

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Moyses Costa Lemos**

**COMPARAÇÃO ENTRE HISTOLOGIA E ESPECTROSCOPIA DE  
FLUORESCÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE ATROFIA CUTÂNEA INDUZIDA POR  
GLICOCORTICÓIDE EM RATOS**

**São Carlos**  
**2010**

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**COMPARAÇÃO ENTRE HISTOLOGIA E ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA  
AVALIAÇÃO DE ATROFIA CUTÂNEA INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDE EM RATOS**

**Moyses Costa Lemos**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de São  
Carlos, para a obtenção do título  
de Mestre em Biotecnologia.**

**Orientadores: Profa. Dra. Débora Gusmão Melo - DMed - UFSCar  
Prof. Dr. Igor Polikarpov - Instituto de Física de São Carlos USP**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Maria Ramos Germano - DMed - UFSCar**

**São Carlos  
2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L557ch

Lemos, Moyses Costa.

Comparação entre histologia e espectroscopia de fluorescência para avaliação de atrofia cutânea induzida por glicocorticóide em ratos / Moyses Costa Lemos. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
70 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Histologia (Tecido). 3. Espectroscopia de fluorescência. 4. Medições com laser. 5. Dermatologia.  
I. Título.

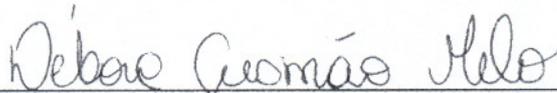
CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Moysés da Costa Lemos**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

**Aprovado em: 24/09/2010**

**BANCA EXAMINADORA**



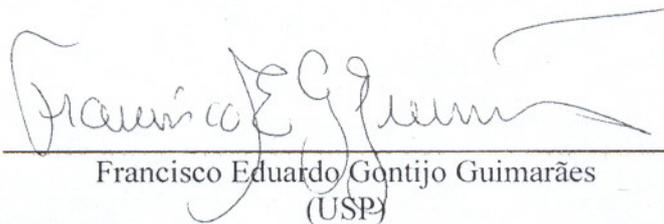
---

Profa. Dra. Débora Gusmão Melo (Orientadora)  
Universidade Federal de São Carlos – DMed/UFSCar



---

Profa. Dra. Cristina Kurachi  
(IFSC/USP)



---

Francisco Eduardo Gontijo Guimarães  
(USP)

Dedico essa dissertação a minha mãe pelo  
seu carinho e irrestrito apoio em toda a  
minha vida.

## **Agradecimentos**

A Deus, pela minha saúde e da minha família.

À minha esposa Carol, pelo apoio, pela paciência, pela amizade, carinho e muito amor, que me ajudou superar muitos obstáculos. Obrigado, te amo.

Ao meu amado filho Cauê, que surgiu para alegrar e dar um novo e importante sentido à minha vida. Obrigado.

À minha mãe e artista Sônia, à minha querida avó Amariles aos meus pais Bernardo e Everardo e às minhas irmãs Marylda, Flora e principalmente a Marcya, que me ajudou na realização deste trabalho de forma ativa, pelo amor, carinho, compreensão, pelo apoio psicológico e emocional. Amo muito vocês, sem vocês nada disso seria possível. Obrigado.

Aos meus avôs Jacob e Louis e Flora, pela inspiração em ser médico. Obrigado.

Às minhas tias Yeda, Esther, Teresa, Amélia, Nono, Nadir, Alimiali, Wilma e tios Solimar, Erenaldo e Everaldo. Obrigado.

Aos meus queridos sobrinhos Louis, Arthur e Marcele, pelo amor e carinho. Obrigado.

Às Famílias Villela e Pedrazzani que já são e sempre serão parte integrante da minha vida. Obrigado.

Aos meus orientadores, professores e amigos Débora e Igor. Essas páginas não representam nem a metade do que aprendi com vocês. São meus exemplos de professores e de como gostaria de ser. MUITÍSSIMO obrigado.

À professora Cristina, pela paciência e disposição em me ajudar desde o início do trabalho e por disponibilizar o seu laboratório para a realização dos experimentos. Muito obrigado.

Às professoras Carla e Lucimar, que sempre estiveram dispostas a ajudar em todas as formas possíveis. Vocês são fantásticas. Muito obrigado.

Ao amigo Wagner, pelas intermináveis horas em me ajudar nas avaliações espectrais e nos cálculos matemáticos, sem você este trabalho não seria possível. Muito obrigado.

Ao amigo Dirceu, que sempre esteve disposto a ajudar na análise espectral. Muito Obrigado.

Aos Professores Francisco, Fernando e Fernanda, pelas críticas construtivas em minha qualificação. Muito obrigado.

Ao laboratório Ivo Ricci na figura do Dr. Marco Antônio pela realização das lâminas e pela ajuda. Muito Obrigado.

À todos os meu amigos da pós-graduação. Foi muito bom estar com vocês.

À Claudia, secretária da Biotecnologia, pela boa vontade e paciência.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”*

***Albert Einstein***

## Resumo

O padrão ouro para avaliar a atrofia de pele é o estudo histológico. Quando comparada à técnica de Espectroscopia de Fluorescência (EF), a histologia exige a remoção física de tecidos e seu processamento em laboratório; enquanto a EF realiza avaliações rápidas e *in vivo*. O objetivo dessa pesquisa foi padronizar uma metodologia para indução de atrofia cutânea em modelo experimental; comparar o colágeno na pele normal e atrófica; e estimar o potencial da EF na avaliação da atrofia cutânea. Foram utilizados 20 ratos machos Wistar adultos, provenientes do Biotério Central da UFSCar, mantidos em ambiente controlado. A atrofia cutânea foi induzida com o uso tópico do glicocorticóide propionato de clobetasol a 0,05% (CB), 2 vezes ao dia, por 14 dias, e avaliada por meio de estudo histológico e EF com laser de excitação em 532nm e 408nm. Foram avaliados 96 fragmentos de pele com coloração HE e Picrosirius red. Nas biópsias do primeiro dia, a média de espessura da epiderme foi de  $44\pm 9\mu\text{m}$  e, após 14 dias de CB, foi de  $16\pm 6\mu\text{m}$  ( $p < 0,0001$ ), confirmando a atrofia. Esse resultado foi corroborado pela coloração com Picrosirius red, na qual se observou, após uso de corticóide, rearranjo mais grosseiro e desorganizado das fibras colágenas da derme. Para a análise dos resultados da EF, os espectros foram nomeados como “normal” ou “atrófico”, em correspondência ao estudo histológico. A avaliação por EF com laser de 408nm permitiu distinguir os grupos “normal” e “atrófico” com menor número de parâmetros espectrais. No futuro, esta técnica poderá ser usada como método de diagnóstico complementar na área da dermatologia.

**Palavras-chave:** atrofia cutânea; glicocorticóide; histologia; espectroscopia de fluorescência; laser; dermatologia.

## Abstract

The gold standard for evaluating skin atrophy is the histological study. When compared to the technique of Fluorescence Spectroscopy (FS), histology requires the physical removal of tissue and their processing in the laboratory, while the FS conducts fast assessments in vivo. The objective of this study was to standardize a methodology for inducing skin atrophy in an experimental model, compare the collagen in normal and atrophic skin, and estimate the potential assessment of FS in skin atrophy. We used 20 adult male Wistar rats, from the UFSCar Central Animal Biotery, kept in a controlled environment. The cutaneous atrophy was induced with topical use of the glucocorticoid Clobetasol propionate 0.05%, 2 times daily for 14 days and evaluated by histological analysis and FS with laser excitation at 532nm and 408nm. We evaluated 96 skin fragments with HE and picosirius red staining. In biopsies from the first day, the average of epidermal thickness was  $44 \pm 9\mu\text{m}$  and, after 14 days of CB, was  $16 \pm 6\mu\text{m}$  ( $p < 0.0001$ ), confirming atrophy. This result was confirmed by staining with picosirius red, which was observed coarsed and disorganized rearrangement of the collagen fibers in the dermis after the use of corticosteroids. For the analysis of results from FS, the spectra have been nominated as "normal" or "atrophic" in correspondence to the histological study. The FS with 408nm laser analysis allowed to distinguish the "normal" and "atrophic" group with fewer spectral parameters. In the future, this technique could be used as a complementary diagnostic method in dermatology.

**Keywords:** dermal atrophy, glucocorticoid, histology, fluorescence spectroscopy, laser, dermatology.

## Lista de Figuras

Figura 1. Fragmento de pele humana. ....	14
Figura 2. Diferentes mecanismos de ação dos glicocorticóides na célula .....	16
Figura 3. Cascata do ácido araquidônico .....	17
Figura 4. Efeitos cutâneos dos glicocorticóides.....	19
Figura 5. Molécula do Propionato de Clobetasol.....	20
Figura 6. Fragmentos de pele de rato corados com HE (60x) .....	22
Figura 7. Foto do animal em posição para o experimento.....	27
Figura 8. Sistema utilizado para aferição da Espectroscopia de Fluorescência. ....	28
Figura 9. Exemplo de aferição da espectroscopia no comprimento da luz violeta (408nm) .....	28
Figura 10. Exemplos de espectros obtidos com laser de 532 nm.....	32
Figura 11. Parâmetros usados para avaliar os espectros de fluorescência com laser de excitação com emissão em 532nm .....	33
Figura 12. Exemplos de espectros obtidos com laser de 408nm .....	34
Figura 13. Parâmetros usados para avaliar os espectros de fluorescência com laser de excitação com emissão em 408nm.....	35
Figura 14. Fragmento de pele de rato Wistar (animal 04) corado com HE (100x).....	41
Figura 15. Fragmento de pele de rato Wistar (animal 03) corado com Picrosirius red (200x).. .....	43

Figura 16. Resultados da avaliação de parâmetros espectrais ( $\lambda_{\max}$ , $I_{\max}$ e $\Delta\lambda$ ) da EF com laser de 532nm. ....	45
Figura 17. Resultados da avaliação dos parâmetros espectrais da EF com laser de 408nm.....	46
Figura 18. Índices $R_{633}$ e $R_{670}$ .....	47
Figura 19. PCA para os espectros obtidos com laser de 532nm. ....	48
Figura 20. PCA para os espectros obtidos com laser de 408nm.....	49
Figura 21. Avaliação dos índices $R_{633}$ e $R_{670}$ .....	57

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Detalhamento dos reagentes e tempos do processamento histológico. ....	29
Tabela 2. Medida, em milímetros, da espessura das biópsias. ....	38
Tabela 3. Medida, em micrômetros, da espessura da epiderme nas biópsias controle, em cada fragmento de tecido, de cada lâmina. ....	39
Tabela 4. Medida, em micrômetros, da espessura da epiderme, nas biópsias após 14 dias de aplicação de glicocorticóide, em cada fragmento de tecido, de cada lâmina ..	40
Tabela 5. Avaliação histológica da atrofia: zero (0) indica ausência de atrofia, (+) atrofia leve e (++) atrofia moderada/acentuada. ....	41
Tabela 6. Valores de densidade óptica, em pixel por polegada (ppp) das fibras colágenas da derme, determinados pelo programa ImajeJ. ....	42
Tabela 7. Avaliação qualitativa das características das fibras colágenas da derme dos animais nos fragmentos controle e após 14 dias de uso de corticóide tópico .....	43
Tabela 8. Número de espectros coletados em função do método de EF empregado e do estado do tecido (normal ou atrófico). ....	44
Tabela 9. Lista dos principais fluóforos presentes na pele, com seus respectivos valores de excitação e emissão máximas* .....	55

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico  
AP-1 - Ativador de Proteína 1  
BPD - Benzoporfirina  
CB - Clobetasol  
CRH - Fator liberador de corticotrofina  
COX - Ciclo-oxigenases  
DNA - Ácido Desoxiribonucléico  
EF - Espectroscopia de Fluorescência  
ERG - Elementos de Resposta a Glicocorticóides  
FAD - Flavina-*adenina* dinucleotídeo  
GC - Glicocorticóide  
HE - Hematoxilina-eosina  
HpD - Derivados de Hematoporfirina  
Hsp - Proteínas de Choque Térmico  
IL - Interleucina  
LC1 - lipocortina-1  
NIH - National Institutes of Health  
NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NF- Kb - Fator nuclear kappa B  
m-THPC - Meso-tetra-(hidroxi fenil)-clorina  
nERG - Elementos responsivos negativos aos glicocorticóides  
PC - Principal Component  
PCA Principal Component Analysis  
PLA<sub>2</sub> - Fosfolipase-A<sub>2</sub>  
PVC - Cloreto de polivinila  
RG - Receptor de Glicocorticóide  
SnET2 - Etiopurpurina de estanho  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa  
UV-VIS - Ultravioleta visível

## Sumário

<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1. ANATOMIA E HISTOLOGIA DA PELE .....	13
1.2. GLICOCORTICÓIDES E ATROFIA CUTÂNEA.....	14
1.3. MÉTODOS PARA AVALIAR ATROFIA CUTÂNEA: ESTUDO HISTOLÓGICO E ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	20
<b>2 - OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>25</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 - METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
3.1. DESENHO DO EXPERIMENTO .....	26
3.2. LEITURA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	27
3.3. ESTUDO HISTOLÓGICO .....	29
3.4. ANÁLISE DOS PARÂMETROS ESPECTRAIS .....	32
3.4.1. <i>Espectros obtidos com laser de 532 nm</i> .....	32
3.4.2. <i>Espectros obtidos com laser de 408nm</i> .....	33
3.5. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS ( PCA).....	35
<b>4 - RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS .....	37
4.1.1. <i>Coloração HE</i> .....	37
4.1.2. <i>Coloração Picrosirius red</i> .....	42
4.2. RESULTADOS DA EF.....	44
4.2.1. <i>Análise dos parâmetros espectrais</i> .....	44
4.2.1.1. <i>EF com laser de 532nm</i> .....	45
4.2.1.2. <i>EF com laser de 408nm</i> .....	46
4.2.2. <i>Análise de Componentes Principais (PCA)</i> .....	47
4.2.2.1. <i>PCA da EF com laser de 532nm</i> .....	48
4.2.2.2. <i>PCA da EF com laser de 408nm</i> .....	49
<b>5 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## **1 – INTRODUÇÃO**

### ***1.1. Anatomia e histologia da pele***

A pele recobre a superfície do corpo externamente e corresponde, aproximadamente, a 16% do peso corporal. É constituída por uma porção epidérmica e outra dérmica (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008).

A epiderme, derivada da ectoderme, é representada por um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, avascular, com intensa atividade metabólica, com espessura média de 1mm na maior parte do corpo. Esse epitélio é composto principalmente por queratinócitos, que são substituídos continuamente por células que se formam a partir da atividade mitótica de células-tronco da camada basal da epiderme e migram em direção à superfície. Além dos queratinócitos, as outras células que compõem a epiderme são os melanócitos, as células de Langerhans (células dendríticas apresentadoras de antígenos) e as células de Merkel (células epidérmicas modificadas que estão em contato com terminações nervosas formando mecanoreceptores) (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008).

