele comprimento de onda na pele. A duração do pulso de luz é ajustada de acordo com o tempo de relaxamento térmico da estrutura a ser atingida, pois o aquecimento seletivo do alvo é mais efetivo quando o tempo de fornecimento da energia necessária para sua destruição é menor que a velocidade de resfriamento do mesmo. Dessa maneira, evita-se ainda a lesão das estruturas adjacentes (Prieto *et al.*, 2005; Prieto, Zhang e Sadick, 2005).

O fotorrejuvenescimento não-ablativo com LIP se baseia no dano térmico reversível ao colágeno, ocasionado por penetração de luz na derme e aquecimento direto destas estruturas, poupando a epiderme (Goldberg, 2000; Goldberg e Cutler, 2000; Patriota, Rodrigues e Cucé, 2011). Assim, obtêm-se contração das fibras de colágeno e remodelação adequada das fibras após o período inflamatório. Um feixe policromático é capturado por diferentes cromóforos associados a diferentes comprimentos de onda ou cores. Isso, juntamente com os outros aspectos referidos, amplia o espectro terapêutico coberto pela LIP (Prieto, Zhang e Sadick, 2005).

2.6 Injeção Intradérmica de CO₂

O tratamento com dióxido de carbono (CO₂) envolve infusão subcutânea ou transcutânea de CO₂ para induzir efeitos terapêuticos que beneficiam a microcirculação e oxigenação dos tecidos (Brandi *et al.*, 2001; Brandi *et al.*, 2010). Estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da terapia subcutânea de dióxido de carbono para várias condições médicas, incluindo distúrbios funcionais do fluxo sanguíneo, doença arterial periférica, distúrbios microcirculatórios, cicatrização lenta, lipomatose simétrica múltipla, celulite e adiposidade (Brandi *et al.*, 2001; Brockow *et al.*, 2001; Brandi *et al.*, 2004; Ferreira, Haddad e Tavares, 2008; Brandi *et al.*, 2010; Brandi *et al.*, 2012).

Não há relatos de efeitos adversos ou complicações associados com a infusão intradérmica e subcutânea de CO₂, seja ela local ou sistêmica (Brockow *et al.*, 2001). Os possíveis efeitos secundários estão limitados a dor de baixa intensidade durante a aplicação, pequenos hematomas da punção e sensação de crepitação local (Brandi *et al.*, 2012). Estudos que utilizaram CO₂ para angiografia de contraste atestam a segurança desse gás e demonstram sua não-propensão a causar coágulos. O gás pode ser utilizado com injeções intravasculares em bôlus de até 100 ml e fluxos contínuos de 20 a 30 ml/s, sem reações adversas (Zwaan *et al.*, 1996; Kummer-Kloess *et al.*, 1997; Zwaan *et al.*, 1997).

Quando aplicado à camada superficial da pele, o CO₂ estimula a síntese de colágeno e elastina pelos fibroblastos, contribuindo para a retração da pele e resultando em rejuvenescimento e redução da flacidez tecidual (Hartmann, Bassenge e Hartmann, 1997; Hartmann, Bassenge e Pittler, 1997; Brandi *et al.*, 2001; Brandi *et al.*, 2004; Brandi *et al.*, 2010; Brandi *et al.*, 2012).

É viável avaliar experimentalmente os efeitos da LIP e da injeção intradérmica de CO₂ (Prieto *et al.*, 2005; Prieto, Zhang e Sadick, 2005; Ferreira, Haddad e Tavares, 2008; Patriota, Rodrigues e Cucé, 2011). Uma revisão da literatura sobre LIP e injeção intradérmica de CO₂ aplicadas à proliferação de fibroblastos e colágeno indica a existência de lacunas no conhecimento sobre o assunto (Ferreira, Haddad e Tavares,

2008). Uma análise da relevância do estudo de tais técnicas para o rejuvenescimento, prevenção e atenuação do envelhecimento da pele evidenciou que novas pesquisas nessa área são imprescindíveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da Luz Intensa Pulsada e da injeção intradérmica de CO₂ sobre a proliferação de fibroblastos e colágeno na pele de ratas Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Comparar os Graus de Proliferação Fibroblástica e de Colágeno entre o início (T0), meio (T1) e final (T2) do tratamento dos animais submetidos à Luz Intensa Pulsada;
- 2) Comparar os Graus de Proliferação Fibroblástica e de Colágeno entre o início (T0), meio (T1) e final (T2) do tratamento dos animais submetidos à Injeção Intradérmica de CO₂;
- 3) Comparar os animais submetidos à Luz Intensa Pulsada e à Injeção Intradérmica de CO₂ quanto aos Graus de Proliferação Fibroblástica e de Colágeno no meio do tratamento (T1);
- 4) Comparar os animais submetidos à Luz Intensa Pulsada e à Injeção Intradérmica de CO₂ quanto aos Graus de Proliferação Fibroblástica e de Colágeno no final do tratamento (T2);

4 ANIMAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas 16 ratas adultas fêmeas da raça Wistar, com massa corpórea variando entre 160 e 200 gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS (Protocolo 241/2009).

4.2 Local

A primeira etapa do estudo, envolvendo a prática direta com os animais, foi realizada no biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. A análise histológica da pele das ratas foi feita no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMED/UFMS).

4.3 Condições locais e de acomodação dos animais

Os animais receberam água e alimentação (ração granulada comercial) *ad libitum* antes e durante todo o período experimental, sendo submetidos a ciclos de 12h de luz e 12h de escuridão, alternados. Foram mantidos em gaiolas coletivas retangulares de dimensões 49x34x16cm (comprimento x largura x altura) com oito animais em cada, em ambiente silencioso e com temperatura entre 21 e 25°C, em conformidade com as diretrizes para uso de animais de laboratório (Field *et al.*, 2007; Kohn *et al.*, 2007).

4.4 Grupos

As ratas foram divididas em 2 grupos, cada um composto por 8 animais, conforme descrição abaixo:

- Grupo 1 (G1): submetido à Luz Intensa Pulsada.

- Grupo 2 (G2): submetido à Injeção Intradérmica de CO₂.

4.5 Método anestésico

Antes de qualquer procedimento, os animais foram submetidos à anestesia com solução injetável de Quetamina a 10% na dose de 10 mg/kg associada à xilazina na dose de 1 mg/kg, por via intramuscular, utilizando-se agulha de 25x5 mm. A quetamina é um anestésico geral que tem também ação analgésica somática (pele e músculos). Isoladamente, promove apenas imobilização, acompanhada de rigidez muscular. Em doses rotineiras, induz analgesia superficial (pele, musculatura), aumenta a secreção salivar e mantêm reflexos protetores presentes. Para atenuar seus efeitos colaterais, a quetamina deve ser associada à xilazina ou aos benzodiazepínicos (diazepam e midazolam). A xilazina é potente sedativo, que proporciona analgesia visceral e excelente relaxamento muscular (Field *et al.*, 2007; Kohn *et al.*, 2007).

4.6 Início do experimento e procedimentos diários

Antes de qualquer tratamento, todos os animais foram anestesiados e tricotomizados na região dorsal para realização de um “*PUNCH*” de aproximadamente 6mm de diâmetro para remoção de um fragmento circular de pele na porção ínfero-lateral esquerda do dorso para estudo histológico, o que foi padronizado como controle (**T0**).

Após uma semana da realização do “*PUNCH*”, teve início o tratamento nos animais de acordo com a divisão dos grupos. Antes de cada procedimento, as ratas foram anestesiadas, conforme explicitado no item 4.5. Os dois grupos de tratamento foram assim distribuídos:

- G1 (LIP): Oito animais deste grupo foram tratados com LIP de comprimento de onda de 550-900 nm com pulso médio. Cada animal foi submetido a seis aplicações de luz na região supralateral direita da região dorsal logo após a raspagem. O tratamento foi aplicado uma vez a cada duas semanas, durante oito semanas.

- G2 (CO₂): Os oito animais deste grupo foram tratados com injeção intradérmica de CO₂ com fluxo de 80 ml/min. O volume total (em mililitros) infundido por aplicação de CO₂ foi limitado pela seguinte fórmula: peso do animal (kg) x 5. O tratamento foi aplicado na região supralateral direita do dorso logo após a raspagem, uma vez por semana durante oito semanas.

Após a quarta semana de tratamento, os animais foram submetidos a novo “PUNCH” de cerca de 6 mm de diâmetro para remoção de fragmento circular de pele do local de intervenção (porção supralateral direita do dorso). O fragmento foi utilizado para a análise histológica programada para a metade do período de tratamento **(T1)**.

Ao final de oito semanas de tratamento, os animais foram submetidos ao último “PUNCH” de cerca de 6 mm de diâmetro para remoção de fragmento circular de pele do local de intervenção (porção supralateral direita do dorso) destinada à análise histológica programada para o final do tratamento **(T2)**.

4.7 Eutanásia

Após as oito semanas de tratamento e a realização do “PUNCH” para análise histológica, os animais foram eutanasiados por método químico, sendo realizada superdosagem de pentobarbital sódico. Foi aplicada uma dose de 100 mg/kg (três vezes a dose anestésica), por via intraperitoneal, sendo este um método rápido e uma forma aceitável de eutanásia (Aclam, 2003; Artwohl *et al.*, 2006; Field *et al.*, 2007; Kohn *et al.*, 2007).

4.8 Avaliação Histológica e Análise Histopatológica

Os espécimes foram fixados em formalina tamponada a 10% durante 24h. Para as técnicas histopatológicas de rotina, os espécimes foram incluídos em blocos de parafina, dos quais se extraíram seções de 4 mm de espessura usando um micrótomo rotativo. Foram analisadas histopatologicamente as células envolvidas na inflamação, fibrose e

vascularização do tecido lesionado. Para análise das células inflamatórias e fibrose utilizou-se coloração histoquímica universal (hematoxilina-eosina).

Para avaliar a proliferação de fibroblastos e de colágeno, procedeu-se a análise semiquantitativa estimando-se de maneira sistematizada as quantidades recém-formadas de colágeno e de fibroblastos, com base na observação das lâminas. As lâminas foram classificadas em quatro graus (G0, G1, GII e GIII), com base no percentual da lâmina sobre o qual os novos fibroblastos e o colágeno organizado (Domingos *et al.*, 2009) se formaram (Tabela 1). A análise semiquantitativa foi realizada em concordância com a técnica clássica de morfometria quantitativa (Hyde *et al.*, 1992; Araf *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2008; Cavazana *et al.*, 2009; Domingos *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2009).

As lâminas foram codificadas de modo a não identificar os grupos de tratamento ou momentos de biópsia. Foram avaliadas aleatoriamente pelo patologista que desconhecia quais eram os grupos e os tempos de tratamento correspondentes. As classificações de proliferação dos fibroblastos e do colágeno foram registradas em uma planilha juntamente com a identificação codificada da lâmina, sendo essa identificação posteriormente decodificada.

Tabela - 1. Classificação para análise semiquantitativa da proliferação fibroblástica e produção de colágeno.

Grau	Proliferação fibroblástica (%lâmina)	Colágeno (% da lâmina)
Grau 0	0 a 5%	0 a 5%
Grau I	5 a 25%	5 a 25%
Grau II	25 a 50%	25 a 50%
Grau III	Mais de 50%	Mais de 50%

A Figura 1 demonstra os procedimentos realizados nos animais durante os experimentos. As figuras 4, 5, 6 e 7 mostram a avaliação de colágeno nos grupos LIP (G1) e CO₂ (G2), nos três momentos analisados: início (T0), ponto médio (T1) e final (T2) do tratamento em aumentos de 100x e 400x.

4.9 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como valores absolutos, porcentagens e proporções. Aplicou-se teste de variância não-paramétrico (Kruskal–Wallis) para comparar os graus de proliferação de fibroblastos e colágeno nos grupos de estudo. Quando o teste indicou diferença significativa, utilizou-se pós-teste de Dunn para comparar os graus de proliferação de colágeno e fibroblástica dentro dos grupos LIP e CO₂.

Também utilizou-se o Teste Exato de Fisher para comparações dos graus de proliferação de fibroblastos e colágeno nos tempos T1 e T2, entre os grupos de estudo.