A derme é derivada da mesoderme e sua espessura pode chegar a 3mm. É subdividida em duas regiões: derme papilar e reticular. A derme papilar forma projeções cônicas alternadas com a epiderme (papilas dérmicas), aumentando a superfície de contato e permitindo melhor adesão a epiderme; sendo constituída por tecido conjuntivo frouxo formado por fibroblastos, dendrócitos, mastócitos, fibras colágenas (especialmente colágenos I e III) e fibras elásticas em disposição paralela à junção derme-epiderme. Na camada papilar, as fibras de colágeno se inserem por uma das extremidades à membrana basal e pela outra penetram profundamente na derme; contribuindo para conectar a derme à epiderme. A derme reticular é mais espessa, contém fibras colágenas paralelas à superfície cutânea, fibras elásticas finas e a região profunda dos apêndices cutâneos (foliculos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas), além dos plexos nervosos e vasculares, formando um tecido conjuntivo denso (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008). A derme é o maior reservatório de células-tronco adultas, localizadas especialmente na bainha do tecido conjuntivo perifolicular e nas papilas (SELLHEYER; KRAHL, 2010).

Nos seres humanos, como em alguns outros animais, a pele possui ainda uma terceira camada, o subcutâneo ou hipoderme, mais profunda, contígua à derme,

constituída essencialmente de fibras de tecido conjuntivo oriundas da derme e quantidade variável de células adiposas (Figura 1) (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008).

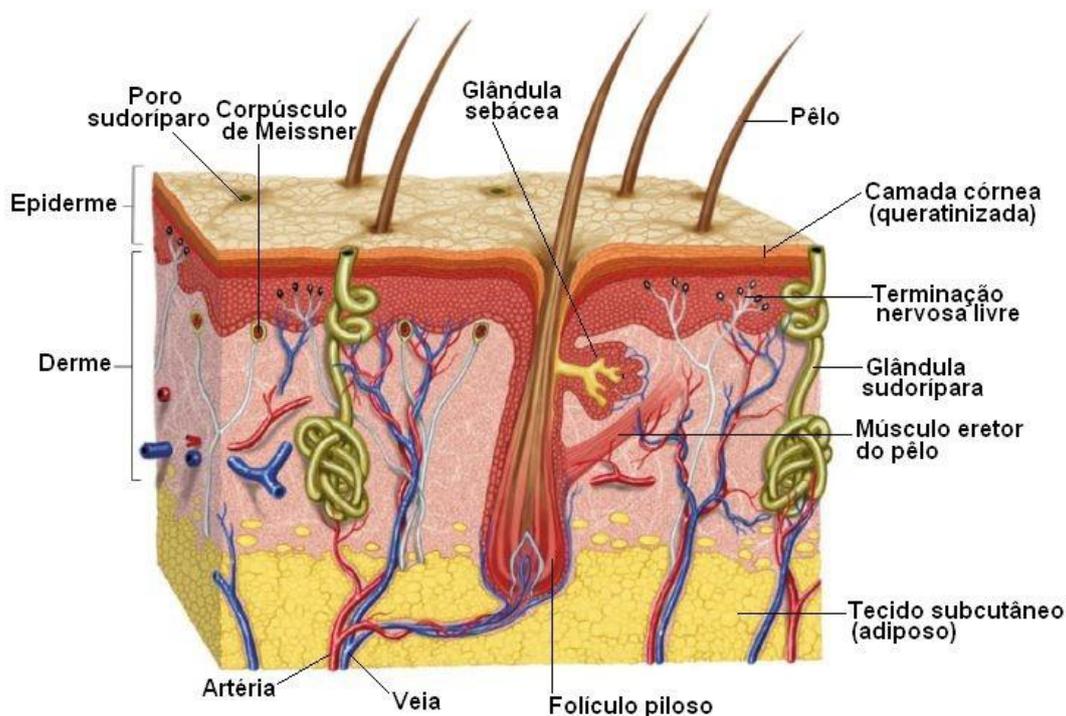


Figura 1. Fragmento de pele humana. Observar as camadas (epiderme, derme e hipoderme) e os diferentes anexos (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008).

## **1.2. Glicocorticóides e atrofia cutânea**

Os esteróides adrenais são um grupo de hormônios produzidos na região cortical das glândulas adrenais. Conforme sua ação, eles podem ser divididos em glicocorticóides, mineralocorticóides ou esteróides sexuais (BRAZZINI; PIMPINELLI, 2002). Os glicocorticóides (GC) têm ação sobre o metabolismo dos carboidratos, bloqueiam o processo inflamatório, suprimem a ativação do sistema imune e atuam como agentes inibidores de crescimento celular. Os mineralocorticóides, por sua vez, regulam os níveis de eletrólitos e água, principalmente por promoverem a retenção de sódio nos rins. Os esteróides sexuais interagem com receptores de andrógenos e estrógenos e são importantes para o aparecimento e manutenção de características sexuais primárias e secundárias (RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

O principal GC natural circulante no ser humano é o cortisol, que está envolvido em diversas funções fisiológicas (cardiovasculares, metabólicas, imunológicas e homeostáticas), modulando principalmente as repostas do organismo às situações de estresse. Sua síntese é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH),

secretado pela hipófise anterior em resposta à liberação do neuropeptídeo denominado fator liberador de corticotrofina (CRH), pelo hipotálamo. O metabolismo dos GC acontece no fígado e sua eliminação, na forma inativa, ocorre por via renal (CHAHADE; NEUBARTH; SZAJUBOK, 2008).

A ação dos GC nas células se dá pela sua ligação a um receptor protéico intracelular, o receptor de GC (RG), que pertence à superfamília dos receptores nucleares e age como um fator de transcrição, regulando a expressão dos genes responsivos aos GC. Em seu estado inativo, não ligado às moléculas de glicocorticóides, o RG está associado a proteínas regulatórias como p23, p59, e a proteínas de choque térmico como Hsp90 e Hsp70, formando um complexo multiprotéico que inibe sua ação (MCKAY; CIDLOWSKI, 2003).

Após a ligação com o GC, o receptor forma uma estrutura ativa, dissociando-se das proteínas regulatórias e deixando livre um domínio de ligação ao DNA. Esses complexos se associam como um homodímero que se liga a seqüências palindrômicas específicas de DNA chamadas Elementos de Resposta a Glicocorticóides (ERG), presentes geralmente na região promotora dos genes. Após se ligar ao ERG, o receptor ativo altera a transcrição de genes de diferentes maneiras, interferindo tanto na ação de cofatores transcrpcionais como também na ligação ao DNA dessa região (MCKAY; CIDLOWSKI, 2003). Uma vez que atuam na expressão de proteínas sintetizadas por esses genes, os glicocorticóides alteram algumas funções celulares, como, por exemplo, as respostas imunossupressora e antiinflamatória, e interferem nos mecanismos de proliferação celular.

A atuação do receptor ativo no DNA pode ser tanto de uma forma positiva (transativação) como negativa (transrepressão). É pela transativação que ocorre, por exemplo, a indução da síntese de proteínas antiinflamatórias, como a Lipocortina-1 (LC1) e as proteínas do complexo I $\kappa$ B quinase, e também de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico (por exemplo, proteínas que promovem gliconeogênese) (AHLUWALIA, 1998). Na transrepressão, ocorre ligação do RG a elementos responsivos negativos aos glicocorticóides (nERG), localizados na região promotora de genes específicos, como, por exemplo, o promotor do gene da proopiomelanocortina (CASTRO, 2005). Além dessa ação direta no DNA, os glicocorticóides podem atuar indiretamente ao interferir na atividade de outros ativadores transcrpcionais como o Ativador de Proteína 1 (AP-1) e o Fator Nuclear kappa B (NF-K $\beta$ ), através de uma ligação proteína-proteína. No primeiro caso, o RG interage fisicamente com um heterodímero de AP-1 formado pelas proteínas fos e jun, inibindo assim a ligação desse fator de transcrição ao DNA. No segundo caso, o RG

interage negativamente através de um mecanismo diferente; no qual o heterodímero formado por p50 e p65 do fator NF-Kb não é impedido de se ligar ao DNA, mas o que ocorre são alterações nas conformações destes, que impedem a interação com outros cofatores transcripcionais (Figura 2) (MCKAY; CIDLOWSKI, 2003).

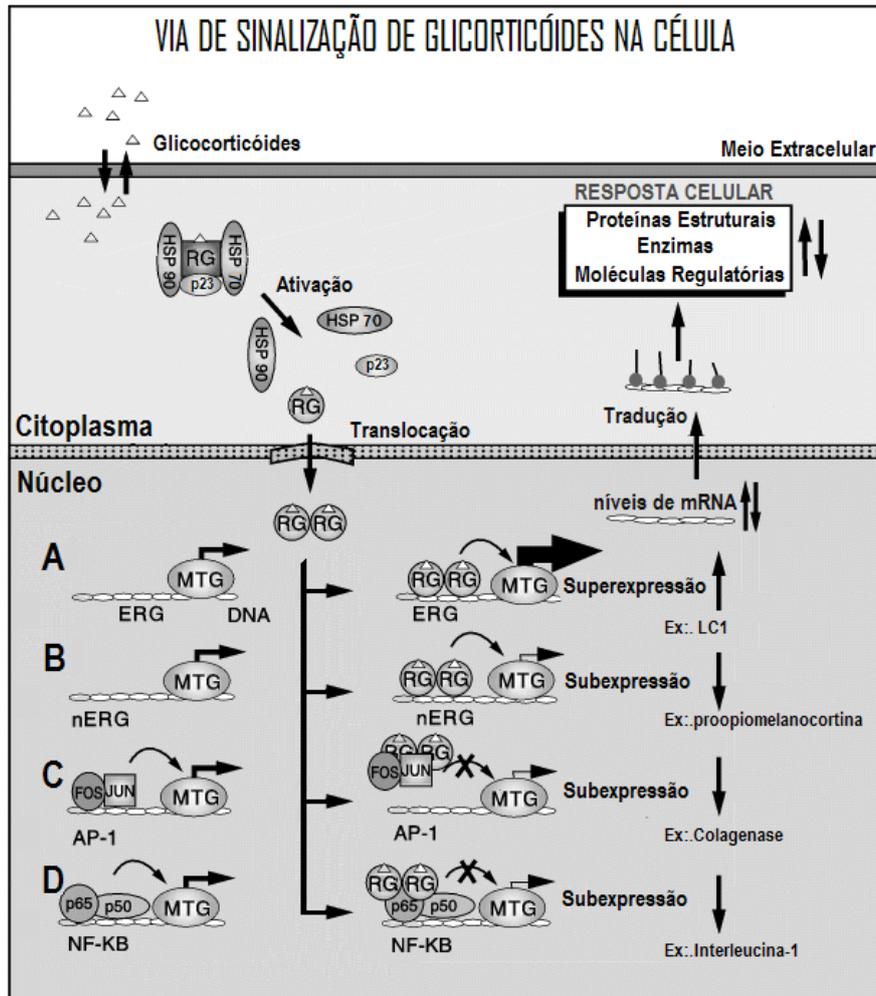


Figura 2. Diferentes mecanismos de ação dos glicocorticóides na célula, seja por ligação direta aos ERG levando a transativação (A) ou transrepressão (B), seja indiretamente por ligação proteína-proteína, impedindo os cofatores de transcrição de se ligarem ao DNA (C) ou alterando-os de tal forma que não se liguem aos demais fatores de transcrição (D) (MCKAY; CIDLOWSKI, 2003).

Em outro mecanismo, o RG pode aumentar a expressão da subunidade inibitória do NF-Kb, chamada I $\kappa$ B $\alpha$ .177 (MCKAY; CIDOWSKI, 2003). Por essa via, a síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 2 (IL-2), IL-6, IL-11, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandinas, também é reduzida (MCKAY; CIDLOWSKI, 1999; CHAHADÉ; NEUBARTH; SZAJUBOK, 2008).

Os GC interferem na síntese de prostanóides e do óxido nítrico, importantes mediadores da resposta inflamatória. Por transativação, os GC atuam induzindo a síntese de Lipocortina-1 (LC1), que age na cascata de produção do ácido araquidônico, reprimindo a enzima Fosfolipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), responsável pela conversão dos fosfolípidos da membrana celular em ácido araquidônico, e inibindo as enzimas Ciclo-Oxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2), que atuam no final da cascata produzindo prostaglandinas e vários prostanóides (Figura 3) (AHLUWALIA, 1998).

Os GC também impedem a indução do gene codificador da enzima COX-2 em monócitos, reduzem a ativação, a proliferação e a sobrevivência de eosinófilos e linfócitos T e B, diminuem a síntese de imunoglobulinas e impedem a ação da histamina e dos ativadores de plasminogênio (RHEN; CIDLOWSKI, 2005). Possuem ainda um efeito antiinflamatório adicional, que envolve a inibição da diferenciação de monócitos em macrófagos e da sua ação fagocítica e citotóxica nos tecidos inflamados (PEERS; FLOWER, 1991). Em sumo, existem muitas e complexas maneiras dos glicocorticóides atuarem gerando respostas celulares imunossupressoras e antiinflamatórias

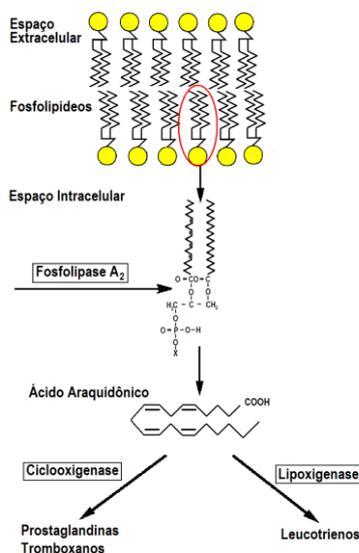


Figura 3. Cascata do ácido araquidônico que sintetiza os principais prostanóides da resposta inflamatória e é inibida pela ação da proteína LC1, cujo gene é transativado com a entrada de glicocorticóide na célula (AHLUWALIA, 1998).

A atrofia é uma forma de resposta adaptativa da célula a condições adversas impostas ao organismo. A função da atrofia é reduzir a demanda energética da célula para que ela sobreviva. O mecanismo que a célula utiliza para esse fim é, basicamente, a diminuição da síntese e o aumento da degradação de proteínas. Em

termos morfológicos, isso representa, num primeiro momento, diminuição do tamanho das células e da quantidade de organelas e, posteriormente, redução do número de células, quando as alterações celulares tornam-se irreversíveis levando à morte celular, geralmente induzida por apoptose (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2008). Na epiderme, o principal efeito é a redução e diminuição do tamanho dos queratinócitos, devido à redução da biossíntese das macromoléculas e a inibição da mitose. Na derme, também há adelgaçamento por conta da inibição da proliferação de fibroblastos em função da redução da taxa mitótica com conseqüente redução da produção de colágeno (LANGE et al, 2000).

A atrofia cutânea pode ser patológica ou fisiológica, como ocorre na senescência. Neste sentido, a conseqüência do envelhecimento cutâneo natural, que tem início a partir dos vinte anos, se dá por alterações progressivas na densidade, tonicidade, firmeza e elasticidade da pele. Essas alterações clínicas são decorrentes de uma série de alterações moleculares que acabam por alterar a fisiologia normal do tecido. A diminuição da produção, bem como o aumento da destruição das fibras de colágeno e elastina da derme, manifesta-se pela perda de firmeza e elasticidade cutânea, com conseqüente aparecimento de estrias e rugas. A renovação celular e a espessura cutânea encontram-se diminuídas. As glândulas sebáceas e sudoríparas deixam de produzir secreções em quantidade suficiente, prejudicando a formação do filme hidrolipídico que reveste e protege a pele, influenciando a hidratação e traduzindo-se em *secura cutânea*. A termorregulação, excreção de metabólitos e manutenção do pH também estão alterados pela redução do filme hidrolipídico, comprometendo, conseqüentemente, a função de barreira da pele. A diminuição da microcirculação sanguínea na derme papilar se traduz em perda de vitalidade da pele (ROBERT; LABAT-ROBERT; ROBERT, 2009).

Todos os GC, quando usados topicamente, causam atrofia da pele, embora em graus variáveis. Vários fatores influenciam o grau da atrofia, tais como: idade, local do corpo, potência do GC e a presença de oclusão (KOLBE et al., 2001; KORTING et al., 2002). A potência de um GC depende das características químicas e farmacológicas da molécula, da sua concentração no veículo e da natureza do veículo. A classificação americana dos GC considera 7 classes (I, II, III, IV, V, VI e VII), de potência decrescente, sendo a classe I a de maior potência. A classificação européia consiste em 4 classes (I, II, III e IV), de potência crescente, correspondendo à classe I a menor potência (COSTA; MACHADO; SELORES, 2005).

A atrofia cutânea induzida pelos GC é atribuída não só a ação supressiva do GC sobre a proliferação celular, mas também a inibição da expressão de genes do

colágeno (OIKARINEN; AUTIO, 1991; HENGGE et al., 2006). *In vivo*, verificou-se que a dexametasona, um GC da classe I (baixa potência, pela classificação europeia) reduz acentuadamente a quantidade de colágeno do tipo III e do tipo I em ratos (OISHI et al., 2002). Como esses tipos de colágeno são os mais abundantes na derme e são responsáveis pela resistência à tração cutânea, a sua deterioração é uma possível explicação para formação de estrias (SCHACKERT; KORTING; SCHAFFER-KORTING, 2000). Além disso, em resposta ao tratamento com dexametasona, há diminuição da expressão do promotor do colágeno VII, o que também pode contribuir para fragilidade cutânea (GRAS et al., 2001). Com a diminuição de expressão dos genes do colágeno, a resistência à ruptura e a elasticidade da epiderme diminuem, induzindo a degradação de proteínas da matriz extracelular (SCHOEPE et al., 2006).

Em resumo, o que se observa na atrofia cutânea induzida por glicocorticóide é reflexo de alterações histológicas como: redução do número de queratinócitos na epiderme e de fibroblastos na derme; diminuição da matriz extracelular; diminuição da síntese de lipídios epidérmicos, como ceramidas, colesterol e ácidos graxos; adelgaçamento do extrato córneo, seguido de um aumento da perda de água transepidérmica (Figura 4). O aspecto clínico caracteriza-se por aumento do brilho e da transparência da pele, que adquire consistência semelhante a “papel de cigarro”, acompanhado de aumento da fragilidade e adelgaçamento, que podem provocar ruptura da pele e aparecimento de púrpuras e telangiectasias (SCHOEPE et al., 2006).

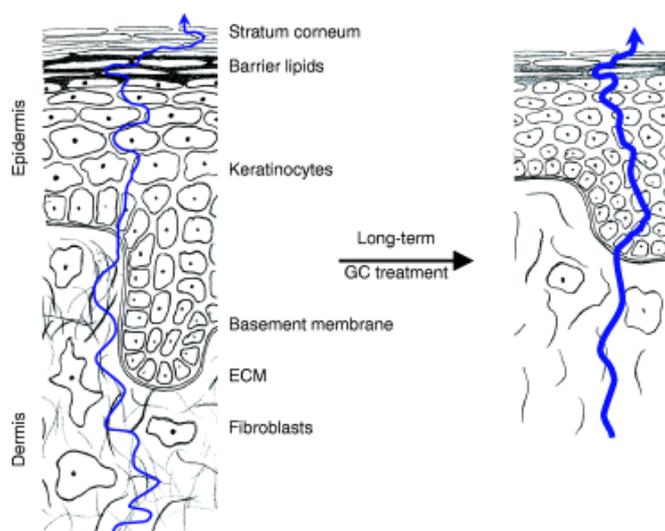


Figura 4. Efeitos cutâneos dos glicocorticóides. Observa-se redução da síntese de queratinócitos (epiderme) e fibroblastos (derme), além de diminuição da matriz extracelular (ECM) e de adelgaçamento do extrato córneo. A seta azul representa o aumento da perda de água transepidérmica (SCHOEPE et al., 2006).

O propionato de clobetasol (Figura 5), um GC classe IV (muito alta potência, pela classificação europeia) é o mais potente de todos os esteróides tópicos. É usado com sucesso no tratamento de várias doenças de pele como dermatite atópica, psoríase e líquen escleroso vulvar (PELS; STERRY; LADEMANN, 2008; FELDMAN et al., 2009). Os maiores efeitos adversos do clobetasol tópico são atrofia cutânea, com manifestações clínicas de adelgaçamento, telangiectasia, estrias e aumento da fragilidade da pele. Estudos experimentais em ratos demonstram que dez dias de clobetasol tópico são suficientes para induzir atrofia, com diminuição da expressão de queratinócitos, colágeno I e III (SCHOEPE et al., 2009).

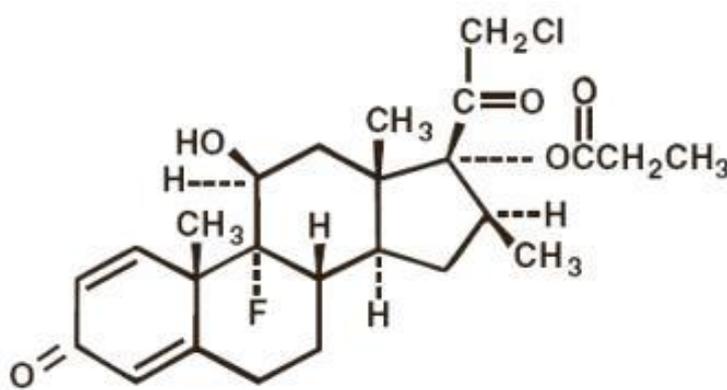


Figura 5. Molécula do Propionato de Clobetasol, (11 $\beta$ ,16 $\beta$ )-21-chloro-9-fluoro-11-hydroxy-16-methyl-17-(1-oxopropoxy)-pregna-1,4-diene-3,20-dione, C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>ClFO<sub>5</sub>.

### **1.3. Métodos para avaliar atrofia cutânea: estudo histológico e espectroscopia de fluorescência**

Estudos experimentais e clínicos já foram realizados, objetivando avaliar a atrofia cutânea após uso tópico de GC. Na década de 70, com base em uma técnica de Raio-X para avaliação de tecidos moles, descrita por Black em 1969 (BLACK, 1969), surgiram os primeiros estudos que mensuravam a atrofia dérmica induzida por GC por meio de um método radiológico (MARKS et al., 1975; JAMES et al., 1976; MARKS, 1976; SNYDE; GREENBERG, 1977). Em seguida, foram propostos vários métodos não invasivos para avaliar o potencial atrofogênico dos GC, fundamentados na ultrassonografia, utilizando principalmente, ultrassom de alta frequência, ultrassom B-scan e ultrassom pulsado (TAN et al., 1981; KERSCHER; KORTING, 1992; KORTING, 1993; LÉVY et al., 1994). Em 2001, Kolbe et al. relataram a microscopia confocal como um método não invasivo capaz de detectar adelgaçamento da epiderme, diminuição da microcirculação e redução do tamanho dos queratinócitos

após o uso de GC (KOLBE et al., 2001). A Tomografia de Coerência Óptica (OCT) também já foi recomendada como um método útil para monitorar a terapia tópica com GC e detectar efeitos colaterais no início do tratamento (COSSMANN; WELZEL, 2006) Entretanto, o método padrão para a avaliação e o diagnóstico da atrofia cutânea é o estudo histológico, que exige a realização de biópsia e posterior coloração do fragmento de pele estudado (KOLBE et al., 2001; NEWTON et al., 1984).

A biópsia e o estudo histológico são processos complexos. Muitas variáveis estão envolvidas para que o seu objetivo seja completamente atingido, ou seja, o diagnóstico seja correto e preciso. Desde o momento em que o dermatologista decide realizar uma biópsia de pele até aquele em que recebe a conclusão da análise microscópica, diversos fatores podem prejudicar o diagnóstico. Decisão quanto ao local anatômico e da lesão de que foi colhido o fragmento de pele, escolha da técnica de biópsia, identificação, manuseio e fixação do espécime, preenchimento da requisição do exame, análise macroscópica, processamento histológico e confecção das lâminas, estudo microscópico com formulação do diagnóstico e interpretação do resultado do laudo são etapas muito importantes, que influenciam diretamente no resultado final (WERNER, 2009).

Para o estudo histológico da pele é importante a utilização de corantes que possibilitem a detecção e a discriminação dos diferentes elementos que a constituem. A maioria dos corantes se comporta como corantes ácidos ou básicos, formando ligações eletrostáticas com os radicais iônicos dos tecidos. A coloração de hematoxilina-eosina (HE) é a mais antiga coloração combinada e representa a coloração histológica básica geral. Posteriormente, colorações especiais, específicas para um determinado tipo de tecido, célula, antígeno ou molécula podem ser realizadas. Na coloração HE o que age como corante é a hemateína, produto da oxidação da hematoxilina, que por sua vez necessita de um mordente (sais de alumínio, ferro ou tungstênio) prévio ou incorporado à solução de hematoxilina. A hematoxilina cora em azul (violeta) estruturas ácidas como o núcleo das células e a matriz da cartilagem hialina. A eosina cora em vermelho o citoplasma, as fibras colágenas e outras estruturas básicas (MICHALANY, 1998).

Na pele atrofiada, as características histológicas observadas com a coloração HE incluem adelgaçamento da epiderme, com redução do tamanho e número de queratinócitos. Além disso, há aumento dos espaços intercelulares, especialmente na membrana basal e atrofia de glândulas sebáceas, sudoríparas e dos folículos pilosos. Na derme, há diminuição da espessura das camadas papilar (superficial) e reticular (mais profunda), como exemplifica a Figura 6.

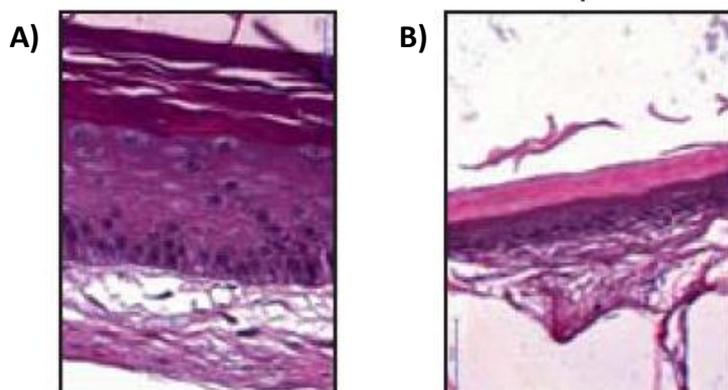


Figura 6. Fragmentos de pele de rato corados com HE (60x). A) Pele normal. B) Pele atrofiada após aplicação tópica de clobetasol por 12 dias. Observar redução da espessura da epiderme e da derme (SCHOEPE et al., 2010).

Colorações específicas, como o Picrosirius red permitem caracterizar melhor as fibras de colágeno presentes na derme. Nesta técnica, é possível visualizar as fibras de colágeno, devido à afinidade dos grupos catiônicos das proteínas pelos grupos aniônicos reativos do corante Sirius red F3BA. As moléculas do corante se dispõem paralelamente às moléculas de colágeno, que apresentam birrefringência assumindo cores que variam desde o verde até o vermelho, conforme o grau de maturação dessas fibras. As diferentes birrefringências podem ser observadas em microscópio óptico de luz polarizada. As fibras de colágeno I (maduro) se apresentam espessas, fortemente birrefringentes, de tonalidade avermelhada; enquanto o colágeno III é representado por fibras finas, fracamente birrefringentes, amarelo-esverdeadas (BORGES; TABOGA; GUTIERREZ, 2005; BORGES et al., 2007). Na pele atrofiada, há redução das ligações cruzadas das fibras colágenas, que se reorganizam em outra conformação (BRADSHAW et al., 2003).

Entre os promissores métodos de estudos não invasivos se destaca a espectroscopia. O termo espectroscopia é a designação para toda técnica de levantamento de dados físico-químicos através da transmissão, absorção ou refletância da energia radiante incidente em uma amostra. Originalmente, a espectroscopia designava somente o estudo da interação entre radiação e matéria como uma função do comprimento de onda ( $\lambda$ ). Posteriormente, o conceito foi expandido para compreender qualquer medida de uma grandeza como função tanto de comprimento de onda ou de frequência. Assim, este termo também pode se referir a uma resposta a um campo alternado ou frequência variável ( $\nu$ ). O tipo de

espectroscopia depende da grandeza física medida que, normalmente, é uma intensidade tanto da energia absorvida quanto da produzida (VOGEL et al., 2002).

A espectroscopia de fluorescência (EF) tem se destacado entre os possíveis métodos de diagnóstico *in vivo*, pois além de não invasiva, possui um pequeno tempo de resposta. A EF pode ser usada em uma análise quantitativa para elucidar características de tecidos vivos e relacioná-las com algum estado patológico (RAMANUJAM, 2000). A fluorescência induzida por laser tem desempenhado um papel importante no campo da medicina (DRAKAKI et al., 2007) e fornece a possibilidade de um diagnóstico em tempo real e não invasivo de patologias teciduais, entre elas tumores malignos, aterosclerose (ANDERSSON-ENGELS et al, 1990, ANDERSSON-ENGELS et al., 1991), câncer e lesões pré-cancerosas em epitélios de vários órgãos (WAGNIERES; STAR; WILSON, 1998). O principal motivo para essa utilização é o fato de que a fluorescência emitida por um tecido normal é diferente da de um tecido alterado, quando alterações bioquímicas e morfológicas relacionadas a patologia estão presentes.

Há dois tipos de fluoróforos no diagnóstico por EF: os fluoróforos endógenos e os exógenos. Entre os fluoróforos endógenos estão: aminoácidos aromáticos, proteínas estruturais (colágeno, elastina), enzimas e coenzimas (FAD, NADH, NADPH), vitaminas (A, K, D e do complexo B), alguns lipídeos e porfirinas (RAMANUJAM, 2000). Muitas vezes a fluorescência dos compostos endógenos é denominada autofluorescência. A maior parte dos fluoróforos exógenos são fotossensibilizadores desenvolvidos originalmente para terapia fotodinâmica (WAGNIERES; STAR; WILSON, 1998). Entre eles estão: derivados de hematoporfirina (HpD), derivados de benzoporfirina (BPD), meso-tetra-(hidroxi fenil)-clorina(m-THPC), etiopurpurina de estanho (SnET2), feoforbide-a e ftalocianina (WAGNIERES, STAR e WILSON, 1998). Esses fotossensibilizadores são empregados para o diagnóstico de lesões neoplásicas, dada a seletividade de interação com tecidos malignos; técnica conhecida como diagnóstico fotodinâmico.