Como medida de precisão, adotou-se intervalo de confiança de 95%. Adotou-se $p < 0.05$ como nível de significância estatística. Toda a análise estatística foi realizada com o pacote de *software* estatístico GraphPad Prism, versão 5.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

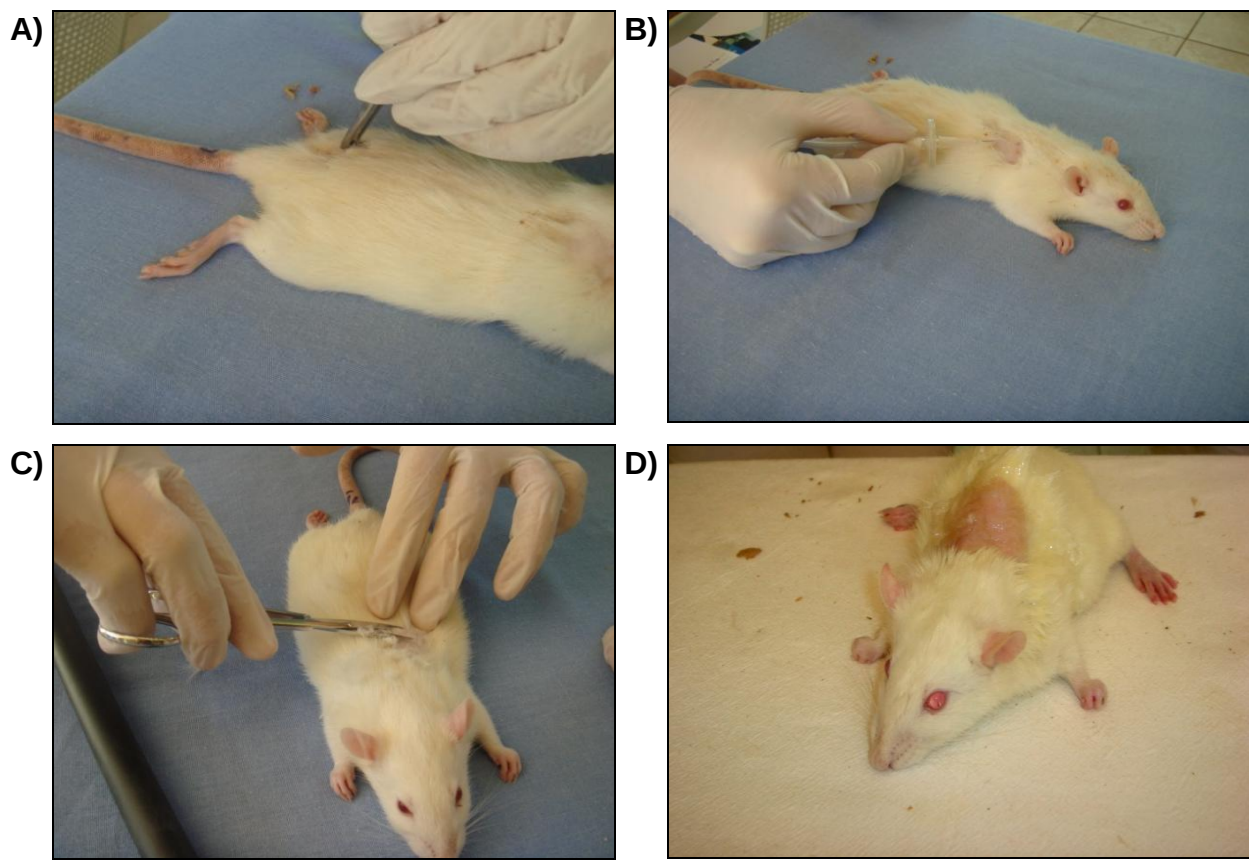


Figura – 1. Procedimentos experimentais em ratas Wistar: **A)** Preparo de área de cerca de 6 mm de diâmetro para remoção de um fragmento circular de pele da porção infralateral esquerda do dorso, designada T0, correspondendo a pele intacta de pré-tratamento isenta de intervenção. **B e C)** tratamento com infusão intradérmica de CO₂ foi aplicado uma vez por semana durante oito semanas na região supralateral direita do dorso logo após a raspagem. **D)** Cada animal foi submetido a seis aplicações de LIP na região supralateral direita da região dorsal, logo após a raspagem. O tratamento foi aplicado uma vez a cada duas semanas, durante oito semanas.

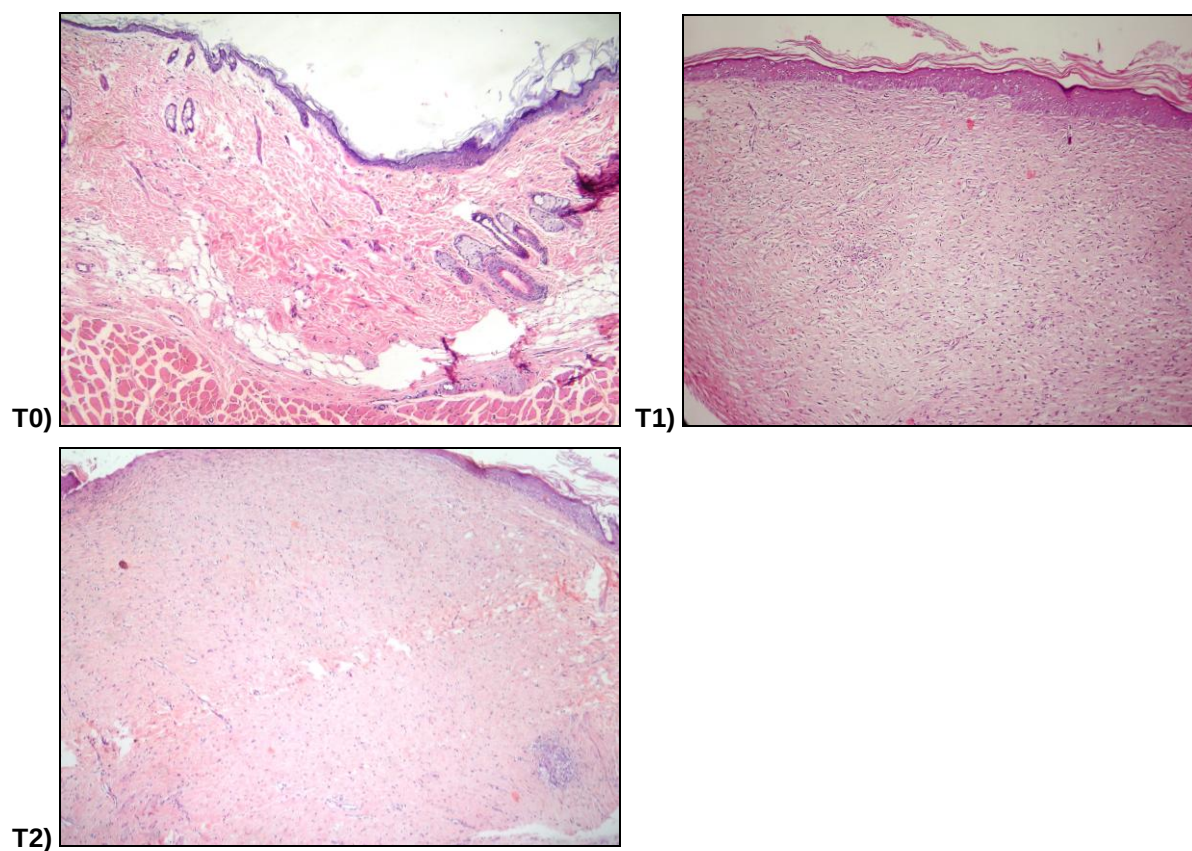


Figura – 2. Avaliação de colágeno no grupo que recebeu LIP (G1), nos três momentos analisados: início (T0), ponto médio (T1) e final (T2) do tratamento. Hematoxilina-eosina (100x).

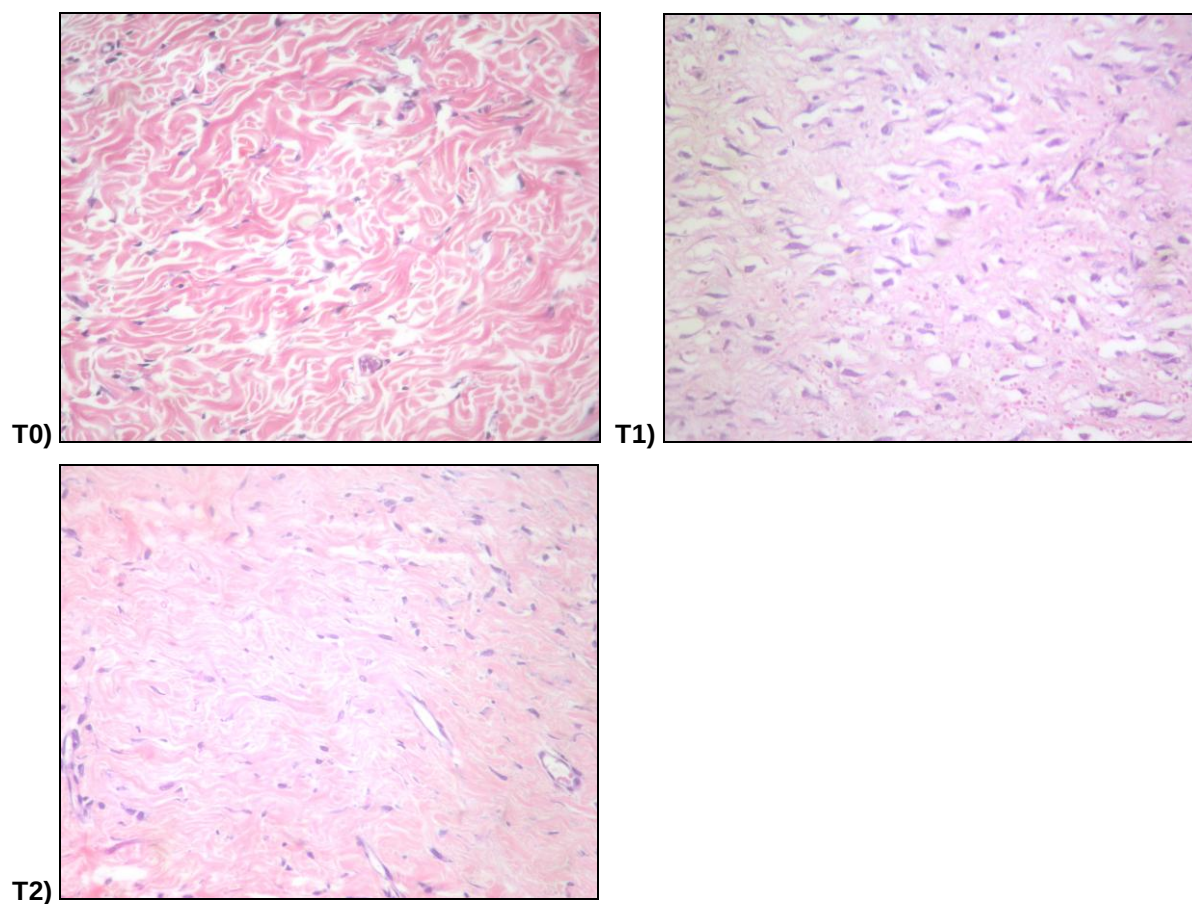


Figura – 3. Avaliação de colágeno no grupo que recebeu LIP (G1), nos três momentos analisados: início (T0), ponto médio (T1) e final (T2) do tratamento. Hematoxilina-eosina (400X).

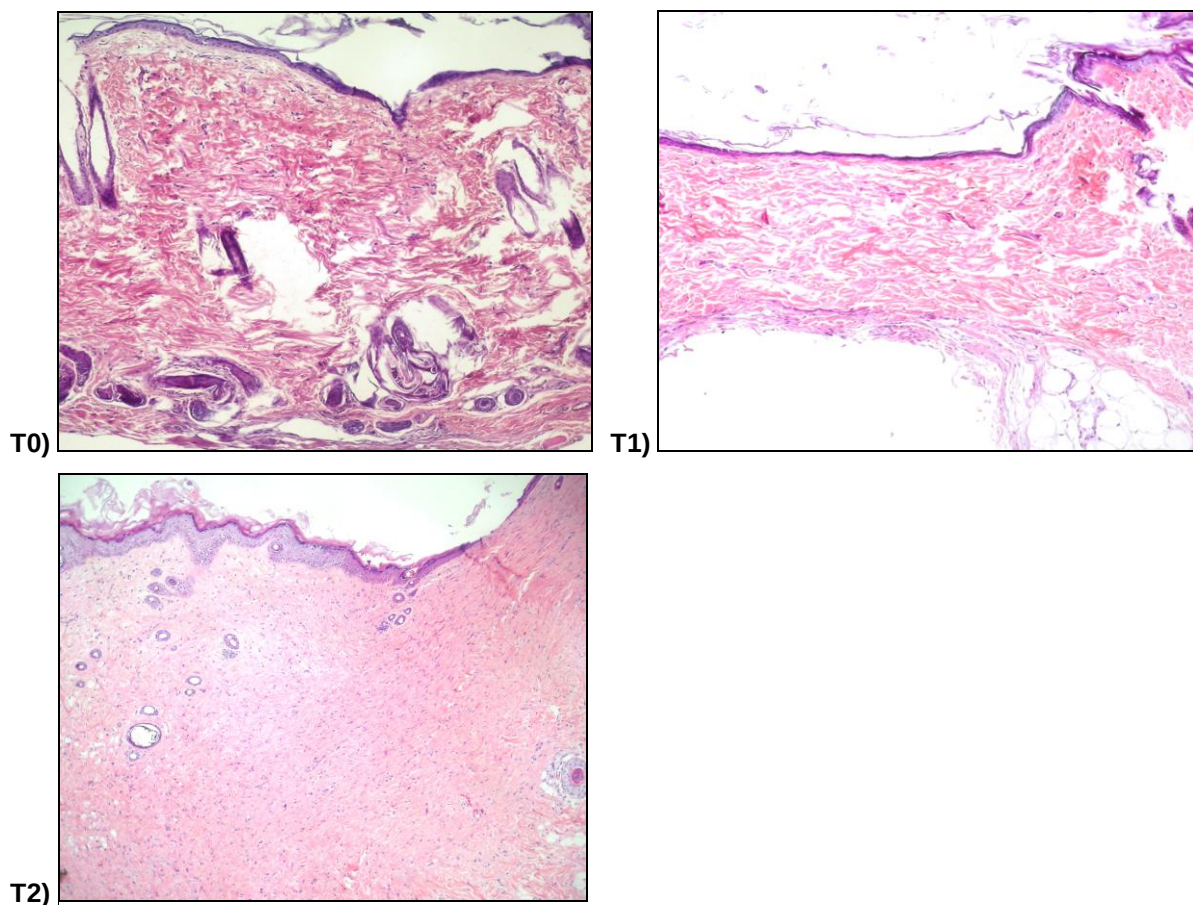


Figura – 4. Avaliação de colágeno no grupo que recebeu injeção de CO₂ (G2), nos três momentos analisados: início (T0), ponto médio (T1) e final (T2) do tratamento. Hematoxilina-eosina (100X).