Com excitação na região UV-VIS (<700nm), a luz penetra apenas superficialmente na pele (de algumas centenas de micrômetros a 1mm) devido ao fato desta região espectral ser altamente absorvida por biomoléculas (KOENIG et al., 1998). É natural que um único comprimento de onda excite muitos desses fluoróforos e, conseqüentemente, o sinal de muitos fluoróforos se sobreponham e se somem, uma vez que as bandas de emissão e absorção destas moléculas podem ser largas (DaCOSTA; WILSON; MARCON, 2003). Assim há a contribuição de muitos fluoróforos para o espectro de fluorescência, como resultado, o espectro de fluorescência de um

tecido biológico apresenta-se como uma banda larga de emissão. A presença de absorvedores altera o espectro de fluorescência, já que estes últimos podem absorver a radiação emitida por um fluoróforo e esta fluorescência não será detectada. O principal absorvedor nos tecidos é a hemoglobina (DaCOSTA; WILSON; MARCON, 2003), a qual absorve na faixa 400-700nm. Portanto, o espectro coletado em um tecido é resultado da contribuição de fluoróforos, absorvedores e espalhadores. Dada essa complexidade, a correlação entre o espectro coletado e o fluoróforo não é simples (VOGEL et al., 2002; VO-DINH et al., 2003).

É possível fazer a deconvolução do espectro (RAMANUJAM, 2000), a fim de se obter somente as emissões individuais de cada fluoróforo, entretanto isto envolve modelagem matemática-computacional e utilização de modelos para os tecidos biológicos. Alguns estudos usam simulação pelo método de Monte Carlo para construir modelos ópticos da pele (HAISHAN et al. 1996).

Autofluorescência da pele tem sido considerada para a detecção in vivo de várias condições clínicas, como envelhecimento (TAKEMA et al., 1997; KOLLIAS et al., 1998; SANDBY-MOLLER et al., 2004; STAMATAS et al. 2010), psoríase (GILLIES et al., 2000) e câncer de pele (NA et al., 2001; BRANCALEON et al., 2001; PANJEHPOUR et al., 2002; DRAKAKI et al., 2009; LEEUWM et al. 2009). Pelo nosso conhecimento, ainda não há registro na literatura de estudos que utilizem espectroscopia de fluorescência para avaliar a atrofia cutânea. A hipótese deste trabalho é que a EF pode ser um método para avaliação da atrofia cutânea em tempo real e de forma não invasiva. No intuito de testar esta hipótese, foi induzida atrofia em um modelo animal e, concomitantemente, foi feito o estudo histológico e a espectroscopia de fluorescência. O resultado do estudo histológico foi tomado como forma de calibrar o estudo espectroscópico.

## **2 - OBJETIVO GERAL**

Avaliação e comparação por distintas metodologias das alterações da atrofia cutânea induzida pelo uso tópico de propionato de clobetasol em um modelo experimental, *in vivo*.

### **2.1. Objetivos Específicos**

- ✓ Padronizar uma metodologia adequada para indução de atrofia cutânea por um glicocorticóide, que sirva de modelo experimental para esse e futuros estudos relacionados a pele atrófica.
- ✓ Comparar as principais mudanças histológicas e a qualidade do colágeno por meio da técnica de coloração Picrosirius red na pele normal e atrófica.
- ✓ Analisar através da espectroscopia de fluorescência segmentos de pele normal e atrófica, e comparar os espectros obtidos com os resultados do estudo histológico, buscando assim uma forma de avaliação não invasiva da atrofia cutânea.

### 3 - METODOLOGIA

#### 3.1. Desenho do experimento

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) de linhagem heterogênica, Wistar, com peso de 250-300g, num total de 20 animais adultos com 120 a 150 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFSCar, do Campus de São Carlos. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (3 animais por caixa), em ambiente com fotoperíodo de 12h (6-18h/18-6h) e temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Todos os experimentos foram realizados após 5 dias de adaptação dos animais às condições ambientais da sala de experimentação. Os animais tiveram livre acesso à água e comida. Para alimentação, foi utilizada a ração balanceada, comercial, Nuvilab CR-1 (Nuvital®), oferecida *ad libitum*.

O dorso de cada animal foi dividido em 2 regiões de 3x2cm, delimitadas com caneta cirúrgica, conforme Figura 7. No primeiro dia de experimento, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S.A.) em associação com o sedativo, analgésico e relaxante muscular xilazina (Coopazine®, Coopers Brasil Ltda). Uma vez anestesiados, os pêlos da área A0 foram retirados manualmente, foi feita EF e foram realizadas 3 biópsias por punch de 5mm nesta área, denominadas biópsias A, B e C do grupo controle. Após as biópsias, as regiões foram suturadas com fio mononylon 3-0. Em seguida, o creme de glicocorticóide propionato de clobetasol a 0,05% (CB), produzido e comercializado pelo laboratório Valeant S.A., foi aplicado topicamente, duas vezes por dia, durante 14 dias e espalhado sobre a área A1 com auxílio de dedo enluvado. No 15º dia, os animais foram anestesiados, os pelos da área A1 foram novamente retirados manualmente, foi feita EF e depois realizadas 3 biópsias por punch de 5mm nesta área (biópsias A, B e C do grupo 14 dias de CB).

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por aplicação intracardíaca de cloridrato de quetamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S.A.) em associação com o sedativo, analgésico e relaxante muscular xilazina (Coopazine®, Coopers Brasil Ltda). As carcaças foram descartadas no lixo hospitalar. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFSCar (protocolo n. 013/2008).



Figura 7. Foto do animal em posição para o experimento. A0) Avaliação por EF e posterior biópsia no primeiro dia (dia 1), sem uso de CB. A1) Avaliação por EF e posterior biópsia após 14 dias de CB (dia 15) (LEMOS, 2010).

### **3.2. Leitura por espectroscopia de fluorescência**

O sistema de espectroscopia de fluorescência utilizado foi desenvolvido pelo Grupo de Óptica do Instituto de Física da USP de São Carlos (Figura 8). Ele é composto por uma fonte de luz para excitação, uma sonda de investigação, um espectrofotômetro e um laptop. Duas fibras ópticas, cada uma com 600 $\mu$ m de diâmetro, estão posicionadas lado a lado dentro da sonda de investigação, sendo que uma conduz a luz de excitação e a outra coleta a luz re-emitida pelo tecido. O diâmetro da área de investigação é de 1,6mm e o diâmetro total da área que entra em contato com o tecido é de 3,2mm. Uma ponteira de alumínio, com diâmetro de 7,75mm, protege a sonda do manuseio clínico e evita exposição do tecido alvo à iluminação ambiente. O espectrofotômetro portátil USB 2000 (Ocean Optics, EUA) realiza a leitura entre 350 e 800nm.

Foram empregados dois sistemas laser de diodo, um emitindo ondas com comprimento de 408nm (violeta) e outro de 532nm (verde). O filtro passa-alta (longpass filter) foi selecionado de acordo com o comprimento de onda empregado: para 408nm utilizou-se o filtro em 435nm (GG435, Schott, EUA) e para 532nm, o filtro em 570nm (OGG570, Schott, EUA). O software do próprio aparelho (OOIBASE 32) foi utilizado para aquisição dos dados. Um laptop permitiu o monitoramento em tempo real dos espectros coletados e o armazenamento dos mesmos.



Figura 8. Sistema utilizado para aferição da Espectroscopia de Fluorescência (LEMOS, 2010).

Para investigação da EF nos animais, a pele das áreas A0 e A1 foi previamente higienizada com gaze embebida em soro fisiológico para remoção de restos de pelos e qualquer artefato que pudessem interferir na leitura. A sonda de investigação foi recoberta com filme de PVC e trocada a cada animal. A sonda foi posicionada em contato leve com a superfície a ser investigada, sem pressão contra o tecido e o mais perpendicularmente possível (Figura 9). Quinze espectros foram obtidos para cada comprimento de onda de excitação, em cada tempo de investigação. A coleta de cada espectro levou aproximadamente 3 segundos. Os tempos de avaliação da fluorescência foram realizados no primeiro dia (autofluorescência, anterior à aplicação de CB) e no 15º dia (após 14 dias de aplicação de CB). Os espectros foram analisados em função do laser de excitação empregado (532 e 408nm) e dos achados histológicos.



Figura 9. Exemplo de aferição da espectroscopia no comprimento da luz violeta (408nm) (LEMOS, 2010).

### 3.3. Estudo histológico

Para a análise histológica, cada um dos fragmentos obtidos na biópsia por punch foi imediatamente acondicionado em frasco individual, contendo solução tampão de formaldeído a 10%. Cada frasco foi identificado com o número do rato correspondente (1 a 20), o grupo ao qual a biópsia pertencia (controle ou 14 dias de CB) e o local da biópsia (A, B ou C). O material foi encaminhado ao laboratório em etapas, conforme a realização das biópsias.

No laboratório, os fragmentos de pele permaneceram de 8 a 10 horas nos frascos, para completa fixação dos tecidos. Foi realizado exame macroscópico, onde se mediu (em centímetros) a espessura de cada fragmento. Em seguida, os fragmentos foram submetidos a processamento histológico em equipamento automático (histotécnico Leica® TP 1020), para posterior inclusão em blocos de parafina. Durante o processamento histológico, a desidratação e diafanização dos tecidos foram promovidas pela utilização de álcool em concentração crescente e xilol (Tabela 1).

Tabela 1. Detalhamento dos reagentes e tempos do processamento histológico.

CUBA	REAGENTE	TEMPO DE IMERSÃO (horas)
Copo Becker 1	Álcool 95%	1:00
Copo Becker 2	Álcool 95%	1:00
Copo Becker 3	Álcool 95%	1:00
Copo Becker 4	Álcool absoluto	1:00
Copo Becker 5	Álcool absoluto	1:00
Copo Becker 6	Xilol	1:00
Copo Becker 7	Xilol	1:00
Copo Becker 8	Xilol	1:00
Estufa 1	Parafina	1:30
Estufa 2	Parafina	1:30

Preparados para inclusão, os fragmentos de pele foram emblocados em parafina, individualmente, e seccionados em micrótomo semi-automático Leica®, modelo RM2245, em fatias de 5µm. Foram feitos três cortes de tecido de cada bloco de parafina, que foram dispostos paralelamente sobre uma lâmina de vidro. Para cada

uma das biópsias, duas lâminas foram confeccionadas. Uma delas foi corada pela técnica clássica de hematoxilina e eosina (HE), como descrita na seqüência abaixo:

- 1) Xilol 5 minutos
- 2) Xilol 5 minutos
- 3) Álcool absoluto 2 minutos
- 4) Álcool 95% 2 minutos
- 5) Álcool 80% 2 minutos
- 6) Álcool 70% 1 minuto
- 7) Água corrente (lavagem)
- 8) Hematoxilina 20-40 segundos
- 9) Água corrente (lavagem)
- 10) Água de amônia imergir até azular
- 11) Água corrente (lavagem)
- 12) Eosina 1-2 minutos
- 13) Álcool 70% rapidamente
- 14) Álcool 80% rapidamente
- 15) Álcool 90% rapidamente
- 16) Álcool absoluto 5 minutos
- 17) Álcool absoluto 5 minutos
- 18) Xilol 5 minutos
- 19) Xilol 5 minutos
- 20) Montagem das lâminas com Entelan® para fixar a lamínula.

As lâminas coradas em HE foram codificadas (vendadas) e avaliadas em relação à presença ou ausência de atrofia, por dois observadores independentes, em microscópio óptico Olympus®, modelo Bx 41. As lâminas foram classificadas em: sem atrofia (zero), com atrofia leve (+) e com atrofia moderada/acentuada (++). As características observadas que permitiram esta classificação subjetiva foram: adelgaçamento e retificação da epiderme, redução do tamanho e número de queratinócitos, aumento dos espaços intercelulares, atrofia de glândulas exócrinas e folículos pilosos e diminuição da espessura das camadas papilar e reticular da derme.

Com o auxílio de microscópio óptico, acoplado à câmera de vídeo, foi feita a captura de imagens de todas as lâminas coradas em HE, com aumento de 200x, utilizando o sistema de análise digital de imagem Image Tool®, da Universidade do Texas, que transmite a imagem capturada do microscópio ao computador equipado

com placa digitalizadora, trabalhando em ambiente Windows. Em cada uma das imagens capturadas foi medida a espessura da epiderme, em micrômetros.

A segunda lâmina foi corada pela técnica de Picrosirius red, de acordo com a descrição de DANYAN et al. (1989), relatada abaixo:

- 1) Desparafinização e hidratação com água destilada
- 2) Encubação dos cortes por 1 hora à temperatura ambiente em Sirius red a 0,1%, em solução saturada de ácido pícrico.
- 3) Imersão em ácido acético a 1% por 30 minutos
- 4) Água destilada por 10 segundos, por 3 vezes (lavagem)
- 5) Hematoxilina de Mayer por 5 minutos
- 6) Diferenciação em ácido clorídrico a 1% em álcool a 70% por alguns segundos
- 7) Alcalinização por água corrente, 10 minutos (lavar)
- 8) Secagem e montagem da lâmina com Entelan® para fixar lamínula.

Estas lâminas foram examinadas em microscópio de luz polarizada, por uma médica patologista, e classificadas em dois grupos codificados como zero e um. As características observadas que permitiram esta classificação subjetiva são relativas ao arranjo das fibras colágenas, sua espessura, coloração e brilho. Desta forma, as lâminas consideradas com coloração uniforme avermelhada (zero) possuíam fibras colágenas delicadas, com arranjo uniforme e brilho normal. As lâminas consideradas com coloração amarelo-avermelhada (1) apresentavam fibras colágenas grosseiras, com arranjo irregular e brilho intenso.

As imagens dessas lâminas foram capturadas por câmara de vídeo Sony® CCD 101, transmitidas a um monitor colorido Trinitron Sony®, congeladas e digitalizadas. Utilizando o aplicativo ImageJ para Windows, desenvolvido pelo *National Institutes of Health* (NIH), a densidade da derme foi mensurada em pixels por polegadas (ppp).

Os resultados histológicos quantitativos (espessura dos fragmentos de biópsias, espessura da epiderme nas lâminas coradas com HE e densidade óptica da derme nas lâminas coradas com Picrosirius red) foram apresentados como média e desvio padrão. A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste t não-pareado. O nível de significância adotado foi de 5%.

### 3.4. Análise dos Parâmetros Espectrais

#### 3.4.1. Espectros obtidos com laser de 532nm

Na Figura 10 estão plotados alguns espectros de fluorescência obtidos com laser de excitação em 532nm; um exemplo de espectro de tecido normal, obtido do grupo controle, é apresentado na linha preta, e alguns exemplos de espectros de tecido atrófico, obtidos após 14 dias de tratamento com CB, são apresentados como linhas vermelhas.

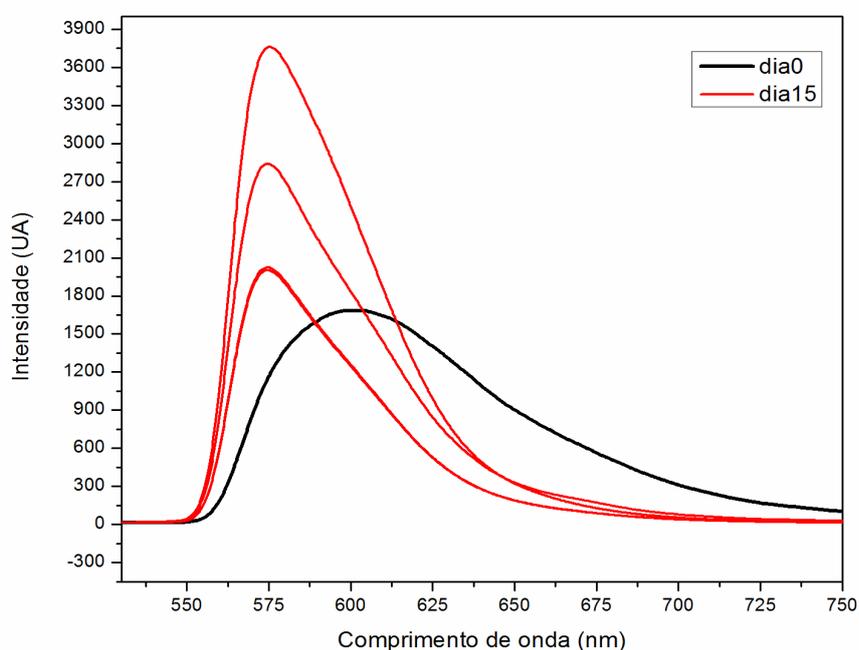


Figura 10. Exemplos de espectros obtidos com laser de 532nm. Há um exemplo de tecido normal (linha preta) e três exemplos de tecido atrófico (linhas vermelhas).