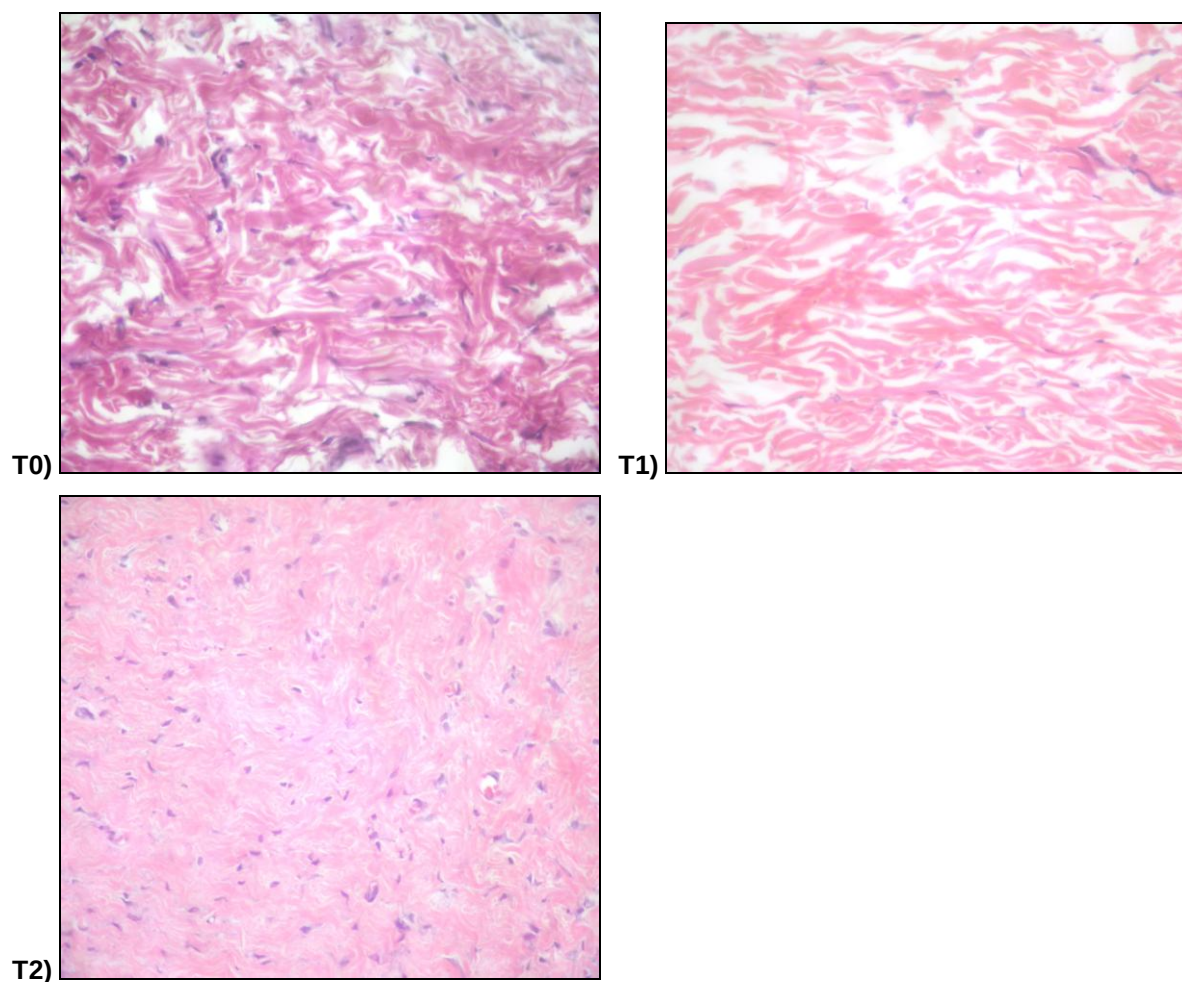


Figura – 5. Avaliação de colágeno no grupo que recebeu injeção de CO₂ (G2), nos três momentos analisados: início (T0), ponto médio (T1) e final (T2) do tratamento. Hematoxilina-eosina (400X).

5 RESULTADOS

Nos oito animais submetidos a LIP (G1), ao se compararem as proliferações de fibroblastos ocorridas nos momentos de início (T0), meio (T1) e fim (T2) de tratamento, constatou-se a presença de pele não tratada, classificada como de grau 0 (100% dos animais), no momento inicial. Na metade do tratamento (T1), cinco dos oito animais (62,5%) apresentaram graus I e III de proliferação de fibroblastos. No final do tratamento (T2), seis dos oito animais (75%) apresentaram graus I e II de proliferação. Essa evolução da proliferação histológica de fibroblastos foi estatisticamente significativa ao se compararem o início e o fim do tratamento (T0 vs. T2, $p < 0,05$, Tabela 2).

Para os controles de pele não tratada (T0), o grau 0 de proliferação de fibroblastos foi também observado em 100% dos animais que receberam injeções intradérmicas de CO₂. Após 4 semanas de tratamento (T1), nenhum dos animais desse grupo apresentou alterações no grau histológico, pois todos mantiveram 100% de grau 0 de proliferação de fibroblastos. No entanto, no final do tratamento (T2) todos os animais (100%) apresentaram graus I e II de proliferação de fibroblastos. Essa evolução da proliferação histológica de fibroblastos foi estatisticamente significativa no grupo CO₂ ao se compararem o início e o fim do tratamento (T0 vs. T2, $p < 0,001$, Tabela 2).

No que diz respeito à proliferação de colágeno, ambos os grupos exibiram grau 0 de proliferação na pele de controle não tratada (T0), em 100% das amostras. Na metade do tratamento (T1), 87,5% (7/8) dos animais no grupo LIP (G1) mostraram proliferações de colágeno de grau I e grau II, e 87,5% (7/8) do grupo CO₂ (G2) exibiram grau histológico I de proliferação de colágeno. Ao final do tratamento (T2) no grupo LIP, 62,5% (5/8) dos animais mostraram proliferações de colágeno de grau II e grau III, e 25% (2/8) exibiram grau histológico I de proliferação de colágeno. No grupo CO₂, 50% (4/8) apresentaram proliferação de grau I e 50% (4/8) proliferação de colágeno de grau II após o tratamento (Tabela 2).

Houve diferença estatisticamente significativa no grau de proliferação de colágeno entre os momentos T0 e T2, tanto para os animais do grupo LIP tratados (T0 vs. T2, $p <$

0,001) quanto para os do grupo CO₂ (T0 vs. T2, $p < 0,001$). Esses dados estão resumidos na Tabela 2.

Quando se compara os animais submetidos à LIP e CO₂ em relação ao meio (T1) e final (T2) do tratamento, verifica-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os métodos de tratamento estudados, em relação à proliferação fibroblástica e de colágeno, conforme exposto nas Tabelas 3 e 4.

Tabela – 2. Expressão da proliferação fibroblástica e de colágeno nos três momentos analisados (T0, T1 e T2) considerando os dois grupos de estudo isoladamente.

	Tempo 0 – T0						Tempo 1 – T1						Tempo 2 – T2					
	(Início Tratamento)						(4 semanas de tratamento)						(8 semanas de tratamento)					
	Grau 0 0-5% Lâmina	Grau I 5-25% Lâmina	Grau II 25-50% Lâmina	Grau III > 50% Lâmina	N	(%)	Grau 0 0-5% Lâmina	Grau I 5-25% Lâmina	Grau II 25-50% Lâmina	Grau III > 50% Lâmina	N	(%)	Grau 0 0-5% Lâmina	Grau I 5-25% Lâmina	Grau II 25-50% Lâmina	Grau III > 50% Lâmina	N	(%)
Grupo Luz Pulsada – G1 (N= 8 animais)																		
Proliferação Fibroblástica	8 (100%)	-	-	-	3	(37,5%)	3 (37,5%)	2 (25%)	-	3 (37,5%)	2 (25%)	3 (37,5%)	2 (25%)	3 (37,5%)	3 (37,5%)	-	3 (37,5%)	-
Proliferação Colágeno	8 (100%)	-	-	-	1	(12,5%)	1 (12,5%)	5 (62,5%)	2 (25%)	-	1 (12,5%)	2 (25%)	1 (12,5%)	2 (25%)	3 (37,5%)	2 (25%)	3 (37,5%)	2 (25%)
Grupo Injeção CO2 – G2 (N= 8 animais)																		
Proliferação Fibroblástica	8 (100%)	-	-	-	8	(100%)	8 (100%)	-	-	-	-	-	-	5 (62,5%)	3 (37,5%)	-	5 (62,5%)	-
Proliferação Colágeno	8 (100%)	-	-	-	1	(12,5%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)	-	-	-	-	-	4 (50%)	4 (50%)	-	4 (50%)	-

Comparações utilizando o teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn:

G1 – Luz Pulsada (Proliferação Fibroblástica) – T0 vs T1 p<0,05
T0 vs T2 p<0,05
T1 vs T2 p>0,05

G2 – CO2 (Proliferação Fibroblástica) – T0 vs T1 p>0,05
T0 vs T2 p<0,001
T1 vs T2 p<0,001

G1 – Luz Pulsada (Proliferação Colágeno) – T0 vs T1 p<0,05
T0 vs T2 p<0,001
T1 vs T2 p>0,05

G2 – CO2 (Proliferação de Colágeno) – T0 vs T1 p<0,05
T0 vs T2 p<0,001
T1 vs T2 p>0,05

Tabela – 3. Comparação dos animais submetidos à Luz Intensa Pulsada e Injeção Intradérmica de CO₂ quanto aos Graus de Proliferação Fibroblástica no meio (T1) e final (T2) do tratamento.

Proliferação Fibroblástica	Meio do Tratamento (T1)		Final do Tratamento (T2)	
	Grupo Luz Pulsada N (%)	Grupo CO ₂ N (%)	Grupo Luz Pulsada N (%)	Grupo CO ₂ N (%)
Grau 0	3 (37,5%)	8 (100%)	2 (25%)	-
Grau I	2 (25%)	-	3 (37,5%)	5 (62,5%)
Grau II	-	-	3 (37,5%)	3 (37,5%)
Grau III	3 (37,5%)	-	-	-
Total	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
p=0,20; IC95% 0,19-0,76			p=1,3; IC95% 0,36-2,75	

Comparações utilizando o Teste Exato de Fisher

Tabela – 4. Comparação dos animais submetidos à Luz Intensa Pulsada e Injeção Intradérmica de CO₂ quanto aos Graus de Proliferação de Colágeno no meio (T1) e final (T2) do tratamento.

Proliferação Colágeno	Meio do Tratamento (T1)		Final do Tratamento (T2)	
	Grupo Luz Pulsada N (%)	Grupo CO ₂ N (%)	Grupo Luz Pulsada N (%)	Grupo CO ₂ N (%)
Grau 0	1 (12,5%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	-
Grau I	5 (62,5%)	7 (87,5%)	2 (25%)	4 (50%)
Grau II	2 (25%)	-	3 (37,5%)	4 (50%)
Grau III	-	-	2 (25%)	-
Total	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
p=0,46; IC95% 0,23-0,78			p=1,0; IC95% 0,27-2,17	

Comparações utilizando o Teste Exato de Fisher

6 DISCUSSÃO

A Luz Intensa Pulsada é fonte de energia luminosa que tem muitas aplicações. Compõe-se de diferentes comprimentos de onda, ou seja, da totalidade ou parte do espectro da luz, enquanto o *laser* tem comprimento de onda único (Catorze, 2009). A LIP alcança a superfície da pele e permite, através do princípio da fototermólise seletiva, corrigir várias lesões da pele e marcas faciais decorrentes de fotoenvelhecimento, assim como manchas e problemas de pigmentação (Patriota, Rodrigues e Cucé, 2011).

Como a LIP não se compõe de luz coerente, pode interagir com uma variedade de cromóforos, e sua energia pode por isso dissipar-se mais rapidamente. Assim, o aquecimento causado por LIP é mais superficial, em comparação com o uso similar de *lasers*. Estudo clínico demonstra que a utilização de LIP para fotorejuvenecimento apresenta avaliação positiva sob a perspectiva de pacientes tratados (Laury, 2003).

Outras casuísticas clínicas avaliaram a ação da LIP na estimulação da proliferação de colágeno em pele humana danificada pelo sol e concluíram que, além da deposição de colágeno, a melhora clínica observada após o tratamento pode ser secundária à redução do infiltrado inflamatório perifolicular (Prieto *et al.*, 2005; Prieto, Zhang e Sadick, 2005). Outros estudos indicam algum grau de presença de colágeno recém-formado na derme superior após tratamento com LIP, sugerindo a possibilidade de que os fibroblastos dérmicos estimulados sejam fonte do aumento na expressão de colágeno (Goldberg, 2000; Goldberg e Silapunt, 2000).

Os resultados do presente estudo indicam que oito semanas após a aplicação de LIP uma vez a cada duas semanas em pele de ratas Wistar, houve diferenças significativas na proliferação de fibroblastos e de colágeno na pele dos animais estudados. Os momentos de maior proliferação de fibroblastos coincidiram com os períodos de maior produção de colágeno. Esses resultados respaldam a hipótese de que a fonte do aumento na expressão de colágeno é a estimulação de fibroblastos dérmicos, provavelmente devido ao princípio de fototermólise seletiva. O conceito subjacente é que a absorção de luz pela água provoca um efeito fototérmico e consequente resposta inflamatória que estimula a atividade dos fibroblastos (Catorze, 2009; Goldberg, 2013).

Quanto à injeção intradérmica de CO₂, a hipótese de ação é que esse gás, quando aplicado por via subcutânea, resulta em destruição mecânica de células adiposas. Além disso, o CO₂ promove vasodilatação local e consequente aumento na oxigenação tecidual e, quando aplicado à camada mais superficial da pele, estimula os fibroblastos e a síntese de colágeno e elastina. Esses processos contribuem para a retração da pele e resultam em seu rejuvenescimento, com redução da flacidez (Brandi *et al.*, 2001; Brockow *et al.*, 2001; Brandi *et al.*, 2004; Ferreira, Haddad e Tavares, 2008; Sönmez *et al.*, 2009; Brandi *et al.*, 2010; Brandi *et al.*, 2012).

Com o avanço da idade, a pele sofre alterações prontamente reconhecidas, à medida que o aparecimento de rugas, a atrofia, a ptose e a flacidez alteram sua aparência. Modificações no tecido conjuntivo, o qual fornece a base estrutural para a epiderme, evidenciam essas mudanças externamente, refletidas no extrato córneo (Oriá *et al.*, 2003). As modificações no colágeno ao longo da vida proporcionam base morfológica substancial para a compreensão das alterações bioquímicas e biomecânicas que ocorrem na pele com o avançar da idade (Oriá *et al.*, 2003). Assim, a injeção intradérmica de CO₂ proporciona maior taxa de intercâmbio (aumento do fluxo sanguíneo) e melhora a oxigenação tecidual, podendo, além disso, estimular os fibroblastos dérmicos e incrementar a síntese de colágeno e elastina (Brandi *et al.*, 2001; Brockow *et al.*, 2001; Brandi *et al.*, 2004; Sönmez *et al.*, 2009; Brandi *et al.*, 2010; Brandi *et al.*, 2012).