É possível observar que as principais diferenças entre os espectros do tecido normal e do tecido atrófico residem em três parâmetros:

- A intensidade máxima dos espectros é maior, geralmente, para o tecido atrófico quando comparado com o tecido normal.
- A largura da banda é mais estreita nos espectros de tecido atrófico quando comparados com os espectros de tecido normal.
- O máximo de intensidade nos espectros de tecido normal ocorre em um comprimento de onda próximo de 610nm. Nos espectros de tecido atrófico, este máximo ocorre em torno de 570nm.

Desse modo, os parâmetros avaliados em relação aos espectros obtidos com laser de 532nm foram: comprimento de onda correspondente ao máximo de intensidade ( $\lambda_{\max}$ ), intensidade máxima ( $I_{\max}$ ) e largura da meia altura ( $\Delta\lambda$ ). A largura da meia altura é a medida entre os pontos que assumem a metade da intensidade máxima. A Figura 11 esquematiza tais parâmetros. Quando os parâmetros espectrais dos grupos diferem significativamente entre si, então é possível correlacionar tais parâmetros com o estado morfológico do tecido.

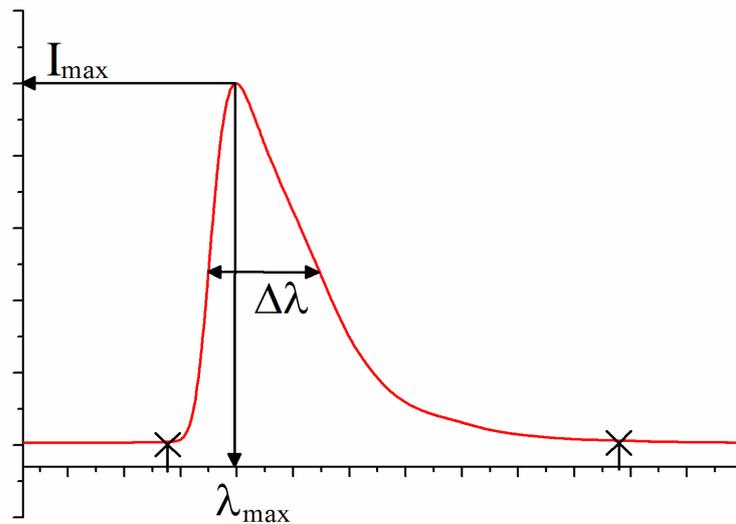


Figura 11. Parâmetros usados para avaliar os espectros de fluorescência com laser de excitação com emissão em 532nm: intensidade máxima ( $I_{\max}$ ), comprimento de onda do máximo ( $\lambda_{\max}$ ) e largura da meia altura ( $\Delta\lambda$ ). Os pontos assinalados com x representam os limites do intervalo espectral utilizado para Análise de Componentes Principais (PCA).

### 3.4.2. Espectros obtidos com laser de 408nm

O procedimento de comparação dos espectros de EF foi similar à análise descrita anteriormente, pois os espectros nessa EF também apresentaram uma tendência de comportamento. A Figura 12 exibe exemplos de espectro de tecido normal (linha preta) e de tecido atrófico (linhas vermelhas).

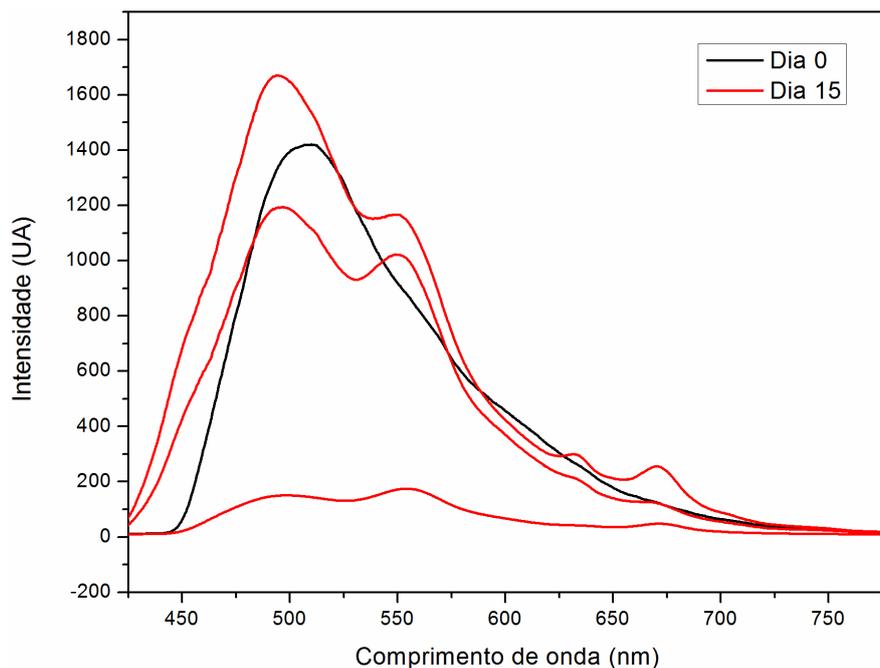


Figura 12. Exemplos de espectros obtidos com laser de 408nm. Há um exemplo de tecido normal (linha preta) e três exemplos de tecido atrófico (linhas vermelhas).

Os parâmetros avaliados neste tipo de EF foram diferentes dos avaliados nos espectros obtidos com laser de 532nm. Com laser de excitação com emissão em 408nm, em alguns espectros de tecido atrófico, foi possível observar o surgimento de três picos localizados aproximadamente em 557nm, 633nm e 670nm. O pico principal do tecido (tanto do tecido atrófico quanto do normal) ficou localizado aproximadamente em 510nm.

Desse modo, os parâmetros avaliados em relação aos espectros obtidos com laser de 408nm foram as intensidades relativas dos picos de 557nm, 633nm e 670nm em relação ao pico principal de 510nm. Para tanto, calculou-se a área sob cada um desses picos em um intervalo de aproximadamente 20nm centrado no máximo; a seguir foi calculada a razão entre as áreas dos picos secundários (557nm, 633nm e 670nm) e a área do pico máximo principal (510nm). A Figura 13 esquematiza os parâmetros avaliados nesta EF. Os parâmetros avaliados foram denominados  $R_{557}$ ,  $R_{633}$  e  $R_{670}$ . Em  $R_{557}$ , foi tomada a área sob a curva entre 546nm e 568nm. Em  $R_{633}$ , foi tomada a área sob a curva entre 623 e 644nm. Em  $R_{670}$ , foi tomada a área entre 660 a 681nm. A motivação desta análise é a mesma que a análise na EF com laser de excitação em 532nm: tentar correlacionar o estado morfológico do tecido com alguns destes índices ( $R_{553}$ ,  $R_{633}$  ou  $R_{670}$ ).

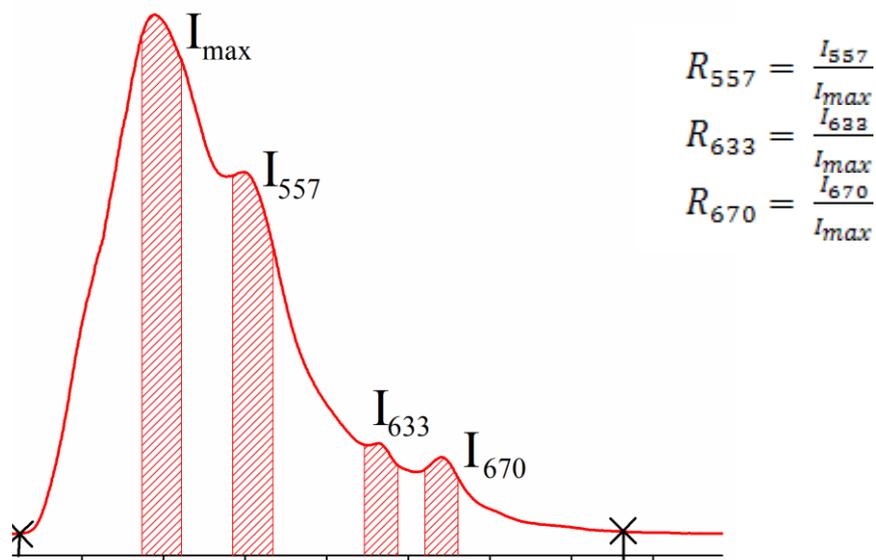


Figura 13. Parâmetros usados para avaliar os espectros de fluorescência com laser de excitação com emissão em 408nm. As áreas são os intervalos espectrais integrados para o cálculo dos parâmetros  $R_{553}$ ,  $R_{633}$  e  $R_{670}$ . Os pontos assinalados com x representam os limites do intervalo espectral utilizado para PCA.

### 3.5. Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) é uma técnica de análise multivariada cuja principal característica é a redução de dimensionalidade de um conjunto de dados (JOLLIFFE, 1986). Geralmente os conjuntos de dados multidimensionais possuem muitas variáveis que estão correlacionadas entre si, gerando um volume grande de dados e dificultando a interpretação direta. A PCA opera sobre o conjunto original de dados promovendo uma transformação em um novo conjunto cujas variáveis não possuem nenhuma correlação entre si, entretanto mantêm o quanto possível da variação do conjunto de dados original (JOLLIFFE, 1986). Estas variáveis são denominadas componentes principais (*principal component*, PC).

Os PC não possuem significado físico no sentido canônico, isto é, não são representantes de uma propriedade física do sistema. Estas são, na realidade, projeções dos dados originais em eixos que exibem a dispersão (variância) dos dados em ordem decrescente. Assim o primeiro componente principal é a projeção dos

dados em uma direção de maior variabilidade e, então, a que melhor a caracteriza no conjunto original de dados (JOLLIFFE, 1986). O segundo componente principal é a projeção dos dados na direção de segunda maior variabilidade, e assim por diante. O número máximo de componentes principais é igual ao número de variáveis no conjunto original de dados.

Nesse trabalho, a PCA foi utilizada objetivando a redução para dois componentes principais, de forma que os resultados possam ser representados em um gráfico bidimensional.

Um espectro de fluorescência é um conjunto de medidas da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda. Dessa maneira, pode-se partir para uma abordagem na qual cada comprimento de onda representa uma variável. O espectrofotômetro utilizado neste trabalho consegue gerar um espectro com 2048 pontos, isto é, podem ser distinguidos 2048 comprimentos de onda distribuídos entre 372 e 1046nm. Dependendo da luz de excitação e do filtro utilizado, nem todos estes comprimentos de onda possuem uma fluorescência significativa, ou um grupo de comprimentos de onda apresenta a mesma informação. Em muitos deles, a resposta é composta quase totalmente de ruído. Assim, apenas a parte do espectro que possui intensidade considerável foi utilizada para a Análise de Componentes Principais. Para os espectros obtidos com o laser de 532nm, apenas a região entre 532nm e 745nm foi utilizada. Para os espectros obtidos com o laser de 408nm, a região utilizada foi definida entre 409nm e 778nm. Esses limites foram obtidos analisando todos os espectros e determinando onde suas intensidades se aproximam de zero. Essa abordagem elimina de imediato variáveis não significativas que possam interferir na análise.

Para realização do PCA, foi utilizada a rotina princomp presente no MatLab®. Os gráficos de PCA foram gerados com MatLab® e foi escrita uma rotina para a importação dos espectros e outra para o processamento dos mesmos.

## **4 – RESULTADOS**

### **4.1. Resultados histológicos**

#### **4.1.1. Coloração HE**

O experimento foi iniciado com 20 animais e finalizado com 12 animais; a taxa de óbito foi de 40%.

Foram avaliados 60 fragmentos de pele de 20 ratos biopsiados no primeiro dia de experimento (biópsias controle A, B e C). Ao exame macroscópico, estes fragmentos apresentaram espessura entre 0,10 e 0,40cm. Outros 36 fragmentos foram avaliados no último dia de experimento (14 dias de CB, biópsias A, B e C). Após a aplicação de CB, a espessura dos fragmentos variou entre 0,10 e 0,30cm (Tabela 2). A média da espessura das biópsias ao exame macroscópico foi de  $2450 \pm 600 \mu\text{m}$  nas biópsias controle, e de  $2111,11 \pm 500 \mu\text{m}$  nas biópsias após 14 dias de CB. Pelo teste t não-pareado esta diferença é estatisticamente significativa ( $p=0,0043$ ).

Três animais (ratos 10, 11 e 12), cujos fragmentos de biópsia controle apresentavam-se menos espessos, evoluíram para óbito antes dos 14 dias de aplicação do glicocorticóide.

Nas Tabelas 3 e 4, observa-se a medida da espessura da epiderme, em micrômetros, realizada com o auxílio do programa Image Tool®, para as biópsias controle e as biópsias feitas após 14 dias de aplicação de CB.

A média da espessura da epiderme nas biópsias controle foi de  $44 \pm 9 \mu\text{m}$ . Após a aplicação do propionato de clobetasol a 0,05%, a média da espessura caiu para  $16 \pm 6 \mu\text{m}$ . Pelo teste t não-pareado esta diferença é estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

Não foi possível avaliar a espessura da epiderme em uma lâmina do grupo controle (Tabela 3, animal 20, biópsia controle B), e em três fragmentos de lâminas de animais distintos, após 14 dias de uso do glicocorticóide (Tabela 4, animal 05, fragmento B3; animal 08, fragmento B2; animal 09, fragmento C1). As razões para isso foram: no animal 20, grupo controle, fragmento B2, o tecido sobre a lâmina estava dobrado; nos demais fragmentos, artefatos técnicos de coloração impediram a adequada visualização do tecido.

Tabela 2. Medida, em milímetros, da espessura das biópsias ao exame macroscópico.

ANIMAL	CONTROLE (espessura da pele em $\mu\text{m}$ )			14 DIAS de CB (espessura da pele em $\mu\text{m}$ )		
	A	B	C	A	B	C
01	2000	3000	3000	Óbito		
02	3500	3000	3000	2000	1000	2000
03	2000	4000	2000	2500	3000	2000
04	3000	3000	3000	2000	2500	1500
05	2500	3000	2000	1500	2000	2000
06	3000	2000	2000	Óbito		
07	3000	3000	2000	2000	2000	2000
08	2500	2000	2000	2500	3000	3000
09	2000	2000	2000	2500	2000	2000
10	2000	2000	1500	Óbito		
11	2000	2000	1000			
12	2000	1000	2000			
13	2000	2500	2500	2000	2000	2000
14	3000	3000	2500	3000	1500	3000
15	2000	3000	3000	Óbito		
16	2500	2500	3000	2500	2000	2000
17	3000	3000	3000	Óbito		
18	2000	2000	2000	1500	2000	1500
19	3000	2000	2000	Óbito		
20	3000	2500	2000	2000	2000	2000
MÉDIA	2450,0			2111,11		
DESVIO PADRÃO	587,3			479,75		
ERRO PADRÃO	75,82			79,96		

Tabela 3. Medida, em micrômetros, da espessura da epiderme nas biópsias controle, em cada fragmento de tecido, de cada lâmina. (A1-A3: lâminas 1 a 3 da biópsia A; B1-B3: lâminas 1 a 3 da biópsia B; C1-C3: lâminas 1 a 3 da biópsia C).