Na amostra de animais aqui estudada, a injeção intradérmica de CO₂ propiciou proliferação fibroblástica e consequente aumento de fibras colágenas nas lâminas avaliadas. Em trabalho com metodologia semelhante ao presente estudo, o uso de injeção de CO₂ na pele de dez ratos Wistar machos causou aumento acentuado do colágeno após infusão de dióxido de carbono na pele desses animais. Além disso, as injeções intradérmicas pareceram mais eficazes que as subcutâneas na indução do neocolágeno (Ferreira, Haddad e Tavares, 2008).

Com base nos estudos anteriores, o presente trabalho avaliou o estímulo da proliferação de fibroblastos e de colágeno decorrente da aplicação de LIP e CO₂ intradérmico na pele de 16 ratas. Apesar de ter havido proliferação fibroblástica e de colágeno nos grupos submetidos tanto à LIP quanto à injeção intradérmica de CO₂, não

foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas nestas proliferações quando se comparou as técnicas LIP e CO₂ nos tempos T1 e T2.

Deve-se ressaltar que a proliferação de colágeno é um processo dinâmico e depende principalmente da estimulação dos fibroblastos. Assim, é possível que um período mais longo de exposição aos tratamentos propostos teria ocasionado maior ativação de fibroblastos dérmicos e proliferação ainda maior de colágeno. Também, seria possível que um tempo maior de tratamento pudesse estabelecer qual dos dois métodos avaliados teria melhor desempenho frente às proliferações estudadas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

■ Grupo Luz Intensa Pulsada (G1):

- ✓ Houve proliferação significativa de fibroblastos e de colágeno na pele dos animais estudados;
- ✓ A proliferação de fibroblastos e colágeno foi significativa entre os tempos T0 e T1;
- ✓ Não foi significativa a proliferação de fibroblastos e colágeno entre os tempos T1 e T2;
- ✓ A proliferação de fibroblastos e colágeno foi significativa entre os tempos T0 e T2, sendo mais intensa a proliferação de colágeno ($p < 0,001$) que de fibroblastos ($p < 0,05$);

■ Grupo Injeção Intradérmica de CO₂ (G2):

- ✓ Houve proliferação significativa de fibroblastos e de colágeno na pele dos animais estudados;
- ✓ Apenas a proliferação de colágeno foi significativa entre os tempos T0 e T1;
- ✓ Apenas a proliferação de fibroblastos foi significativa entre os tempos T1 e T2;
- ✓ A proliferação de fibroblastos e colágeno foi significativa entre os tempos T0 e T2;

- Não se observou diferença estatisticamente significativa para o meio do tratamento (T1) utilizando os dois métodos estudados (LIP e CO₂) em relação à proliferação fibroblástica e de colágeno;

- Também não se observou diferença estatisticamente significativa para o final do tratamento (T2) utilizando os dois métodos estudados (LIP e CO₂) em relação à proliferação fibroblástica e de colágeno;

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa permitem concluir que tanto a injeção intradérmica de CO₂ quanto a LIP promovem proliferação de fibroblastos e de colágeno na pele de animais, não havendo superioridade de um método em relação ao outro. No entanto, outras questões emergem desses resultados:

- Poderiam vários estímulos mecânicos ou traumáticos (punções, calor local) também estimular a proliferação de fibroblastos e colágeno?
- Caso não se realizasse a eutanásia dos animais, e após um período de tempo sem estímulo algum, teria havido maior proliferação de fibroblastos e/ou colágeno?
- Podem os resultados observados em pele de ratas serem repetidos em pele humana?

Devido à escassez de dados (especialmente de estudos experimentais) publicados em revistas médicas sobre este tema, o presente estudo representa um estímulo para outras pesquisas focando rejuvenescimento e dermatopatologia. Assim, tornam-se necessários mais estudos nesta área, que utilizem metodologias semelhantes.

A dermatologia oferece possibilidades ilimitadas no uso de procedimentos de rejuvenescimento da pele. A coleta de evidências científicas mostra-se como o melhor caminho para se estabelecer novos métodos de dermatocosmiatria.

REFERÊNCIAS

ACLAM. ACLAM position statement on animal experimentation. **Contemp Top Lab Anim Sci**, v. 42, n. 6, p. 118, Nov 2003. ISSN 1060-0558. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661651> >.

ARAF, D. et al. Homologous scleral and dura mater grafts in rabbit eyes. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 70, n. 6, p. 981-987, 12/2007 2007. ISSN 0004-2749. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-27492007000600018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >

ARTWOHL, J. et al. Report of the ACLAM Task Force on Rodent Euthanasia. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 45, n. 1, p. 98-105, Jan 2006. ISSN 1559-6109. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16548095> >.

BATISTELA, M. A.; CHORILI, M.; LEONARDI, G. Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 2, p. 59-62, 2007.

BERRY, D. P. et al. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts. **Plast Reconstr Surg**, v. 102, n. 1, p. 124-31; discussion 132-4, Jul 1998. ISSN 0032-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9655417> >.

BRANDI, C. et al. Carbon dioxide: maybe not the only one but an efficient and secure gas for treating local adiposities. **Aesthetic Plast Surg**, v. 36, n. 1, p. 218-9, Feb 2012. ISSN 1432-5241. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21656063> >.Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00266-011-9758-0> >.

_____. Carbon dioxide therapy in the treatment of localized adiposities: clinical study and histopathological correlations. **Aesthetic Plast Surg**, v. 25, n. 3, p. 170-4, 2001 May-Jun 2001. ISSN 0364-216X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426306> >.Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002660010116> >.

_____. Carbon dioxide therapy: effects on skin irregularity and its use as a complement to liposuction. **Aesthetic Plast Surg**, v. 28, n. 4, p. 222-5, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 0364-216X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599534> >.Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00266-004-2068-z> >.

_____. The role of carbon dioxide therapy in the treatment of chronic wounds. **In Vivo**, v. 24, n. 2, p. 223-6, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 0258-851X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363999> >.

BROCKOW, T. et al. Analgesic effectiveness of subcutaneous carbon-dioxide insufflations as an adjunct treatment in patients with non-specific neck or low

back pain. **Complement Ther Med**, v. 9, n. 2, p. 68-76, Jun 2001. ISSN 0965-2299. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11444885> >.

CATORZE, M. G. Laser: bases and use in dermatology. **Med Cutan Iber Lat Am**, v. 37, n. 1, p. 5-27, 2009. Disponível em: < <http://www.medcutan-ila.org/articulos/2009/1/pdf/mc371b.pdf> >.

CAVAZANA, W. C. et al. Sugar (sucrose) and medium chain triglycerides with essential fatty acids in the treatment of wounds: an experimental study in rats. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 229-236, 07/2009 2009. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0365-05962009000300003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >.

CHU, D. H. Development and Structure of Skin. In: GOLDSMITH, L.; KATZ, S., et al (Ed.). **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. New York: Mc Graw Hill, v.1, 2012. cap. 7, ISBN 978-0-07-166904-7.

DOMINGOS, A. L. et al. Use of a latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: biocompatibility, clinical and histological outcomes. **Int Braz J Urol**, v. 35, n. 2, p. 217-24; author reply 225-6, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 1677-6119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19409126> >.

FERREIRA, J. C.; HADDAD, A.; TAVARES, S. A. Increase in collagen turnover induced by intradermal injection of carbon dioxide in rats. **J Drugs Dermatol**, v. 7, n. 3, p. 201-6, Mar 2008. ISSN 1545-9616. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18380201> >.

FIELD, K. et al. Medical records for animals used in research, teaching, and testing: public statement from the American College of Laboratory Animal Medicine. **ILAR J**, v. 48, n. 1, p. 37-41, 2007. ISSN 1084-2020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170494> >.

GOLDBERG, D. J. New collagen formation after dermal remodeling with an intense pulsed light source. **J Cutan Laser Ther**, v. 2, n. 2, p. 59-61, Jun 2000. ISSN 1462-883X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11360318> >.

_____. Energy-based technologies. **J Cosmet Laser Ther**, v. 15, n. 3, p. 119, Jun 2013. ISSN 1476-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23705877> >. Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14764172.2013.804642> >.

GOLDBERG, D. J.; CUTLER, K. B. Nonablative treatment of rhytids with intense pulsed light. **Lasers Surg Med**, v. 26, n. 2, p. 196-200, 2000. ISSN 0196-8092. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685092> > [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-9101\(2000\)26:2%3C196::AID-LSM10%3E3.0.CO](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9101(2000)26:2%3C196::AID-LSM10%3E3.0.CO)

GOLDBERG, D. J.; SILAPUNT, S. Q-switched Nd:YAG laser: rhytid improvement by non-ablative dermal remodeling. **J Cutan Laser Ther**, v. 2, n. 3, p. 157-60, Sep 2000. ISSN 1462-883X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11360334> >.

GONÇALVES, J. J. S. et al. Semiquantitative analysis of surgical biopsies of different lung lobes of patients with usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. **J. bras. pneumol.**, v. 35, n. 7, p. 676-682, 07/2009 2009. ISSN 1806-3713. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1806-37132009000700009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >.

HARTMANN, B. R.; BASSENGE, E.; HARTMANN, M. Effects of serial percutaneous application of carbon dioxide in intermittent claudication: results of a controlled trial. **Angiology**, v. 48, n. 11, p. 957-63, Nov 1997. ISSN 0003-3197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9373047> >.

HARTMANN, B. R.; BASSENGE, E.; PITTLER, M. Effect of carbon dioxide-enriched water and fresh water on the cutaneous microcirculation and oxygen tension in the skin of the foot. **Angiology**, v. 48, n. 4, p. 337-43, Apr 1997. ISSN 0003-3197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9112881> >.

HYDE, D. M. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Quantitative assessment of lung pathology. Comparison of a semiquantitative and a morphometric histopathologic scoring system. **Am Rev Respir Dis**, v. 146, n. 4, p. 1042-7, Oct 1992. ISSN 0003-0805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1416394> >.

KOHN, D. F. et al. Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 46, n. 2, p. 97-108, Mar 2007. ISSN 1559-6109. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17427317> >.

KUMMER-KLOESS, D. et al. Angiography during interventional procedures with carbon dioxide (CO₂) (carbo-angiography) in patients with increased contrast media risk. **Zentralbl Chir**, v. 122, n. 9, p. 725-9, 1997. ISSN 0044-409X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9454478> >.

LAURY, D. Intense pulsed light technology and its improvement on skin aging from the patients' perspective using photorejuvenation parameters. **Dermatol Online J**, v. 9, n. 1, p. 5, Feb 2003. ISSN 1087-2108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12639463> >.

MAEDA, M. D. F. Y. et al. Vascularization in hepatic cirrhosis based on autopsies. **Arq. Gastroenterol.**, v. 45, n. 1, p. 38-45, 03/2008 2008. ISSN 0004-2803. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-28032008000100008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >.

ORIÁ, R. B. et al. Study of age-related changes in human skin, using methods of histo-morphometry and autofluorescence. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 425-434, 08/2003 2003. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0365-05962003000400004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >.Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962003000400004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >.Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0365-05962003000400004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >.Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abd/v78n4/16901.pdf> >.

PATRIOTA, R. C. R.; RODRIGUES, C. J.; CUCÉ, L. C. Intense pulsed light in photoaging: clinical, histopathological and immunohistochemical evaluation. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 6, p. 1129-1133, 12/2011 2011. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0365-05962011000600010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >

PRIETO, V. G. et al. Effects of intense pulsed light and the 1,064 nm Nd:YAG laser on sun-damaged human skin: histologic and immunohistochemical analysis. **Dermatol Surg**, v. 31, n. 5, p. 522-5, May 2005. ISSN 1076-0512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962734> >.

PRIETO, V. G.; ZHANG, P. S.; SADICK, N. S. Evaluation of pulsed light and radiofrequency combined for the treatment of acne vulgaris with histologic analysis of facial skin biopsies. **J Cosmet Laser Ther**, v. 7, n. 2, p. 63-8, Jun 2005. ISSN 1476-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537210> >.Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/14764170500231848> >.

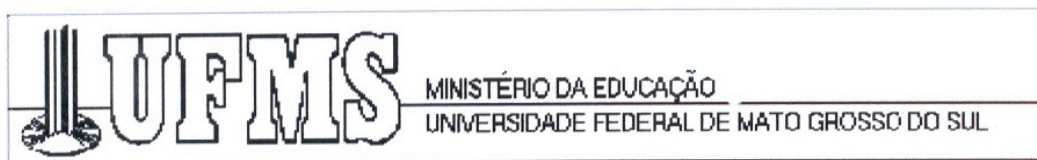
SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Pele Normal: Anatomia e Fisiologia. In: SAMPAIO, S. A. P. e RIVITTI, E. A. (Ed.). **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2007. cap. 1, p.1-37. ISBN 978-85-367-0063-7.

SÖNMEZ, A. et al. Carbon dioxide therapy increases capillary formation on random pedicled skin flaps in the rat. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 62, n. 7, p. e236-7, Jul 2009. ISSN 1878-0539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362526> >.

ZWAAN, M. et al. Carbon dioxide as an alternative contrast medium in peripheral angiography. **Rofo**, v. 164, n. 5, p. 445-8, May 1996. ISSN 1438-9029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8634409> >.

_____. The angiography of kidney transplant arteries using carbon dioxide. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 122, n. 38, p. 1133-6, Sep 1997. ISSN 0012-0472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9378023> >.

ANEXO
(APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS)



C E R T I F I C A D O

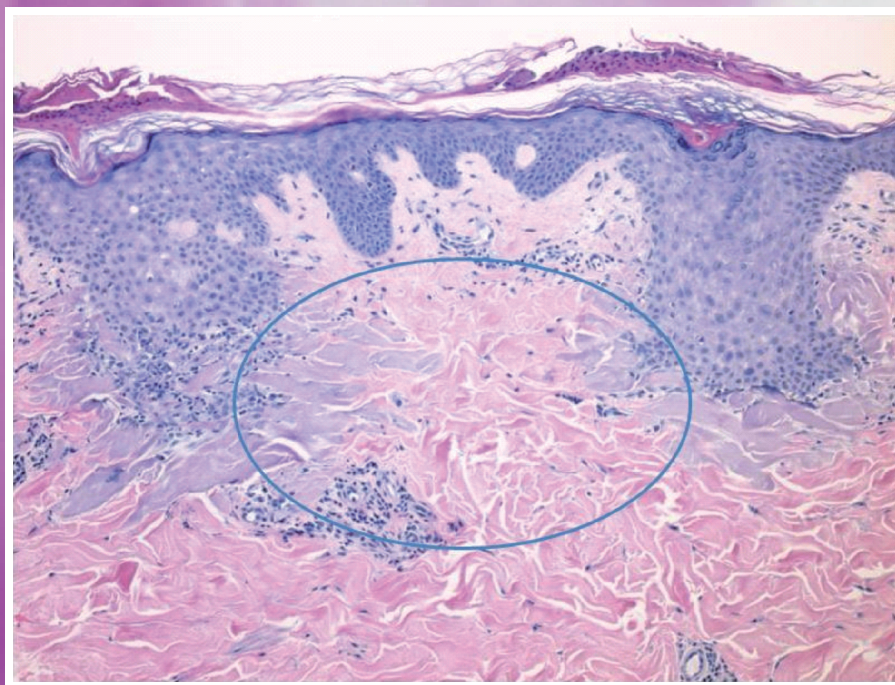
Certificamos que o Protocolo nº 241/2009 do Pesquisador Alexandre Nakao Odashiro, referente ao projeto de pesquisa **“Efeito da luz intensa pulsada e da carboxiterpia sobre a proliferação de colágeno na pele de ratos Wistar”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 10 de dezembro de 2009.

Campo Grande (MS), 10 de dezembro de 2009.


Dr.ª Maria Araújo Teixeira
Presidente da CEUA

APÊNDICE
(TRABALHO PUBLICADO)

Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications



ISSN 2161-4105



Journal Editorial Board

ISSN: 2161-4105 (Print), 2161-4512 (Online)

<http://www.SciRP.org/journal/jcdsa>

Editor in Chief

Dr. Bouzid Mena

Fluorotronics, Inc., USA

Editorial Board

Dr. Iqbal Bukhari

King Faisal University, Saudi Arabia

Dr. Burçe Can

Istanbul Medeniyet University, Turkey

Dr. Peter Clarys

Vrije Universiteit Brussel, Belgium

Prof. Aylin Türel Ermertcan

Celal Bayar University, Turkey

Dr. Alireza Firooz

Tehran University of Medical Sciences, Iran

Prof. Jane M. Grants-Kels

University of Connecticut Health Center, USA

Prof. Kamer Gündüz

Celal Bayar University, Turkey

Dr. Stephane Heas

University of Rennes, France

Prof. Paul J. Higgins

Albany Medical College, USA

Prof. Hironobu Ihn

Kumamoto University, Japan

Prof. Arie Ingber

Hebrew University, Israel

Prof. Shigeki Inui

Osaka University, Japan

Dr. Ander Izeta

Instituto Biodonostia, Spain

Dr. Kenji Kabashima

Kyoto University Graduate School of Medicine, Japan

Prof. Masashi Kato

Chubu University, Japan

Prof. Akira Kawada

Kinki University, Japan

Dr. Beomjoon Kim

Chung-Ang University, South Korea

Prof. Arnold W. Klein

University of California, USA

Dr. George Kroumpouzou

The Warren Alpert Medical School of Brown University, Greece

Prof. Ichiro Kurokawa

Meiwa Hospital, Japan

Dr. Eve J. Lowenstein

UNY Health Science Center at Brooklyn, USA

Dr. Farid Mena

Department of Life and Pharmaceutical Sciences Fluorotronics, Inc., USA

Dr. Adam Reich

Wroclaw Medical University, Poland

Prof. Cassian Sitaru

University of Freiburg, Germany

Dr. Cheng Tan

First Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, China

Prof. J.P. Wietze van der Veen

Academic Medical Centre University of Amsterdam, Netherlands

Dr. Jeffrey M. Weinberg

Columbia University, USA

Prof. Tae-Jin Yoon

Gyeongsang National University Hospital, South Korea

TABLE OF CONTENTS

Volume 2 Number 3

September 2012

Treatment of Wrinkles and Acne Scars Using the TriFractional, a Novel Fractional Radiofrequency Technology—Clinical and Histological Results	
A. Levenberg, A. Gat, M. C. Branchet, S. Boisnic.....	117
Realization Feature of Mesenchymal Dermal Cells Tissue Engineering Construction Response in Granulating Wound Transplantation in Relation with Time-Frame	
E. Petersen.....	126
Atrophoderma Vermiculata Successfully Treated by 595 nm Dye Laser and Carbon Dioxide Laser	
H. Takahashi, Y. Hashimoto, M. Honma, A. Ishida-Yamamoto, H. Iizuka.....	130
Feasibility, Tolerability, Safety and Efficacy of a Pantothenic Acid Based Dietary Supplement in Subjects with Mild to Moderate Facial Acne Blemishes	
J. L. Capodice.....	132
A Unique Case? Darier's Disease Presented as Porcupine-Like Appearance and the Observation on Acitretin Treatment	
X.-B. Zhang, C.-X. Li, X.-M. Li, Y.-Q. He, X. Xu, Q. Luo.....	136
Scleredema Diabeticorum in a Patient with the Normal Range of the Hemoglobin A1c Level and Impaired Glucose Tolerance	
H. Matsuda, N. Oiso, Y. Fujita, H. Ikegami, A. Kawada.....	141
Fractional Ablative Radio-Frequency Resurfacing in Asian and Caucasian Skin: A Novel Method for Deep Radiofrequency Fractional Skin Rejuvenation	
R. S. Mulholland, D. H. Ahn, M. Kreindel, M. Paul.....	144
The Melanin Biosynthesis Stimulating Compounds Isolated from the Fruiting Bodies of <i>Pleurotus citrinopileatus</i>	
T.-X. Meng, C.-F. Zhang, T. Miyamoto, H. Ishikawa, K. Shimizu, S. Ohga, R. Kondo.....	151
Hair Dyeing by Using Catechinone Obtained from (+)-Catechin	
Y. Hidekazu, T. Akiko, I. Kazue, U. Masahisa, U. Hiroshi.....	158
Semi-Quantitative Histological Analysis of the Effect of Intense Pulsed Light (IPL) and Carbon Dioxide (CO₂) Intradermic Injection on Fibroblast and Collagen Proliferation in the Skin of Wistar Rats	
T. L. Maia-Figueiró, A. N. Odashiro, G. P. de Menezes, L. R. Coelho, I. Breda, B. A. de Souza, E. A. Figueiró-Filho.....	164
Re-Evaluation of Acquired Epidermodysplasia Verruciformis in Kidney Transplant Recipients	
K. E. Sharquie, A. A. Noaimi, A. A. Al-Jobori.....	174
Treatment of Acne Vulgaris with 5-Alpha Avocuta Cream 2% in Comparison with Tretinoin Cream 0.025% (Single Blind Comparative Study)	
K. E. Sharquie, H. R. Al-Hamamy, A. A. Noaimi, A. F. Tahir.....	179
Sensitive Skin in China	
M. A. Farage, C. P. Mandl, E. Berardesca, H. I. Maibach.....	184
Lifa Disease: Frictional Dermal Melanosis over Bony Prominences (Clinicopathological Study)	
K. E. Sharquie, M. A. Al-Dhalimi, A. A. Noaimi, H. A. Al-Sultany.....	196

Utilizing Free Skin Grafts in the Repair of Surgical Wounds	
M. C. Y. Heng.....	201
Dermoscopic Appearances in the Superficial and Deep Type of Infantile Hemangioma	
M. Miyake, N. Oiso, A. Kawada.....	212
Penile Epidermoid Cyst Consisted of Multiple Foci: A Case Report	
A. Okumura, K. Takagawa, H. Fuse.....	214
Allergic Contact Dermatitis from Diethyl Sebacate in a Topical Antimycotic Medicament	
A. Hirao, N. Oiso, M. Hama, N. Higashimori, Y. Tatsumi, A. Kawada.....	216
A Clinico-Pathological Study of Poly Morphous Light Eruption	
P. Pullabatl, K. P. Kaliyaperumal, U. Sidhu.....	219
Qualitative and Quantitative Estimation of Hydroquinone in Skin Whitening Cosmetics	
S. Siddique, Z. Parveen, Z. Ali, M. Zaheer.....	224
Mycosis Fungoides: Epidemiology in Isfahan, Iran	
F. F. Naeini, J. Najafian, M. Salehi, Z. Azimi, P. Rajabi.....	229
Post Radiotherapy “Isolated LP of the Lips” in a Non-Hodgkin Lymphoma Patient: A Possible Relation	
H. H. Shelleh, H. S. Al Hateeti, H. A. Al Fahhad, S. A. Khan, L. A. Khan, K. Bahamdan.....	234

The figure on the front cover is from the article published in *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 2012, Vol. 2, No. 3, pp. 144-150 by R. Stephen Mulholland, *et al.*

Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications (JCDSA)

Journal Information

SUBSCRIPTIONS

The Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications (Online at Scientific Research Publishing, www.SciRP.org) is published quarterly by Scientific Research Publishing, Inc., USA.

Subscription rates:

Print: \$39 per issue.

To subscribe, please contact Journals Subscriptions Department, E-mail: sub@scirp.org

SERVICES

Advertisements

Advertisement Sales Department, E-mail: service@scirp.org

Reprints (minimum quantity 100 copies)

Reprints Co-ordinator, Scientific Research Publishing, Inc., USA.

E-mail: sub@scirp.org

COPYRIGHT

Copyright©2012 Scientific Research Publishing, Inc.

All Rights Reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, scanning or otherwise, except as described below, without the permission in writing of the Publisher.

Copying of articles is not permitted except for personal and internal use, to the extent permitted by national copyright law, or under the terms of a license issued by the national Reproduction Rights Organization.

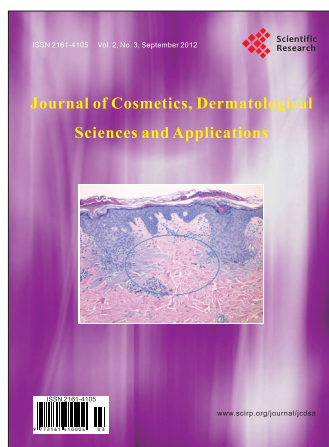
Requests for permission for other kinds of copying, such as copying for general distribution, for advertising or promotional purposes, for creating new collective works or for resale, and other enquiries should be addressed to the Publisher.

Statements and opinions expressed in the articles and communications are those of the individual contributors and not the statements and opinion of Scientific Research Publishing, Inc. We assume no responsibility or liability for any damage or injury to persons or property arising out of the use of any materials, instructions, methods or ideas contained herein. We expressly disclaim any implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose. If expert assistance is required, the services of a competent professional person should be sought.

PRODUCTION INFORMATION

For manuscripts that have been accepted for publication, please contact:

E-mail: jcdsa@scirp.org



Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications (JCDSA)

ISSN 2161-4105 (Print) ISSN 2161-4512 (Online)
<http://www.SciRP.org/journal/jcdsa>

Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications is an open-access, peer-reviewed journal describing scientific and technological advances that cover the basic sciences, engineering aspects and applied technology of cosmetics, toiletries, perfumery and related field as well as areas.

Editor in Chief

Dr. Bouzid Menaa

Fluorotronics, Inc., USA

Subject Coverage

The journal publishes original papers including but not limited to the following fields:

- Acne treatment
- Aesthetic treatments
- Analytical chemistry
- Cosmetic chemistry
- Dentistry
- Dermatology
- Dermatopathology
- Food, nutrition and anti-aging
- Hair conservation and restoration
- Human safety testing of skin, hair and oral products
- Laser treatment
- Olfactive research
- Photodamage and photoprotection, dermopharmacy, new developments in olfactive research
- Physical chemistry
- Plastic surgery
- Rejuvenation
- Skin physiology
- Societal issues
- Technology of emulsion and dispersed systems
- Theory and application of new materials and molecules
- Transdermal drug delivery systems

We are also interested in: 1) Short reports—2-5 page papers where an author can either present an idea with theoretical background but has not yet completed the research needed for a complete paper or preliminary data; 2) Book reviews—Comments and critiques.

Notes for Intending Authors

Submitted papers should not have been previously published nor be currently under consideration for publication elsewhere. Paper submission will be handled electronically through the website. All papers are refereed through a peer review process. For more details about the submissions, please access the website.

Website and E-Mail

<http://www.scirp.org/journal/jcdsa>

E-mail: jcdsa@scirp.org

Semi-Quantitative Histological Analysis of the Effect of Intense Pulsed Light (IPL) and Carbon Dioxide (CO₂) Intradermic Injection on Fibroblast and Collagen Proliferation in the Skin of Wistar Rats

Tamara Lemos Maia-Figueiró¹, Alexandre Nakao Odashiro², Giovanna Padoa de Menezes³, Lilian Rezende Coelho⁴, Ili Breda⁴, Bruno Areco de Souza⁴, Ernesto Antonio Figueiró-Filho¹

¹Post-Graduation Program, Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil; ²Hospital Infant-Jesus of University Laval, Department of Pathology, Quebec, Canada; ³Medical Residents, University Hospital, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil; ⁴Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil.