ANIMAL	CONTROLE (espessura da epiderme em $\mu\text{m}$ – três medidas)								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
01	43,79	42,12	50,97	35,56	56,45	56,31	36,49	43,17	41,37
02	46,00	39,34	36,76	40,88	60,07	78,24	45,75	42,23	73,36
03	51,20	35,94	44,29	48,28	46,73	47,72	44,25	39,83	40,23
04	48,94	51,19	39,49	45,44	48,10	40,13	59,10	54,93	44,85
05	35,67	30,21	50,92	45,96	38,91	63,28	45,20	47,17	33,87
06	39,80	43,61	30,10	43,93	43,45	46,47	62,59	54,71	49,34
07	48,35	36,33	38,16	42,36	45,12	41,06	44,15	42,43	31,44
08	49,03	50,66	55,99	55,18	51,54	48,49	45,57	54,36	48,42
09	47,63	44,35	41,77	55,63	46,26	65,72	44,59	49,02	50,63
10	56,67	46,95	30,31	54,15	46,98	44,75	49,06	58,75	41,32
11	42,34	54,43	48,50	36,42	54,48	44,83	36,26	35,58	23,06
12	42,25	51,21	44,13	42,21	45,63	34,90	34,71	47,13	32,34
13	51,86	31,84	41,86	37,34	22,99	32,54	40,00	40,83	34,50
14	27,38	59,07	46,11	43,19	36,51	47,30	34,24	40,71	55,74
15	45,20	28,88	45,78	40,09	45,28	43,61	37,95	40,08	52,51
16	41,39	45,16	43,08	54,85	47,93	43,36	40,43	31,21	27,60
17	42,99	41,16	35,33	47,25	46,02	51,27	52,24	42,25	51,41
18	47,91	44,78	35,07	37,06	45,56	49,76	40,79	36,60	40,06
19	30,59	49,66	54,97	36,71	50,99	29,98	37,61	62,62	33,63
20	53,26	43,28	27,23				39,19	29,82	37,84
MÉDIA	44,30								
DESVIO PADRÃO	8,78								
ERRO PADRÃO	0,6602								

Tabela 4. Medida, em micrômetros, da espessura da epiderme, nas biópsias após 14 dias de aplicação de glicocorticoide, em cada fragmento de tecido, de cada lâmina. (A1-A3: lâminas 1 a 3 da biópsia A; B1-B3: lâminas 1 a 3 da biópsia B; C1-C3: lâminas 1 a 3 da biópsia C).

ANIMAL	14 dias de CB (espessura da epiderme em $\mu\text{m}$ – três medidas)								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
02	9,77	14,90	14,26	21,46	24,39	25,05	9,71	6,10	7,27
03	16,17	17,65	16,37	35,34	24,14	13,49	6,83	10,13	12,13
04	9,46	8,96	8,76	12,98	17,97	14,11	22,54	14,47	8,75
05	19,81	16,44	22,30	5,81	25,97		14,37	20,90	20,88
07	19,73	16,42	16,59	16,89	8,99	9,76	14,19	12,79	12,52
08	18,77	15,04	16,77	28,26		30,04	11,68	11,96	21,10
09	21,90	18,77	16,02	12,71	16,17	14,07		26,91	23,15
13	17,82	17,37	15,43	11,95	20,62	8,79	14,60	10,72	4,91
14	9,84	12,59	15,87	9,29	11,17	12,76	13,74	18,25	18,66
16	17,61	18,25	18,67	13,42	6,49	19,28	9,81	16,95	18,29
18	12,10	21,88	22,67	26,60	16,63	18,64	14,98	19,31	21,43
20	13,74	9,82	13,68	21,88	13,18	16,21	7,91	8,69	16,89
MÉDIA	15,81								
DESVIO PADRÃO	5,71								
ERRO PADRÃO	0,5569								

A análise qualitativa dos fragmentos está exemplificada na Figura 14 e detalhada na Tabela 5, onde se observa que após o uso de corticoide, houve redução da espessura da epiderme e da derme. A Tabela 5 apresenta a avaliação histológica no que diz respeito à presença ou não de atrofia. Nos fragmentos das biópsias realizadas no primeiro dia de experimento, duas lâminas, do mesmo rato (animal 20, biópsias A e C), foram interpretadas como tendo atrofia leve (+), as demais lâminas do grupo controle foram consideradas sem atrofia (0). Com a utilização do corticoide por 14 dias, a atrofia foi identificada em todos os ratos que sobreviveram até o final do experimento; no rato 08, em apenas uma das três lâminas (biópsia C), no rato 14 em duas das três lâminas (biópsias A e B) e no rato 18 em uma das três lâminas (biópsia C).

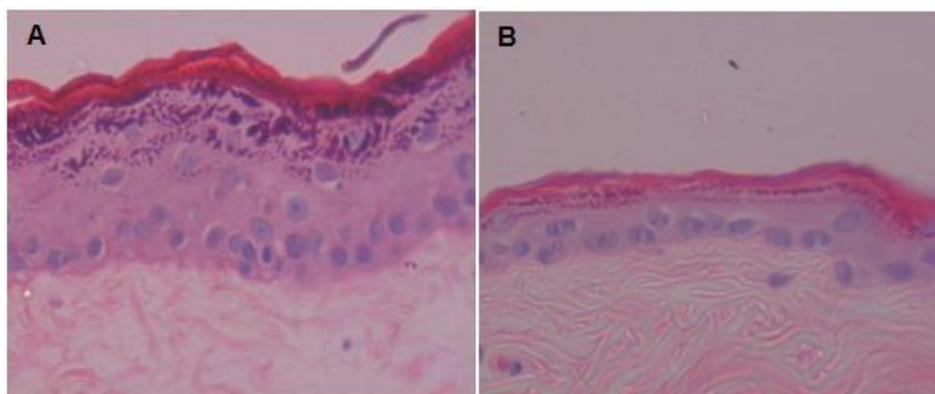


Figura 14. Fragmento de pele de rato Wistar (animal 04) corado com HE (100x). A) Pele normal. B) Pele atrofiada após aplicação tópica de clobetasol por 14 dias. Observar redução da espessura da epiderme e da derme papilar (LEMOS, 2010).

Tabela 5. Avaliação histológica da atrofia: zero (0) indica ausência de atrofia, (+) atrofia leve e (++) atrofia moderada/acentuada.

ANIMAL	CONTROLE			14 DIAS de CB		
	(avaliação histológica da atrofia)			(avaliação histológica da atrofia)		
	A	B	C	A	B	C
01	0	0	0	Óbito		
02	0	0	0	++	++	++
03	0	0	0	++	+	++
04	0	0	0	+	++	++
05	0	0	0	+		++
06	0	0	0	Óbito		
07	0	0	0	++	++	++
08	0	0	0	0	0	++
09	0	0	0	++	++	
10	0	0	0	Óbito		
11	0	0	0			
12	0	0	0			
13	0	0	0	++	++	++
14	0	0	0	++	++	0
15	0	0	0	Óbito		
16	0	0	0	++	++	++
17	0	0	0	Óbito		
18	0	0	0		0	++
19	0	0	0	Óbito		
20	+	0	+	++	++	++

#### 4.1.2. Coloração Picrosirius red

Em relação às lâminas coradas com Picrosirius red, observou-se, tanto nas biópsias realizadas no primeiro dia (controle), quanto naquelas realizadas após 14 dias de aplicação de corticóide, predomínio das fibras colágenas do tipo I. Mesmo após o uso do corticóide, as fibras do tipo III permaneceram escassas. Houve diminuição na espessura da derme como um todo, mas não houve mudanças significativas na densidade óptica das fibras colágenas após o uso do corticóide (controle:  $75000 \pm 5000$ ppp *versus* 14 dias:  $78000 \pm 5000$ ppp,  $p=0,2016$ ) (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de densidade óptica, em pixel por polegada (ppp) das fibras colágenas da derme, determinados pelo programa ImajeJ.

DENSIDADE ÓPTICA (ppp)	CONTROLE	14 DIAS de CB
Rato 02	69388	71666
Rato 03	71270	82068
Rato 04	80240	82918
Rato 05	78743	77261
Rato 07	79022	72215
Rato 08	79372	75992
Rato 09	75649	75675
Rato 13	83880	81931
Rato 14	69304	73165
Rato 16	73978	78088
Rato 18	66053	75896
Rato 20	74666	87690
MÉDIA	75130	77880
DESVIO PADRÃO	5350	4873
ERRO PADRÃO	1545	1407

A análise qualitativa dos fragmentos corados com Picrosirius red, no que diz respeito à distribuição das fibras colágenas, pode ser vista na Tabela 7. Em cinco animais (Tabela 7, ratos 05, 07, 08, 09 e 13) não houve mudanças consideradas expressivas na distribuição das fibras colágenas após 14 dias de uso de CB. Nos demais animais, observou-se rearranjo mais grosseiro e desorganizado das fibras colágenas nos fragmentos após o uso de corticóide, como exemplificado na Figura 15.

Tabela 7. Avaliação qualitativa das características das fibras colágenas da derme dos animais nos fragmentos controle e após 14 dias de uso de corticóide tópico. Zero (0) indica fibras com coloração uniforme avermelhada, (1) indica fibras com coloração amarelo-avermelhada.

<b>ANALISE QUALITATIVA DOS ANIMAIS</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>14 DIAS de CB</b>
Rato 02	0	1
Rato 03	0	1
Rato 04	0	1
Rato 05	0	0
Rato 07	0	0
Rato 08	0	0
Rato 09	0	0
Rato 13	0	0
Rato 14	0	1
Rato 16	0	1
Rato 18	0	1
Rato 20	0	1

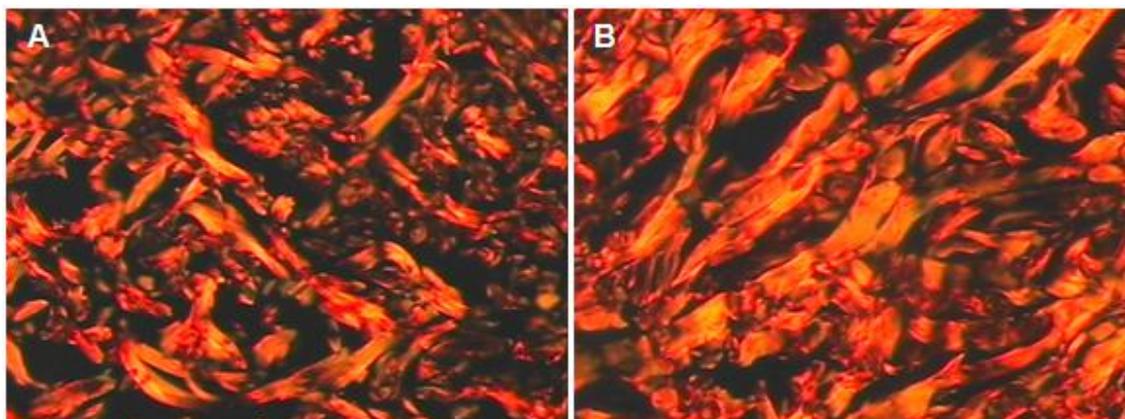


Figura 15. Fragmento de pele de rato Wistar (animal 03) corado com Picrosirius red (200x). A) Pele normal (codificada como 0 na tabela 7). B) Pele atrofiada após aplicação tópica de clobetasol por 14 dias (codificada como 1). Observar rearranjo mais grosseiro e desorganizado das fibras colágenas (LEMOS, 2010).

## 4.2. Resultados da EF

Para a análise dos resultados da EF, os espectros foram classificados em dois grupos, tomando como base a morfologia da pele, que foi definida como “normal” ou “atrófica”, conforme o estudo histológico. Na primeira análise dos espectros buscou-se avaliar parâmetros espectrais para os dois grupos (pele normal e atrófica), baseando-se em tendências apresentadas pelos espectros. Para uma abordagem mais robusta, paralelamente, foi usado o método de PCA.

A Tabela 8 mostra o número total de espectros coletados em função do método de EF empregado (408nm e 532nm) e da morfologia da pele (normal ou atrófica). Foram coletados, em média, 15 espectros por região de biópsia (A, B ou C) de cada animal em cada dia (dia zero e 14 dias após tratamento com CB) de cada EF (408nm e 532nm). Há, portanto, em média 45 espectros por animal por dia de avaliação. O animal 20 apresentou comportamento atrófico antes do tratamento com CB, o que sugere que ele talvez já tivesse alguma alteração na pele (Tabela 5). O animal 08 não apresentou atrofia em duas das três lâminas avaliadas (Tabela 5), o que sugere que não tenha sido induzida atrofia neste animal. Pelo fato de diferirem do comportamento histológico esperado, ambos os animais (08 e 20) foram excluídos tanto da análise de parâmetros espectrais como da PCA.

Tabela 8. Número de espectros coletados em função do método de EF empregado e do estado do tecido (normal ou atrófico).

<b>Laser 408nm</b>	Normal	487
	Atrófico	476
<b>Laser 532nm</b>	Normal	526
	Atrófico	476

### 4.2.1. Análise dos parâmetros espectrais

Embora uma tendência tenha sido observada nos espectros, nota-se grande variabilidade nos perfis destes. Vários fatores são responsáveis por essa variabilidade dos espectros, entre eles pode-se ressaltar a alta complexidade do tecido biológico, as diferentes respostas dos animais ao tratamento com CB, as diferenças entre os animais e as diferenças locais em um mesmo animal. Este fato é refletido nos parâmetros estudados, que, isoladamente, não permitem fazer distinção entre os

grupos de pele normal e atrófica. Porém, quando os parâmetros são analisados aos pares a distinção fica mais evidente. A análise dos parâmetros espectrais foi separada de acordo com a EF (532 ou 408nm). Para o laser de 408nm, dois parâmetros foram suficientes para fazer a distinção entre os grupos de pele normal e atrófica.

#### 4.2.1.1. EF com laser de 532nm

Foi escrita uma rotina em MatLab® para computar os três parâmetros espectrais avaliados: comprimento de onda correspondente ao máximo de intensidade ( $\lambda_{\max}$ ), intensidade máxima ( $I_{\max}$ ) e largura da meia altura ( $\Delta\lambda$ ). Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico (Figura 16), onde cada eixo corresponde a um dos parâmetros estudados.