Email: tamarafigueiro@uol.com.br

Received July 28th, 2012; revised August 26th, 2012; accepted September 9th, 2012

ABSTRACT

Background: In recent years, so-called “non-ablative rejuvenation” has been carried out with the use of lasers or intense pulsed light (IPL) to stimulate collagen production by dermal fibroblasts. Intradermal infusion of CO₂ stimulates fibroblasts and the synthesis of collagen and elastin, contributing to the retraction of the skin and tissue rejuvenation. **Objectives:** To evaluate the effects of IPL and the intradermal infusion of CO₂ on fibroblast proliferation and collagen in the skin of female rats. **Methods:** Sixteen adult female Wistar rats were divided into two groups of eight animals. Group 1 underwent IPL and group 2 underwent intradermal CO₂ infusion. There was a total of 8 weeks of treatment. We conducted a punch in each animal before any procedure (T0), another punch in the middle of treatment at 4 weeks post-procedure (T1) and a punch at the end of treatment at 8 weeks post-procedure (T2). The cells involved in inflammation, fibrosis and vascularization of the injured tissue by histopathology were analyzed. **Results:** There was statistically significant fibroblast proliferation and collagen proliferation noted when analyzing all 16 animals together and also when considering the two study groups separately. In both groups, the greatest proliferation of fibroblasts coincided with periods of increased collagen production. **Conclusion:** Both IPL and intradermal CO₂ infusion stimulated fibroblast and collagen proliferation in the skin of the rats studied.

Keywords: Collagen; Cosmetic Dermatology; Rejuvenation; Pulsed Light; Intense Pulsed Light; Intradermal Injection

1. Introduction

Collagen is the most abundant protein in the human body and is synthesized by several cell types, including fibroblasts. As people age, there is a reduction of the carrying capacity of the skin and subsequent atrophy and loss of elasticity secondary to the reduction in collagen production [1,2]. Various proposed techniques for the rejuvenation of skin involve increasing the proliferation of collagen via laser-based methods, pulsed light and intradermal injection of CO₂ [3,4].

Intense pulsed light (IPL) produces a non-coherent light beam that has a radiation spectrum that covers many wavelengths simultaneously. A polychromatic beam is captured by different chromophores associated with different wavelengths or colors. This, together with the other aspects mentioned, increases the therapeutic spec-

trum covered by IPL [5-7]. The non-ablative photorejuvenation with intense pulsed light works causing reversible thermal damage of collagen by light penetration into the dermis and direct heating of these structures, sparing the epidermis [5-7]. Thus, the contraction of collagen fibers and proper remodeling of the fibers after the inflammatory period is obtained. A polychromatic beam is captured by different chromophores associated with different wavelengths or colors. This, together with the other aspects mentioned, increases the therapeutic spectrum covered by IPL [8].

In recent years, so-called “non-ablative rejuvenation” involving the use of lasers or (IPL) to promote stimulation of collagen production by dermal fibroblasts has been increasingly conducted. The treatments typically are repeated monthly, and at least four sessions are necessary

to obtain efficient results [4,5,8].

Carbon dioxide (CO₂) treatment involves the subcutaneous or transcutaneous infusion of CO₂ to induce therapeutic effects that benefit microcirculation and tissue oxygenation [9,10]. Studies have demonstrated the beneficial effects of subcutaneous carbon dioxide therapy for various medical conditions, including functional disorders of blood flow, peripheral artery disease, microcirculatory disorders, delayed healing, multiple symmetric lipomatosis, cellulite and adiposity [2,9-12].

There are no published reports of adverse effects or complications associated with either local or systemic intradermal and subcutaneous CO₂ infusion [11]. The possible side effects are limited to low-intensity pain during application, small bruises of the punch and a local crackling sensation [9]. Studies using carbon dioxide for contrast angiography attest to the safety of this gas and have shown that it is not likely to promote clot. CO₂ can be used with intravascular bolus injections of up to 100 ml and continuous flows between 20 and 30 ml/second without adverse reactions [13-15].

When applied to the skin surface layer, carbon dioxide stimulates fibroblast synthesis of collagen and elastin, contributing to the retraction of the skin and resulting in the rejuvenation and the reduction of tissue laxity [9,10,16,17].

A review of the literature concerning IPL and intradermal CO₂ injection as applied to fibroblast and collagen proliferation indicates existing gaps in knowledge about this subject [2]. After consideration of the relevance of the study of such techniques for the rejuvenation, prevention and healing of skin aging, it is obvious that additional research in this area is imperative.

It is possible to experimentally evaluate the histological effects of intense pulsed light and the intradermal injection of CO₂ into skin [2,4,5,8]. Therefore, in the present study, our aim was to evaluate the effect of IPL and intradermic CO₂ injection on fibroblast proliferation and collagen in the skin of female Wistar rats.

2. Methods

This study was an experimental, comparative, non-controlled trial that provides a skin semi-quantitative histological analysis of 16 adult female Wistar rats with a body mass ranging between 160 and 200 grams. The animals received food and water *ad libitum* before and during the experimental period and underwent alternating cycles of 12 h light and 12 h darkness.

The animals were kept in collective cages with rectangular dimensions of 49 × 34 × 16 cm (length × width × height) with eight animals in each. The environment was quiet, and the temperature was maintained between

21°C and 25°C, according with guidelines for the use of laboratory animals [18,19].

The rats were divided into two groups, each consisting of 8 animals, as described below:

- Group 1 (G1): underwent to intense pulsed light (IPL);
- Group 2 (G2): underwent intradermal injection of CO₂.

Before any procedures, the animals were anesthetized with 10% ketamine injectable solution at a dose of 10 mg/kg associated with a 1 mg/kg intramuscular xylazine dose [18-21]. All animals were anesthetized and shaved on the dorsal region to create a “punch” of approximately 6 mm in diameter to remove a circular piece of skin in the left inferior-lateral portion of the back for histological study. The skin piece was standardized as a control at time zero (T0) that corresponded to intact skin from pre-treatment and without intervention. These (T0) biopsies were also called as controls non-treated skins.

After a week of completing the initial (T0) punch, the animals were subjected to treatment according to the group divisions:

- G1 (IPL): Eight animals in this group were treated with intense pulsed light at a wavelength of 550 to 900 nanometers in the average pulse. Each animal was submitted to six passages. The light was applied to the right supero-lateral region of the animal's back just after shaving. The treatment was applied once every two weeks for eight weeks;
- G2 (CO₂): The eight animals in this group were treated with an intradermal CO₂ injection at a flow of 80 ml/min. The total volume infused by the application of CO₂, in milliliters, was limited to the formula weight of the animal (in kg) × 5. The treatment was applied in the right supero-lateral region of the animal's back just after shaving once a week for eight weeks.

After the fourth week of treatment, the animals underwent a new punch of approximately 6 mm in diameter to remove a circular piece of skin from the intervention site (right superolateral portion of the back of the animal). The piece was used for the histological analysis of the middle portion of the treatment (T1).

At the end of eight weeks of treatment, the animals underwent a new punch of approximately 6 mm in diameter to remove circular piece of skin from the intervention site (right superolateral portion of the back of the animal) for the end treatment (T2) histological analysis.

After eight weeks of treatment and the acquisition of all of the punches for histological analysis, the animals were euthanized by chemical methods (overdose of pentobarbital) [18-21].

The specimens were fixed in 10% buffered formalin

for 24 hours. For the routine histopathology techniques, the specimens were embedded in paraffin and 4 µm thick sections were taken with a rotating microtome. We analyzed the cells involved in inflammation, fibrosis and the vascularity of the injured tissue histopathologically. For the analysis of inflammatory cells, we used universal histochemical staining (hematoxylin-eosin). For the analysis of fibrosis, a Masson's trichrome stain was used.

To assess fibroblast and collagen proliferation, a semi-quantitative analysis was carried out estimating the amount of newly formed collagen and fibroblasts in an organized fashion as seen on the blades. The slides were classified into four grades (G0, GI, GII and GIII) according to the percentage of the slide on which new fibroblasts and organized collagen [22] had formed (**Table 1**). The semi-quantitative analysis was proposed in accordance with the classic technique of quantitative morphometry [22-27].

The slides were coded so as to not identify the treatment groups or time of biopsy. A pathologist evaluated the slides at random, not knowing the groups or the corresponding treatment times. The fibroblast and collagen proliferation ratings were recorded in a spreadsheet, along with the identity of the blade used, and were then subsequently decoded.

The data is presented as absolute values, percentages and proportions. A nonparametric analysis of variance test (Kruskal-Wallis) was used to compare the study groups. When the test indicated a significant difference, we used a Dunn post-test to compare the two groups. As a measure of accuracy, 95% confidence intervals were employed. A $p < 0.05$ was considered significant. All statistical analysis was performed using the GraphPad Prism, version 5.0.1 statistical software package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use, protocol 241/2009.

3. Results

In the eight animals subjected to IPL treatment, when fibroblast proliferation between the times of onset (T0), the middle (T1) and the end (T2) of treatment was compared, it initially appeared that non-treated skin exhibited a grade 0 classification in 100% of the animals. By the

middle of treatment (T1), five of the eight animals (62.5%) presented grade II and III fibroblast proliferation, and at the end of treatment (T2), six of the eight (75%) of the animals presented grade I and II proliferation. This evolution of the histological proliferation of fibroblasts was statistically significant when the beginning and the end of treatment were compared (T0 vs. T2, $p < 0.05$, **Table 2**).

For the non-treated skin controls, grade 0 fibroblast proliferation was also observed in 100% of the animals that received the intradermal injections of CO₂. After 4 weeks of treatment, all animals in this group presented no changes in histological grade, as they maintained 100% presentation of grade 0 fibroblast proliferation. However, by the end of treatment (T2), all animals (100%) exhibited grade I and II fibroblast proliferation. The evolution of histological fibroblast proliferation was also statistically significant in the CO₂ group when the beginning and the end of treatment were compared (T0 vs. T2, $p < 0.001$, **Table 2**).

In regards to collagen proliferation, both study groups exhibited grade 0 proliferation in non-treated control skin at time zero in 100% of the samples. By the middle of treatment (T1), 87.5% (7/8) of the animals in the IPL group exhibited proliferation of grade I and grade II collagen, and 87.5% (7/8) the CO₂ group animals exhibited histological grade I collagen proliferation. At the end of treatment (T2), in the intense pulsed light-treated animals, 62.5% (5/8) exhibited grade II and III proliferation, and 25% (2/8) exhibited grade I collagen proliferation. In the CO₂ group, 50% (4/8) exhibited grade I proliferation and 50% (4/8) grade II collagen proliferation after the treatment (**Table 2**).

There was a statistically significant difference in the degree of collagen proliferation between the time points, both for the animals in the light-pulse treated group (T0 vs. T2, $p < 0.001$) and the animals in the CO₂ group (T0 vs. T2, $p < 0.001$). These data are summarized in **Table 2**.

When all 16 animals were analyzed together (G1 and G2), there was a statistically significance different in fibroblast and collagen proliferation when comparing the beginning and the end of treatment (T0 vs. T2, $p < 0.001$),

Table 1. Classifications for the semi-quantitative analysis of fibroblast and collagen proliferation.

Grade	Fibroblastic proliferation (% of blade)	Collagen proliferation (% of blade)
Grade 0	0% to 5%	0% to 5%
Grade I	5% to 25%	5% to 25%
Grade II	25% to 50%	25% to 50%
Grade III	More than 50%	More than 50%

Table 2. Expression of fibroblast proliferation and collagen proliferation according to the period analyzed and separated by study group.

	Time 0: T0 (Onset treatment)				Time 1: T1 (4 weeks of treatment)				Time 2: T2 (8 weeks of treatment)			
	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III
	0% - 5%	5% - 25%	25% - 50%	>50%	0% - 5%	5% - 25%	25% - 50%	>50%	0% - 5%	5% - 25%	25% - 50%	>50%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Intense pulsed light (G1) (N = 8 animals)												
Fibroblastic proliferation	8 (100%)	-	-	-	3 (37.5%)	2 (25%)	-	3 (37.5%)	2 (25%)	3 (37.5%)	3 (37.5%)	-
Collagen proliferation	8 (100%)	-	-	-	1 (12.5%)	5 (62.5%)	2 (25%)	-	1 (12.5%)	2 (25%)	3 (37.5%)	2 (25%)
CO₂ Intradermic Injection (G2) (N = 8 animals)												
Fibroblastic proliferation	8 (100%)	-	-	-	8 (100%)	-	-	-	-	5 (62.5%)	3 (37.5%)	-
Collagen proliferation	8 (100%)	-	-	-	1 (12.5%)	7 (87.5%)	-	-	-	4 (50%)	4 (50%)	-

Comparisons using the Kruskal-Wallis with Dunn post-test:

G1: Pulsed light (fibroblastic proliferation)		
T0 vs.T1 p < 0.05	G2: CO ₂ (fibroblastic proliferation)	T0 vs.T1 p > 0.05
	T0 vs.T2 p < 0.05	T0 vs.T2 p < 0.001
	T1 vs.T2 p > 0.05	T1 vs.T2 p < 0.001
G1: Pulsed light (collagen proliferation)		
T0 vs.T1 p < 0.05	G2: CO ₂ (Collagen proliferation)	T0 vs.T1 p < 0.05
	T0 vs.T2 p < 0.001	T0 vs.T2 p < 0.001
	T1 vs.T2 p > 0.05	T1 vs.T2 p > 0.05

as shown in **Table 3. Figures 1-4** illustrate the proliferation of collagen at different time points (T0, T1 and T2) in the IPL group animals and the CO₂ group animals.

The **Figures 4-7** demonstrate the evaluation of collagen in group intense pulsed light (G1) and CO₂ (G2) at three time points analyzed: onset (T0), middle (T1) and final (T2) treatment.

4. Discussion

Intense pulsed light (IPL) is a source of light energy that has many applications. IPL is composed of different wavelength, *i.e.*, all or part of the light spectrum, while the laser has a single wavelength [3]. IPL reaches the skin surface and allows, through the principle of selective photothermolysis, the correction of various skin lesions and facial blemishes resulting from photoaging, as well as stains and pigmentation issues [5].