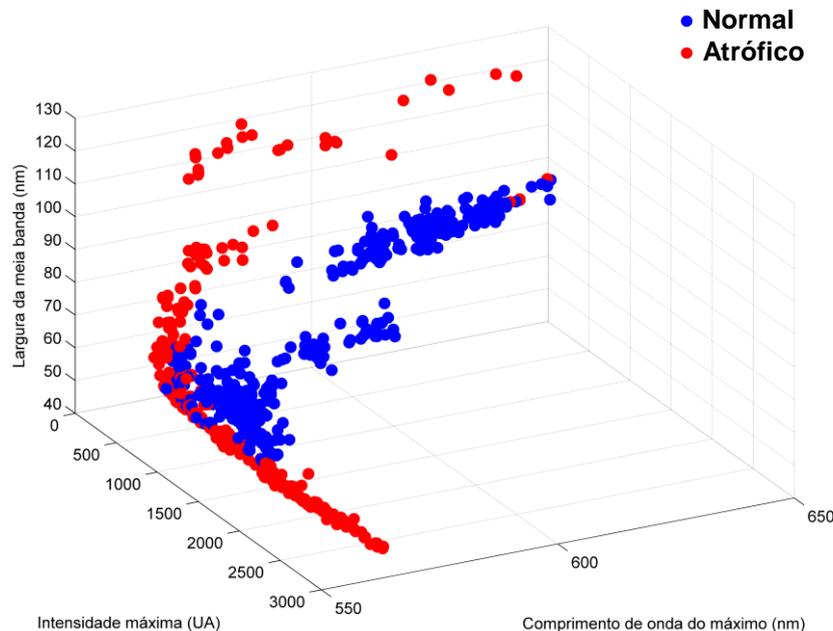


Figura 16. Resultados da avaliação de parâmetros espectrais ( $\lambda_{\max}$ ,  $I_{\max}$  e  $\Delta\lambda$ ) da EF com laser de 532nm. É notável uma tendência, porém há grande indistinguibilidade entre os grupos.

Embora os espectros de tecidos atróficos mostrem uma tendência de possuir o máximo entre 560 e 570nm, há muitos espectros cujos máximos estão fora desta faixa. O mesmo ocorre para os outros parâmetros espectrais. Mesmo avaliando os parâmetros aos pares não é possível separar totalmente os grupos normal e atrófico: há sempre uma sobreposição considerável desses grupos.

#### 4.2.1.2. EF com laser de 408nm

Foi escrita uma rotina em MatLab® para computar os três parâmetros espectrais avaliados:  $R_{557}$ ,  $R_{633}$  e  $R_{670}$ . Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico (Figura 17), onde cada eixo corresponde a um dos parâmetros estudados.

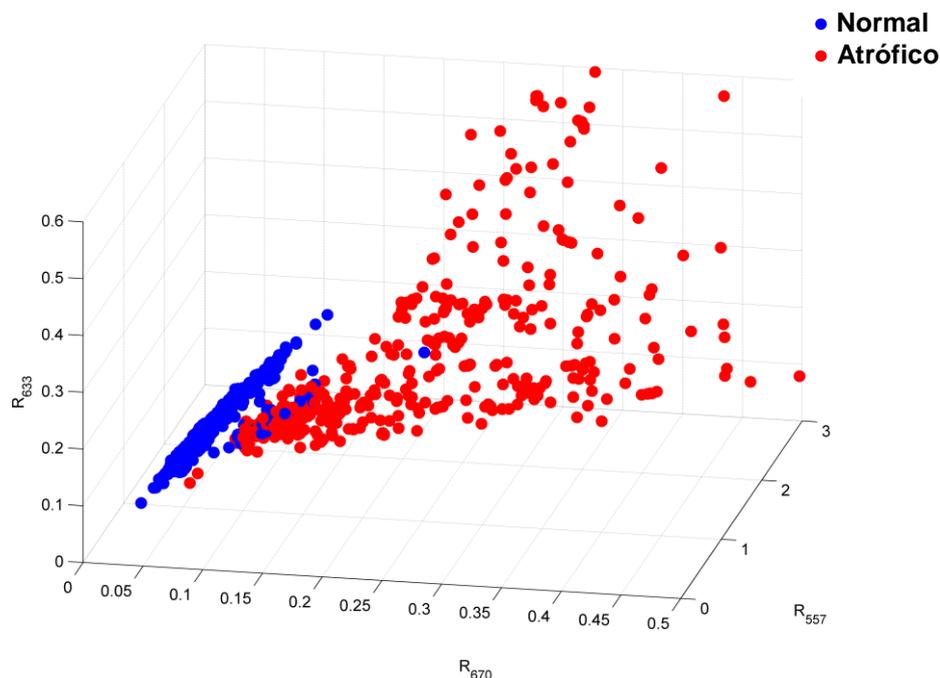


Figura 17. Resultados da avaliação dos parâmetros espectrais da EF com laser de 408nm. É notável a separação entre os grupos, principalmente quando os índices  $R_{633}$  e  $R_{670}$  são considerados.

Embora os espectros obtidos com laser de 408nm tenham apresentado entre si maior variabilidade do que os obtidos com 532nm, a avaliação dos parâmetros foi melhor para 408nm do que para 532nm. Quando avaliados em conjunto, os índices  $R_{633}$  e  $R_{670}$  permitem distinguir claramente entre os dois grupos de tecido normal e atrófico, como mostra a Figura 18.

Apesar da forte correlação entre os índices  $R_{633}$  e  $R_{670}$  e o tecido normal, ainda é possível identificar um conjunto de espectros que correspondem a tecido normal segundo a classificação histológica (pontos azuis), mas que estão na mesma região do grupo atrófico (pontos vermelhos). Tais espectros pertencem ao animal 09. A avaliação histológica deste animal, para o dia zero, resultou em tecido normal, como esperado. Da mesma forma, no 15º dia, duas das três lâminas foram classificadas como tecido atrófico (Tabela 5); uma das lâminas não pode ser avaliada devido a

dificuldades técnicas. Portanto não era esperado que os espectros de tecido normal deste animal recaíssem sobre o grupo dos atróficos.

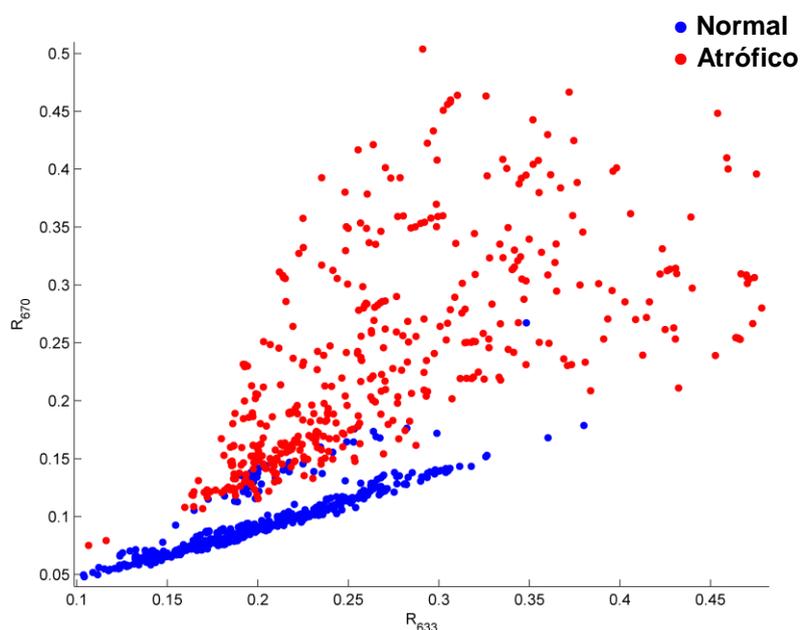


Figura 18. Índices  $R_{633}$  e  $R_{670}$ : A avaliação conjunta destes permite a clara distinção entre os grupos de tecidos normal e atrófico.

#### **4.2.2. Análise de Componentes Principais (PCA)**

A análise de parâmetros espectrais mostrou bons resultados para a EF em 408nm, entretanto os espectros apresentam grande variabilidade, o que tornou necessária a Análise de Componentes Principais (PCA).

A vantagem do uso da PCA nesse contexto é porque o método matemático elimina a subjetividade de encontro de padrões e todo o espectro é posto sob análise ao invés de apenas alguns parâmetros. Porém, uma vez que a PCA não é classificatória, não é possível concluir a análise sem um método de calibração. Em outras palavras, necessita-se de validação da informação gerada pela PCA, o que foi feito, nesse estudo, considerando os resultados histológicos das biópsias. Posteriormente, após definição de um algoritmo que identifique os padrões normal e atrófico, será possível a avaliação da técnica de EF com PCA para classificação da condição da pele.

#### 4.2.2.1. PCA da EF com laser de 532nm

Os espectros obtidos com laser de 532nm foram selecionados entre 532nm e 745nm, uma vez que, fora deste intervalo, as intensidades dos espectros eram desprezíveis (como descrito na metodologia). Os espectros foram, então, alocados em uma matriz e foi utilizada a rotina princomp do MatLab®. A Figura 19 mostra o resultado obtido para os dois primeiros componentes principais.

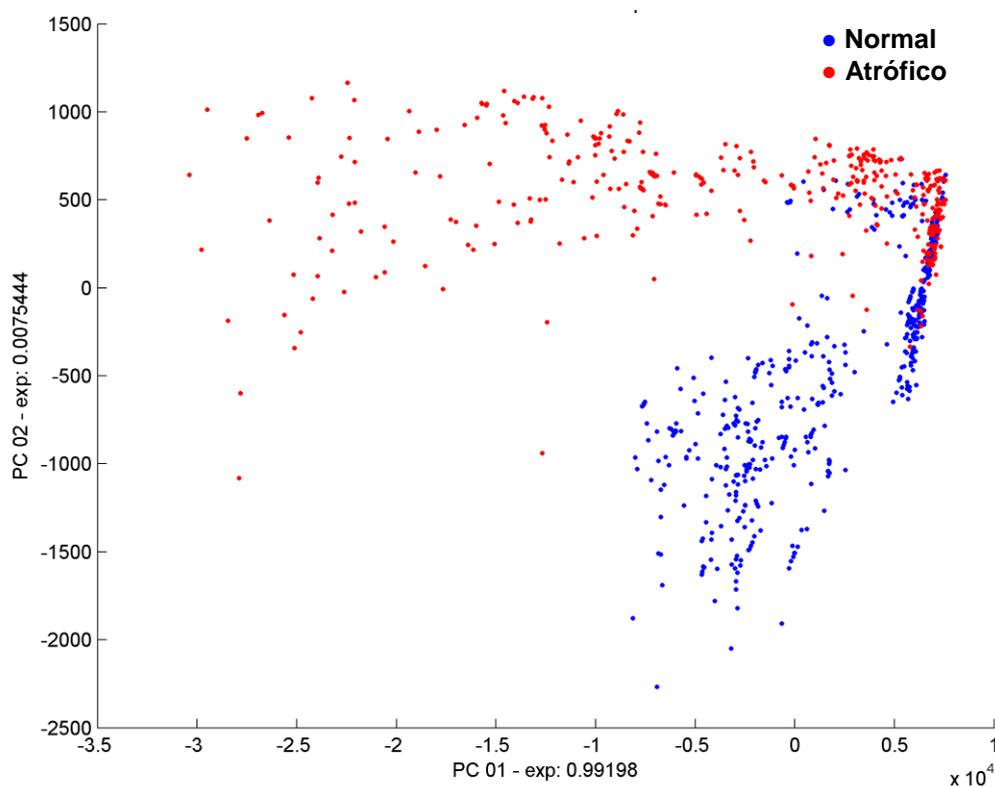


Figura 19. PCA para os espectros obtidos com laser de 532nm. O primeiro componente principal (PC01) explica 99,20% da variância do conjunto original de dados. O PC02 explica 0,7% da variância.

É possível fazer a distinção entre os grupos normal e atrófico, entretanto há uma região em que ocorre considerável sobreposição dos dados. A separação observada na PCA de 532nm é mais pronunciada do que aquela observada na análise de parâmetros espectrais para o laser de 532nm.

#### 4.2.2.2. PCA da EF com laser de 408nm

Nesta secção serão descritos os resultados da PCA para a EF com laser de excitação de 408nm. A figura 20 mostra o resultado obtido para os dois primeiros componentes principais.

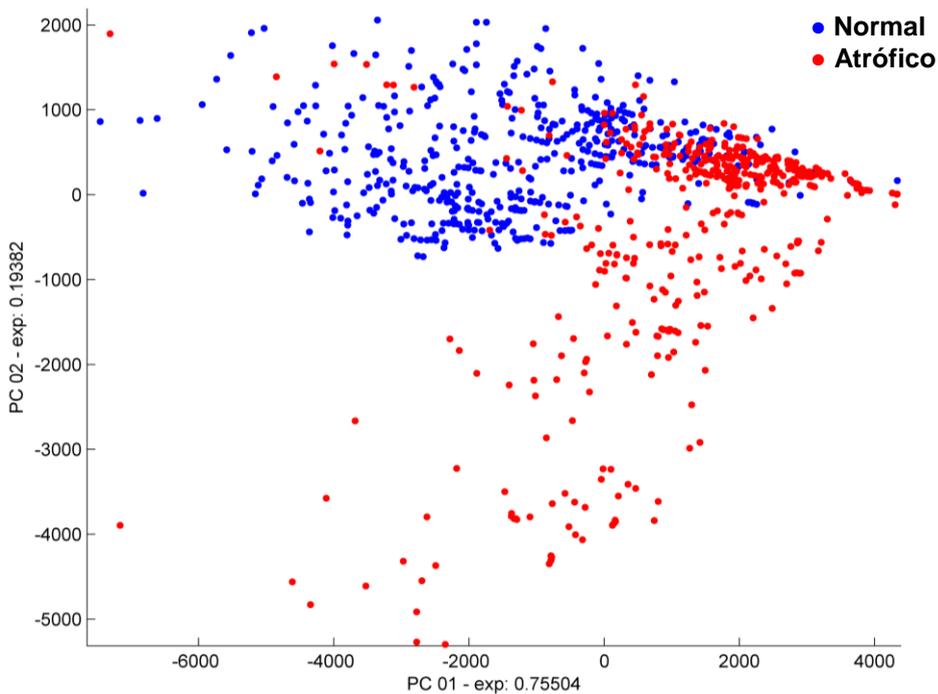


Figura 20. PCA para os espectros obtidos com laser de 408nm. O primeiro componente principal (PC01) explica 75,50% da variância do conjunto original de dados. O PC02 explica 19,4% da variância.

Novamente, é possível distinguir entre os dois grupos: em duas regiões no gráfico há predominantemente pontos de cada tipo (normal ou atrófico). Entretanto, mais uma vez, ocorre a sobreposição dos grupos e a resolução da separação é limitada.

## 5 – DISCUSSÃO

Análogos sintéticos de GC constituem uma classe de antiinflamatórios, amplamente utilizada no tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas há mais de 50 anos (JACKSON; GILCHRIST; NESBITT; 2007). Os excelentes efeitos terapêuticos dos GC como antiinflamatório e imunossupressor são, freqüentemente, acompanhados por graves e, algumas vezes, irreversíveis efeitos colaterais. Esses efeitos, que variam de acordo com o método de administração, o tempo de exposição à droga e a dose utilizada, podem incluir: diabetes mellitus, úlcera péptica, síndrome de Cushing com supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, osteoporose, atrofia cutânea, psicose, glaucoma, entre outros; ficando o uso dos GC limitado por estas implicações (HENGEE 2006). Quando administrados topicamente, os GC inibem a proliferação de fibroblastos, causando como principal efeito adverso a atrofia cutânea (STERRY; ASADULLAH, 2002). Além de ser o efeito colateral mais comum do uso tópico de GC, a atrofia cutânea é estudada por razões estéticas.