As IPL is defined by not being composed of coherent light, it can interact with a variety of chromophores, and

its energy can, therefore, be more quickly dissipated. Thus, IPL heating is more superficial compared to similar use of lasers. The difference provides better security and safety, especially in most advanced skin types [28].

A recent study evaluated the action of IPL on stimulating the proliferation of collagen in human skin damaged by sun and concluded that, in addition to collagen deposition, the clinical improvement observed after treatment may be secondary to the reduction of perifollicular inflammatory infiltrate [4,8]. Other reports indicate some degree of the appearance of newly formed collagen in the upper dermis after IPL treatment, thus suggesting the possibility that stimulated dermal fibroblasts are the source of this increased collagen expression [6,29].

The results of the present study indicate that eight weeks after the application of intense pulsed light once every other week, there were significant differences on fibroblast proliferation and collagen in the skin of the animals studied. The moments of the greatest prolifera

Table 3. Expression of fibroblast proliferation and collagen proliferation according to the period analyzed and separated by study group.

	Time 0: T0 (onset treatment)				Time 1: T1 (4 weeks treatment)				Time 2: T2 (8 weeks treatment)			
	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III
	0% - 5%	5% - 25%	25% - 50%	>50%	0% - 5%	5% - 25%	25% - 50%	>50%	0% - 5%	5% - 25%	25% - 50%	>50%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Intense pulsed light (G1) + CO₂ intradermic injection (G2) (N = 16 animals)												
Fibroblastic proliferation	16 (100%)	-	-	-	11 (68.75%)	2 (12.5%)	-	3 (18.75%)	2 (12.5%)	8 (50%)	6 (37.5%)	-
Collagen proliferation	16 (100%)	-	-	-	2 (12.5%)	12 (75%)	2 (12.5%)	-	1 (6.25%)	6 (37.5%)	7 (43.75%)	2 (12.5%)

Comparisons using the Kruskal-Wallis with Dunn post-test:

Fibroblastic proliferation	
T0 vs.T1	p > 0.05
T0 vs.T2	p < 0.001
T1 vs.T2	p < 0.05
Collagen proliferation	
T0 vs.T1	p < 0.001
T0 vs.T2	p < 0.001
T1 vs.T2	p > 0.05



Figure 1. Experimental procedures on Wistar Rats. A “punch” of approximately 6 mm in diameter to remove a circular piece of skin in the left inferior-lateral portion of the back, designed as (T0) that corresponded to intact skin from pre-treatment and without intervention.



Figure 2. Experimental procedures on Wistar Rats. The CO₂ intradermal infusion treatment was applied in the right supero-lateral region of the animal's back just after shaving once a week for eight weeks.



Figure 3. Experimental procedures on Wistar Rats. Each animal was submitted to six passages of IPL. The light was applied to the right supero-lateral region of the animal's back just after shaving. The treatment was applied once every two weeks for eight weeks. The bottom image shows the final aspect of the treated skin just before the sacrifice.

tion of fibroblasts coincide with the periods of increased collagen production. These results support the hypothesis that the source of the increased expression of collagen is the stimulation of dermal fibroblasts, probably due to the principle of selective photothermolysis. The concept underlying the principle is that the absorption of light by water causes a photothermal effect and a consequent inflammatory response that stimulates the fibroblastic activity [3].

With respect to the intradermal injection of CO₂, the hypothesis of action is that carbon dioxide, when applied subcutaneously, results in the mechanical destruction of fat cells. In addition, the CO₂ promotes local vasodilatation and a subsequent increase in tissue oxygenation and, when applied in the most superficial layer of the skin, will stimulate fibroblasts and the synthesis of elastin and collagen. These processes contribute to the retraction of the skin and result in skin tissue rejuvenation and a reduction in sagging [2,9-12].

The easily recognized skin undergoes changes with

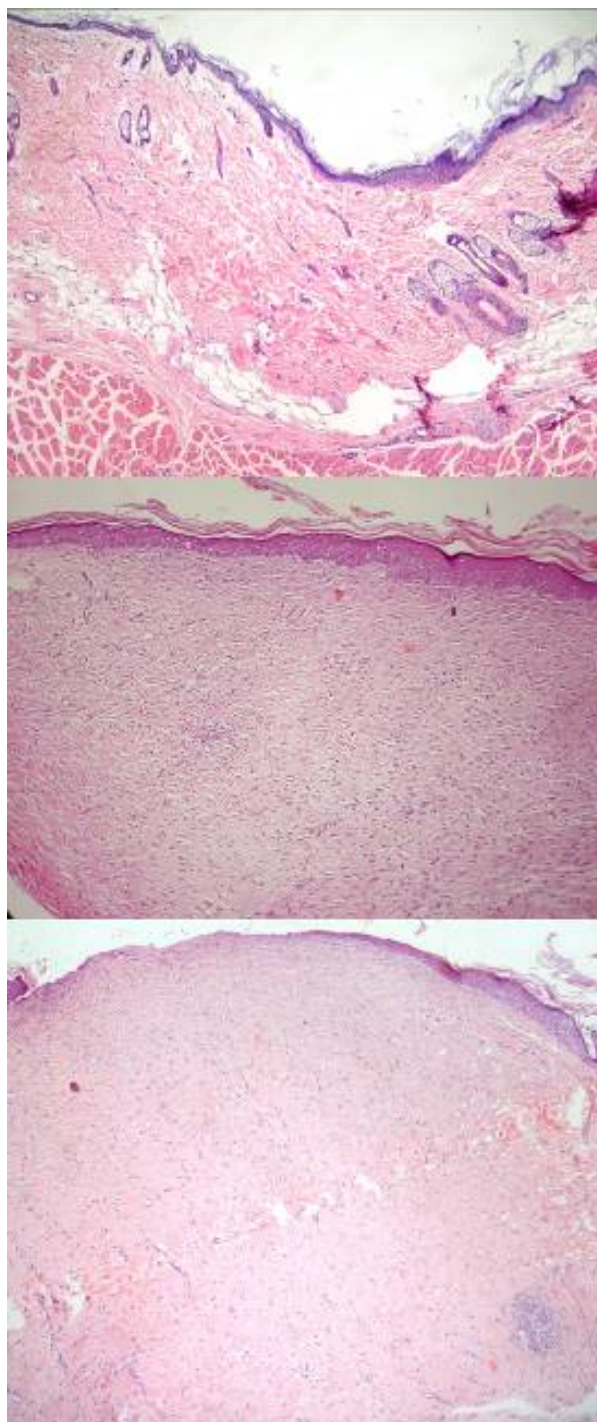


Figure 4. Evaluation of collagen in group intense pulsed light (G1) at three time points analyzed: baseline (T0), half (T1) and final (T2) treatment, from up to down, respectively. Hematoxylin-eosin (100×).

advancing age, as the appearance of furrows, atrophy, ptosis and laxity alters its appearance. Changes in the connective tissue, which acts as the structural foundation for the epidermis, outline these changes externally and

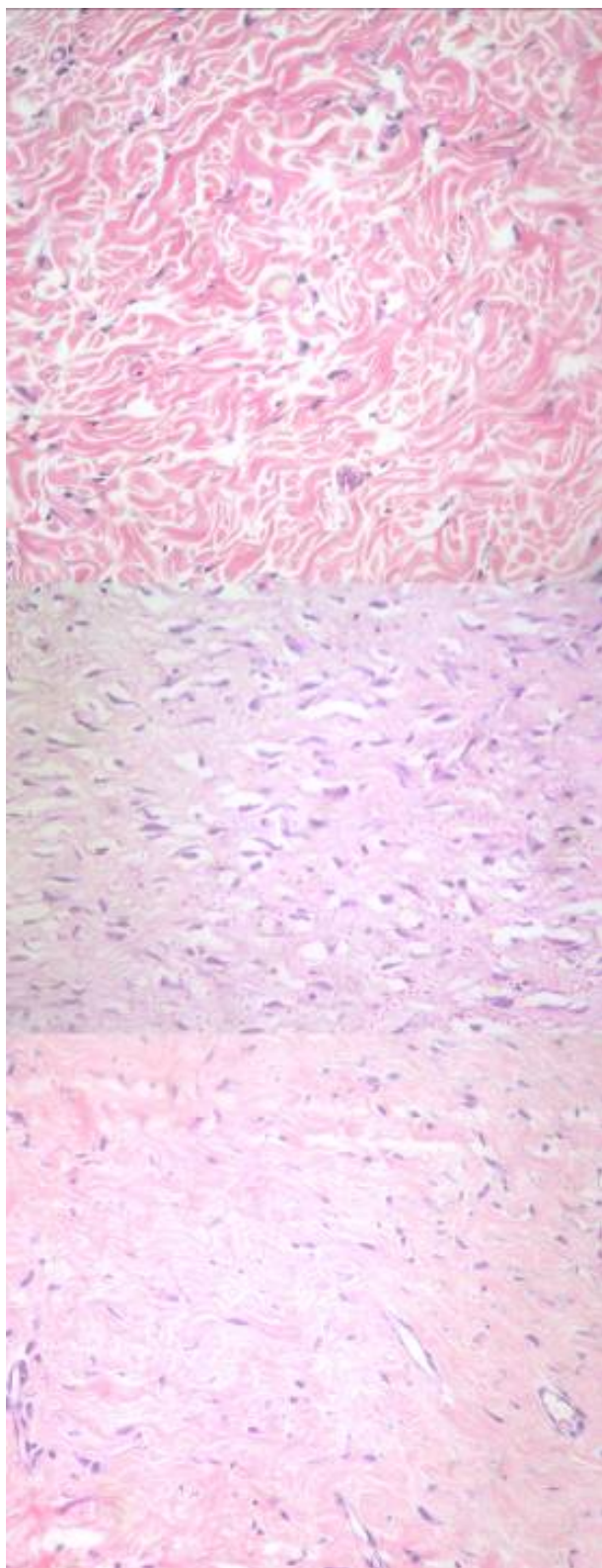


Figure 5. Evaluation of collagen in group intense pulsed light (G1) at three time points analyzed: baseline (T0), half (T1) and final (T2) treatment, from up to down, respectively. Hematoxylin-eosin (400×).

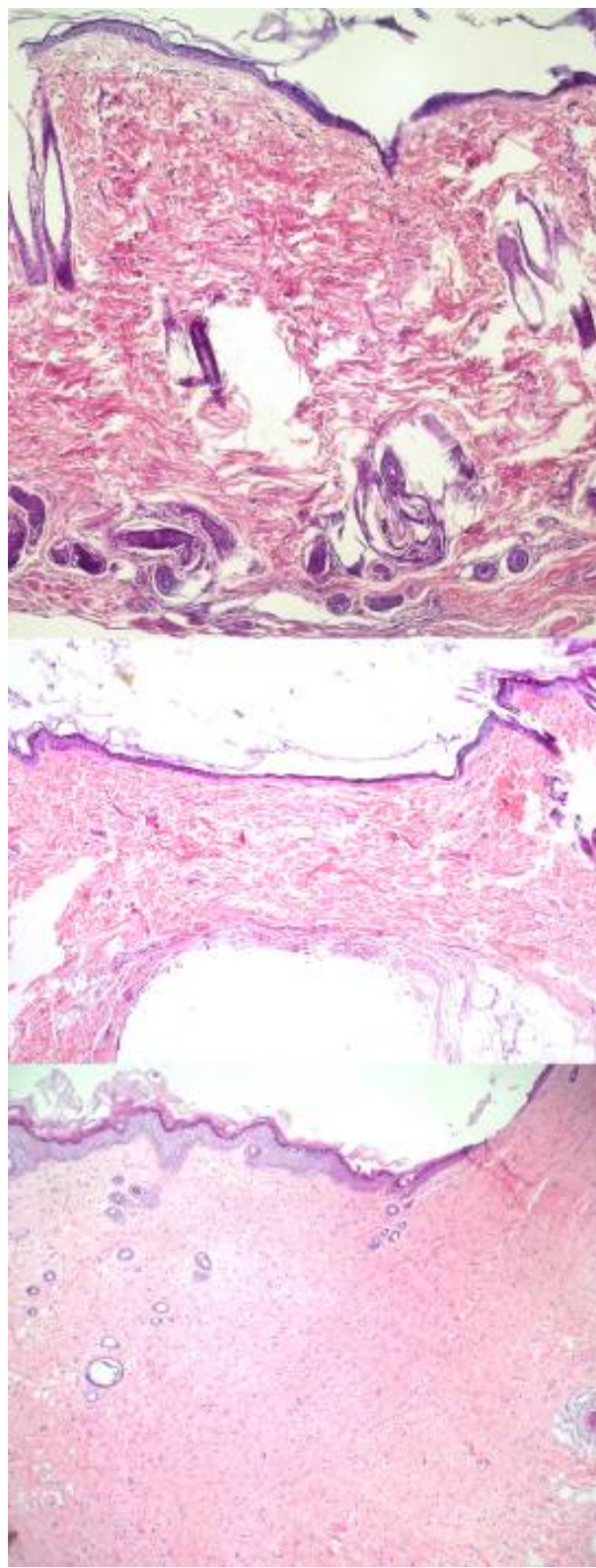


Figure 6. Evaluation of collagen in group CO₂ injection (G2) at three time points analyzed: baseline (T0), half (T1) and final (T2) treatment, from up to down, respectively. Hematoxylin-eosin (100×).

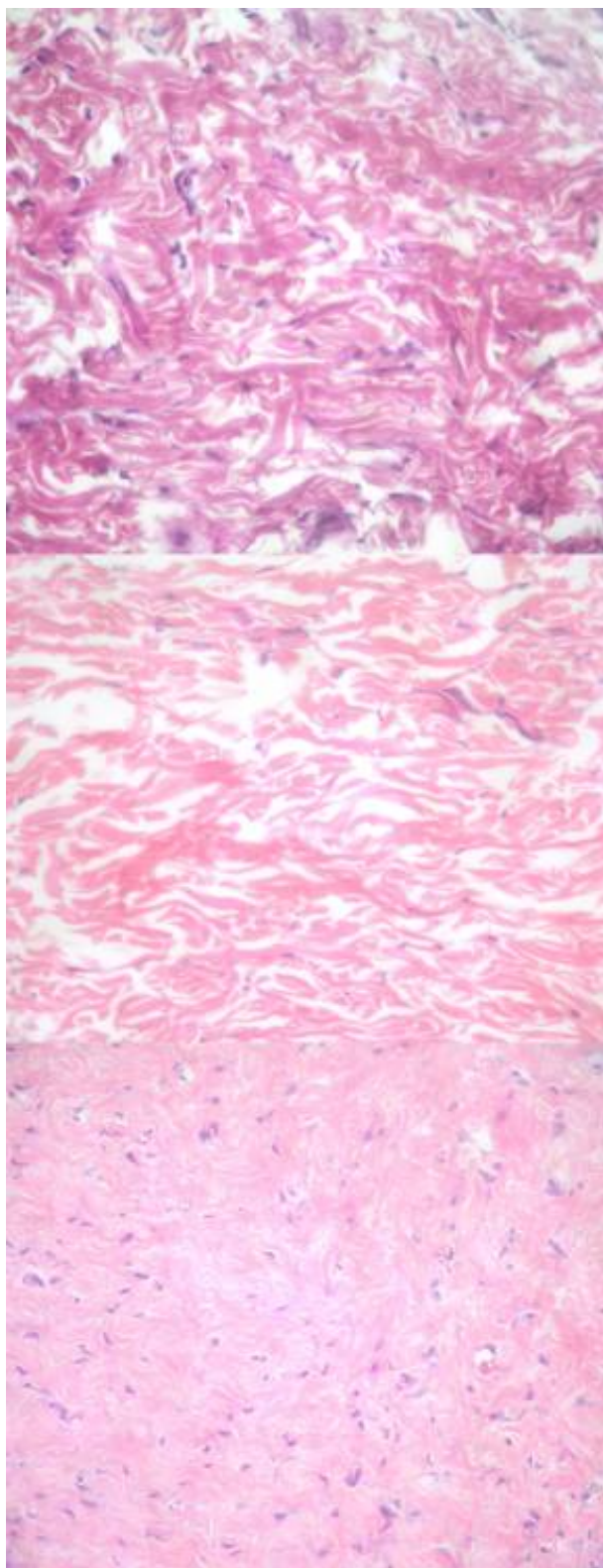


Figure 7. Evaluation of collagen in group CO₂ injection (G2) at three time points analyzed: baseline (T0), half (T1) and final (T2) treatment, from up to down, respectively. Hematoxylin-eosin (400×).

are reflected in the corneum stratum [1]. The modifications to the lifelong unit-elastic collagen establish a substantial morphological basis for the understanding of the biochemical and biomechanical changes of the skin with age [1]. Thus, the intradermal injection of CO₂ provides a greater exchange rate (increase in blood flow) and improves tissue oxygenation; in addition, it may stimulate dermal fibroblasts and may increase collagen and elastin synthesis [9-12].

A recent study evaluated CO₂ injection into the skin of ten Wistar male rats. The results of the study indicated a marked increase in collagen after infusion of carbon dioxide into the skin of animals. Furthermore, intradermal injections appeared more effective than subcutaneous injections in reducing wrinkles [2].

Based on those results, we studied the stimulation of fibroblast and collagen proliferation via the application of intense pulse light and intradermal CO₂ in the skin of sixteen rats. It should be emphasized that the proliferation of collagen is a dynamic process and depends mainly on the stimulation of fibroblasts. Therefore, it is possible that a longer period of exposure to the treatments could lead to a greater activation of dermal fibroblasts and even greater collagen proliferation.

The results of the current study allow us to conclude that both the intradermal injection of CO₂ and intense pulsed light promotes fibroblast and collagen proliferation in the skin of animals. However, other questions are raised by these results. Is it possible that various mechanical or traumatic stimuli (punctures, local heat) can also stimulate fibroblast and collagen proliferation? Can the results observed in rat skin be repeated in human skin?

Because of the paucity of data (especially experimental study data) published in medical journals about this subject, this work represents a milestone in rejuvenating dermatopathology procedures. Thus, further studies in this area utilizing similar methodologies are needed. Dermatology now offers unlimited possibilities in the use of skin-rejuvenating procedures. The gathering of scientific evidence is the best way to establish new methods for cosmetic dermatology.

REFERENCES

- [1] R. B. Oriá, F. V. A. Ferreira, É. N. Santana, M. R. Fernandes and G. A. C. Brito, "Study of Age-Related Changes in Human Skin, Using Methods of Histo-Morphometry and Autofluorescence," *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Vol. 78, No. 4, 2003, pp. 425-434.
- [2] J. C. Ferreira, A. Haddad and S. A. Tavares, "Increase in Collagen Turnover Induced by Intradermal Injection of Carbon Dioxide in Rats," *Journal of Drugs in Dermatology*, Vol. 7, No. 3, 2008, pp. 201-206.

- [3] M. G. Catorze, "Laser: Bases and Use in Dermatology," *Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana*, Vol. 37, No. 1, 2009, pp. 5-27.
- [4] V. G. Prieto, A. H. Diwan, C. R. Shea, P. Zhang and N. S. Sadick, "Effects of Intense Pulsed Light and the 1064 nm Nd:YAG Laser on Sun-Damaged Human Skin: Histologic and Immunohistochemical Analysis," *Dermatologic Surgery*, Vol. 31, No. 5, 2005, pp. 522-525.
[doi:10.1111/j.1524-4725.2005.31154](https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31154)
- [5] R. C. R. Patriota, C. J. Rodrigues and L. C. Cucé, "Intense Pulsed Light in Photoaging: Clinical, Histopathological and Immunohistochemical Evaluation," *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Vol. 86, No. 6, 2011, pp. 1129-1133.
[doi:10.1590/S0365-05962011000600010](https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600010)
- [6] D. J. Goldberg, "New Collagen Formation after Dermal Remodeling with an Intense Pulsed Light Source," *Journal of Cutaneous Laser Therapy*, Vol. 2, No. 2, 2000, pp. 59-61.
- [7] D. J. Goldberg and K. B. Cutler, "Nonablative Treatment of Rhytids with Intense Pulsed Light," *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol. 26, No. 2, 2000, pp. 196-200.
[doi:10.1002/\(SICI\)1096-9101\(2000\)26:2<196::AID-LSM10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9101(2000)26:2<196::AID-LSM10>3.0.CO;2-9)
- [8] V. G. Prieto, P. S. Zhang and N. S. Sadick, "Evaluation of Pulsed Light and Radiofrequency Combined for the Treatment of Acne Vulgaris with Histologic Analysis of Facial Skin Biopsies," *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, Vol. 7, No. 2, 2005, pp. 63-68.
- [9] C. Brandi, C. D'Aniello, L. Grimaldi, B. Bosi, I. Dei, P. Lattarulo, *et al.*, "Carbon Dioxide Therapy in the Treatment of Localized Adiposities: Clinical Study and Histopathological Correlations," *Aesthetic Plastic Surgery*, Vol. 25, No. 3, 2001, pp. 170-174.
[doi:10.1007/s002660010116](https://doi.org/10.1007/s002660010116)
- [10] C. Brandi, L. Grimaldi, G. Nisi, A. Brafa, A. Campa, M. Calabrò, *et al.*, "The Role of Carbon Dioxide Therapy in the Treatment of Chronic Wounds. *In Vivo*," Vol. 24, No. 2, 2010, pp. 223-226.
- [11] T. Brockow, A. Dillner, A. Franke and K. L. Resch, "Analgesic Effectiveness of Subcutaneous Carbon-Dioxide Insufflations as an Adjunct Treatment in Patients with Non-Specific Neck or Low Back Pain," *Complementary Therapies in Medicine*, Vol. 9, No. 2, 2001, pp. 68-76.
[doi:10.1054/ctim.2001.0434](https://doi.org/10.1054/ctim.2001.0434)
- [12] A. Sönmez, M. Yaman, O. Yalçın, B. Ersoy, M. Serin and A. Sav, "Carbon Dioxide Therapy Increases Capillary Formation on Random Pedicled Skin Flaps in the Rat," *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, Vol. 62, No. 7, 2009, pp. e236-e237.
[doi:10.1016/j.bjps.2009.01.067](https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.01.067)
- [13] D. Kummer-Kloess, W. Kloess, N. Marienhoff, R. M. Schütz, M. Zwaan and H. D. Weiss, "Angiography during Interventional Procedures with Carbon Dioxide (CO₂) (Carbo-Angiography) in Patients with Increased Contrast Media Risk," *Zentralblatt für Chirurgie*, Vol. 122, 1997, pp. 725-729.
- [14] M. Zwaan, W. Kloess, C. Kagel, D. Kummer-Kloess, S. Matthies-Zwaan, R. M. Schütz, *et al.*, "Carbon Dioxide as an Alternative Contrast Medium in Peripheral Angiography," *Rofo*, Vol. 164, No. 5, 1996, pp. 445-448.
[doi:10.1055/s-2007-1015687](https://doi.org/10.1055/s-2007-1015687)
- [15] M. Zwaan, J. Steinhoff, L. Fricke, C. Kagel, H. Lorch and H. D. Weiss, "The Angiography of Kidney Transplant Arteries Using Carbon Dioxide," *Dtsch Med Wochenschr*, Vol. 122, 1997, pp. 1133-1136.
[doi:10.1055/s-2008-1047738](https://doi.org/10.1055/s-2008-1047738)
- [16] B. R. Hartmann, E. Bassenge and M. Pittler, "Effect of Carbon Dioxide-Enriched Water and Fresh Water on the Cutaneous Microcirculation and Oxygen Tension in the Skin of the Foot," *Angiology*, Vol. 48, No. 4, 1997, pp. 337-343.
[doi:10.1177/000331979704800406](https://doi.org/10.1177/000331979704800406)
- [17] B. R. Hartmann, E. Bassenge and M. Hartmann, "Effects of Serial Percutaneous Application of Carbon Dioxide in Intermittent Claudication: Results of a Controlled Trial," *Angiology*, Vol. 48, No. 11, 1997, pp. 957-963.
[doi:10.1177/000331979704801104](https://doi.org/10.1177/000331979704801104)
- [18] K. Field, M. Bailey, L. L. Foresman, R. L. Harris, S. L. Motzel, R. A. Rockar, *et al.*, "Medical Records for Animals Used in Research, Teaching, and Testing: Public Statement from the American College of Laboratory Animal Medicine," *Institute of Laboratory Animal Resources Journal*, Vol. 48, 2007, pp. 37-41.
- [19] D. F. Kohn, T. E. Martin, P. L. Foley, T. H. Morris, M. M. Swindle, G. A. Vogler, *et al.*, "Public Statement: Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits," *Journal of American Association for Laboratory Animal Science*, Vol. 46, No. 2, 2007, pp. 97-108.
- [20] ACLAM, "ACLAM Position Statement on Animal Experimentation," *Comparative Medicine*, Vol. 53, No. 5, 2003, p. 472.
- [21] J. Artwohl, P. Brown, B. Corning, S. Stein and A. T. Force, "Report of the ACLAM Task Force on Rodent Euthanasia," *Journal of American Association for Laboratory Animal Science*, Vol. 45, No. 1, 2006, pp. 98-105.
- [22] A. L. Domingos, S. Tucci, S. B. Garcia, J. de Bessa, A. J. Cologna and A. C. Martins, "Use of a Latex Biomembrane for Bladder Augmentation in a Rabbit Model: Biocompatibility, Clinical and Histological Outcomes," *International Journal of the Brazilian Society of Urology*, Vol. 35, No. 2, 2009, pp. 217-224.
- [23] J. J. S. Gonçalves, L. E. V. Leão, R. G. Ferreira, R. Oliveira, L. H. Ota and R. S. D. Santos, "Semi-quantitative Analysis of Surgical Biopsies of Different Lung Lobes of Patients with Usual Interstitial Pneumonia/Idiopathic Pulmonary Fibrosis," *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Vol. 35, No. 7, 2009, pp. 676-682.
- [24] D. M. Hyde, T. E. King, T. McDermott, J. A. Waldron, T. V. Colby, W. M. Thurlbeck, *et al.*, "Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Quantitative Assessment of Lung Pathology. Comparison of a Semiquantitative and a Morphometric Histopathologic Scoring System," *American Review of Respiratory Disease*, Vol. 146, No. 4, 1992, pp. 1042-1047.
- [25] M. F. Y. Maeda, C. D. Silva, L. S. Harima, L. F. F. Silva, B. Ctenas and V. A. F. Alves, "Vascularization in Hepatic Cirrhosis based on Autopsies," *Archives of Gastroentero-*

logy, Vol. 45, 2008, pp. 38-45.

- [26] D. Araf, M. Moura, C. J. Rodrigues and L. A. Figueiredo, "Homologous Scleral and Dura Mater Grafts in Rabbit Eyes," *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, Vol. 70, No. 6, 2007, pp. 981-987.
[doi:10.1590/S0004-27492007000600018](https://doi.org/10.1590/S0004-27492007000600018)
- [27] W. C. Cavazana, M. L. P. B. de Simões, S. O. Yoshii, C. A. B. Amado, R. K. N. Cuman, "Sugar (Sucrose) and Medium Chain Triglycerides with Essential Fatty Acids in the Treatment of Wounds: An Experimental Study in Rats," *Brazilian Annals of Dermatology*, Vol. 84, No. 3, 2009, pp. 229-236.
[doi:10.1590/S0365-05962009000300003](https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000300003)
- [28] D. Laury, "Intense Pulsed Light Technology and Its Improvement on Skin Aging from the Patients' Perspective Using Photorejuvenation Parameters," *Dermatology Online Journal*, Vol. 9, No. 1, 2003, p. 5.
- [29] D. J. Goldberg and S. Silapunt, "Q-Switched Nd:YAG Laser: Rhytid Improvement by Non-Ablative Dermal Remodeling," *Journal of Cutaneous Laser Therapy*, Vol. 2, No. 3, 2000, pp. 157-160.