Para compreender melhor os mecanismos que levam a atrofia de pele induzida por GC, foram criados modelos *in vivo* que mimetizam esse indesejado efeito em animais como camundongos, ratos, porcos e cães; sendo possível obter resultados satisfatórios que reproduzem com sucesso as características clínicas e histopatológicas observadas no atrofiamento cutâneo em seres humanos, inclusive o enfraquecimento e a queda de pelo, que normalmente acompanham a atrofia (SHEU et al., 1998; SCHAKE et al., 2004; LAVKER et al., 1991; KIMURA; DOI, 1999). Animais sem pelos, modificados geneticamente, são muitas vezes os preferidos para os modelos de atrofia cutânea, pois não há necessidade de tricotomia, o que diminui a irritação da pele. Contudo, esses animais requerem cuidados especiais e são mais dispendiosos (SCHAKE et al., 2004). Além disso, ao se escolher um modelo experimental baseado em um animal sem pelo, não é possível avaliar o efeito de possíveis tratamentos na reversão da queda de pelos.

Para estudar o efeito de GC na pele, ensaios *in vitro* também são costumeiramente realizados, por serem de resposta rápida, pouco dispendiosos e possíveis de serem realizados com poucos componentes. É possível observar efeitos de GC na proliferação celular em culturas de fibroblastos e queratinócitos, contudo esses ensaios se distanciam bastante das condições fisiológicas normais do corpo humano, sendo pouco úteis para refletir todos os aspectos da atrofia cutânea no nível histológico (SCHOEPE et al., 2009; SCHOEPE, 2009).

No presente estudo, buscou-se uma metodologia adequada para indução de atrofia cutânea por glicocorticóide em rato Wistar, linhagem popular usada como modelo de estudo em várias situações. Os resultados histológicos, após 14 dias de aplicação tópica do glicocorticóide propionato de clobetasol a 0,05%, mostraram a progressão da atrofia na pele de todos os animais. A maioria das biópsias foi avaliada como tendo atrofia de grau moderado a acentuado, comprovando a eficácia do modelo animal para esse estudo. O diagnóstico da atrofia foi confirmado pela medição em micrômetros da espessura da epiderme, com o auxílio do programa Image Tool®, que permitiu analisar com rapidez e precisão as imagens documentadas das biópsias realizadas no primeiro dia e após 14 dias de tratamento com GC. Além da medição da espessura da epiderme, outros parâmetros já foram usados para avaliar atrofia cutânea em modelos animais: a contagem de camadas celulares das biópsias, a mensuração da perda de água transepidermal e a força necessária para ruptura da pele em biópsias (SCHOEPE, 2009). A padronização bem sucedida desse modelo experimental em rato Wistar permitirá o seu uso em outras pesquisas do nosso grupo, dando continuidade ao um projeto maior que busca investigar os efeitos de ligantes de hormônios tireoideanos no tratamento de atrofia cutânea e na queda de pelos, visando possíveis aplicações na área médico-farmacêutica.

A coloração de Picrosirius red, associada à microscopia polarizada, apresenta importante sensibilidade e especificidade na análise histológica das fibras colágenas

(MONTES; JUNQUEIRA, 1991) e tem sido utilizada para avaliar o processo de cicatrização de feridas da pele, sendo possível correlacionar a quantidade e a qualidade do colágeno com o resultado da cicatrização final (CUTTLE; NATAATNADJA; FRASER, 2005). Em 2003, esta técnica permitiu caracterizar as alterações na derme e na epiderme de ratas Wistar castradas e com hipotireoidismo, que apresentaram adelgaçamento da epiderme da região abdominal ventral, espessamento e aumento da celularidade na região torácica dorsal, com derme adelgada e desprovida de fibras elásticas e de colágeno do tipo III (FERREIRA et al., 2003). Em 2008, o estudo histológico com coloração Picrosirius red foi utilizado para analisar a disposição de fibras de colágeno tipos I e III em implantes labiais feitos com hidroxiapatita de cálcio (BERLIN; HUSSAIN; GOLDBERG, 2008). Em estudos sobre fibrose cardíaca (STEMPIEN-OTERO et al., 2006) e carcinomas (HATA et al., 2008), a coloração com Picrosirius red também se tem mostrado eficiente na análise das fibras colágenas.

No presente estudo, utilizou-se a coloração Picrosirius red para avaliar a quantidade e a qualidade do colágeno na pele com atrofia induzida por GC. Observou-se que, após 14 dias de clobetasol, a derme apresentava diminuição da espessura, com aumento do colágeno do tipo I, em detrimento do colágeno III, geralmente ausente. Em algumas biópsias classificadas como atróficas, as fibras colágenas apresentaram rearranjo mais grosseiro e desorganizado. Pareceu-nos que tais alterações foram decorrentes da compactação do colágeno tipo I pré-existente, conseqüente à redução da espessura da pele. Alguns trabalhos indicam decréscimos da quantidade de colágeno do tipo I e III em pele humana (AUTIO et al., 1994; PONEC et al., 1979) e em pele de ratos (SHULL; CUTRONEO, 1983; OISHI et al., 2002) com atrofia cutânea. Uma das causas apontadas para a redução dessas proteínas é o fato dos GC afetarem a síntese de colágeno indiretamente, por redução do prolil-4-hidroxilase (P4h), que cataliza a hidroxilação de resíduos de prolina em ligações

peptídicas e, portanto, estabiliza a estrutura de tripla hélice do colágeno. (CUTRONEO; STASSEN; CARDINALE, 1975; OIKARINEN; HANNUKSELA, 1980). As metaloproteínas de matriz extracelular (conhecidas como MMP), que participam do *turnover* do colágeno, podem também ser afetadas pelos GC. Em tratamentos com GC em humanos, por exemplo, o efeito do medicamento causa decréscimo na produção de RNAm e de proteínas MMP1 e MMP2 (OIKARINEN et al., 1998; KYLMANIEMI et al., 1996). Portanto, uma outra forma de investigar e quantificar as mudanças das fibras colágenas na atrofia cutânea pode ser o estudo da expressão do RNAm e da proteína colágeno na pele.

A pele é um dos tecidos mais investigados por meio da espectroscopia óptica, tanto na faixa do espectro visível, quanto no ultravioleta, por causa do fácil acesso e das diferentes propriedades ópticas decorrentes das diferenças de pigmentação. No entanto, a pele é um órgão complexo e heterogêneo composto por três camadas - epiderme, derme e hipoderme - com diferentes propriedades ópticas, o que dificulta a análise quantitativa da EF (DRAKAKI et al., 2009).

Os espectros de emissão de fluorescência são fortemente influenciados pela absorção, re-absorção e espalhamento de luz no tecido, o que varia de acordo com os fluoróforos presentes nas diferentes camadas da pele e com o estado metabólico do tecido (RAMANUJAM, 2000). O alcance da profundidade do tecido examinado depende do comprimento de onda utilizado. Tipicamente, a profundidade do laser é da ordem de 100 $\mu$ m nos menores comprimentos de onda do espectro visível (400nm) e de 700 $\mu$ m nos maiores comprimentos de onda (700nm) (KOLLIAS e STAMATAS, 2002).

Nesse trabalho, foram usados comprimentos de onda de 408nm, que penetra na pele cerca de 100 $\mu$ m, e 532nm, que penetra cerca de 300 $\mu$ m, o que significa que foi feita avaliação da derme, não da epiderme. Está bem determinado na literatura que com comprimentos de onda menores que 315nm o sinal de fluorescência emitido tem

origem na epiderme, enquanto que com comprimentos de onda maiores que 315nm a fluorescência tem origem dermal também (KOLLIAS e STAMATAS, 2002). Como a espessura da epiderme diminui consideravelmente mais rápido que a espessura da derme durante o tratamento com corticóide, seria melhor usar as frequências do espectro ultravioleta para avaliar os efeitos potenciais de atrofia causado pelo glicocorticóides. Embora, por refletirem alterações dérmicas, os comprimentos de onda usados nesse trabalho possam ser menos sensíveis para detecção precoce de atrofia induzida por GC, para que a técnica de EF possa ser aplicada na clínica o ideal é que sejam utilizados espectros de luz na faixa do visível (300 a 700nm), que têm menor potencial ionizante, evitando efeitos secundários indesejados do laser (ablação, queimaduras), o que justifica a escolha dos comprimentos de onda utilizados neste trabalho.

Estudos em humanos mostram que, com a excitação ultravioleta de 365nm, a profundidade de penetração ficou limitada entre 20-50 $\mu$ m (MASTERS et al., 1997) e o espectro tem um pico de 475nm (LOHMANN e PAUL, 1988; CHWIROT et al., 1998). Brancalion et al. (2001), utilizando laser de comprimento de onda de 295nm, encontraram um pico espectral de cerca de 340nm, e com laser de 350nm, o pico foi de 470nm. Bliznakova et al. (2007), investigando pele humana utilizando laser com comprimento de onda de 405nm, encontraram uma banda de emissão máxima próxima de 510nm, o que é muito parecido com o presente resultado quando utilizamos laser de excitação com emissão em 408nm e encontramos um pico espectral principal localizado aproximadamente em 510nm.

A origem da autofluorescência da pele não é totalmente compreendida. Vários autores sugerem que os principais fluoróforos endógenos responsáveis pelo autofluorescência da derme são as fibras cruzadas de colágeno e de elastina (Tabela 9), cujas fluorescências máximas estão em 460-490nm e 500-540nm, respectivamente (LEFFELL et al., 1988; CHWIROT et al., 1998; KOLLIAS e STAMATAS, 2002;

BLIZNAKOVA et al., 2007; DRAKAKI et al.,2009). Outros autores relacionaram a autofluorescência da pele principalmente ao NADH e ao FAD, que têm fluorescências máximas em torno de 440-460nm e 535nm, respectivamente (LOHMANN e PAUL, 1988; LOHMANN et al., 1991). Com o aumento da excitação do comprimento de onda, novos fluoróforos são envolvidos na formação da estrutura do espectro fluorescente.

Tabela 9. Lista dos principais fluóforos presentes na pele, com seus respectivos valores de excitação e emissão máximas\*.

Fluóforos endógenos	Descrição	Excitação máxima	Emissão máxima
Colágeno	Proteína estrutural	325, 360	400, 405
Fibras cruzadas de colágeno	Proteína estrutural	370	460-490
Elastina	Proteína estrutural	290, 325	340, 400
Fibras cruzadas de elastina	Proteína estrutural	420-460	500-540
Queratina	Proteína estrutural	370	460-500
FAD e Flavinas	Coenzima	450	535
NADH	Coenzima	290, 350	440, 460
Fosfolipídios	Lípidios	340-440	430-460, 540-560
Ceroíde e Lipofucsina	Lípidios	340-395	430-460, 540
Triptonano	Aminoácido	280, 295	345, 350
Tirosina	Aminoácido	275	300
Fenilalanina	Aminoácido	260	280
Vitamina A	Vitamina	327	510
Vitamina K	Vitamina	335	480
Vitamina D	Vitamina	390	480
Vitamina B6 Piridoxina	Vitamina	332, 340	400
Vitamina B6 Piridoxamina	Vitamina	335	400
Vitamina B6 Piridoxal	Vitamina	330	385
Vitamina B6 Ácido Piridoxico	Vitamina	315	425
Vitamina B6 5' Piridoxal Fosfato	Vitamina	330	400
Vitamina B12	Vitamina	275	305
Porfirinas	Porfirinas	400-450	630, 690

\* Adaptada de RAMANUJAM, 2000; KOLLIAS; STAMATAS, 2002; BLIZNAKOVA, 2007.

As diferenças espectrais observadas na pele com e sem atrofia, com laser de excitação com emissão em 532nm são muito pouco pronunciadas, com deslocamento do pico de fluorescência de 610nm na pele normal para 570nm na pele atrofiada, o que deve refletir alterações do metabolismo. Com o laser de comprimento de onda de 408nm, a característica da pele normal no máximo foi na região de 510nm; na pele atrofiada, além do pico espectral principal de 510nm, surgiram outros três picos de 557nm, 633nm e 670nm. Especialmente os picos de 633nm e 670nm se mostraram sensíveis para detectar a diferença entre pele normal e atrófica. Acreditamos que isso se deu porque, com a diminuição da espessura da pele, redução do número de queratinócitos, de fibras de colágenos e elastina, afrouxamento da MEC e diminuição do metabolismo tecidual, com conseqüente diminuição de FAD e NAD, o laser de 408nm detectou fluorescências de camadas mais profundas da derme, e mais elementos contribuíram para o sinal fluorescente, como as porfirinas, que têm emissão máxima entre 630-690nm (RAMANUJAM, 2000).

Com a EF, o melhor resultado obtido foi, sem dúvida, a avaliação de parâmetros espectrais com laser de 408nm. A linha magenta na Figura 21 mostra uma possível fronteira de decisão com base nesses resultados. Acima desta linha os espectros podem ser classificados como atróficos e abaixo dela como normais. Para aumentar mais ainda a precisão e certeza na tomada de decisão sobre atrofia ou não da pele avaliada, pode-se complementar essa análise com resultados da PCA, embora esta última deva ser somente usado para apoiar a conclusão obtida com base na análise de  $R_{633}$  e  $R_{670}$ .

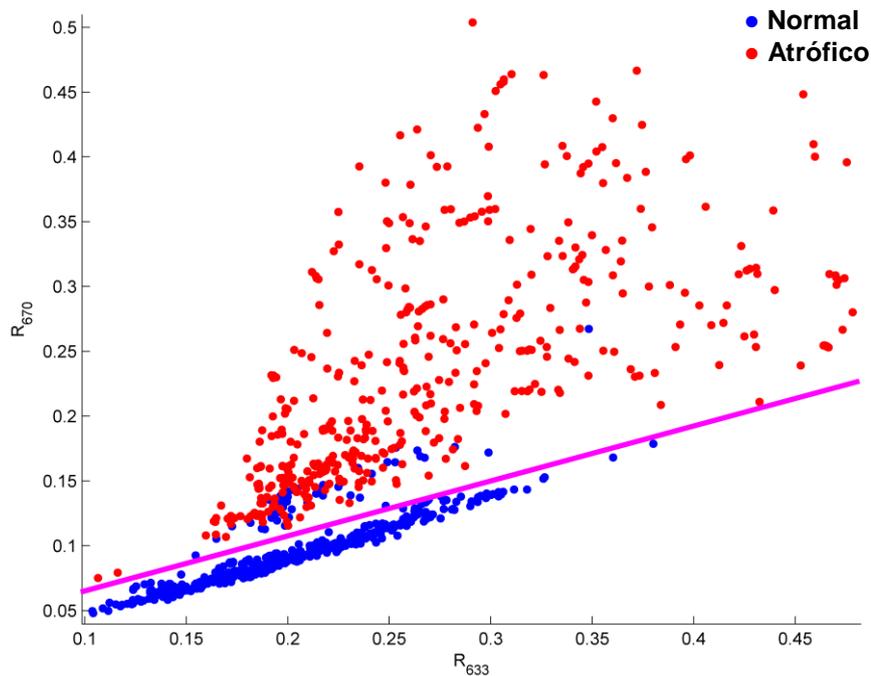


Figura 21. Avaliação dos índices  $R_{633}$  e  $R_{670}$ . A reta magenta mostra uma possível fronteira de decisão.

O estabelecimento de uma fronteira de identificação entre pele normal e atrófica, foi prejudicado, especialmente, pelo comportamento do animal 09, no qual alguns fragmentos considerados normais pela análise histológica, tiveram padrão espectral de pele atrófica. Nós acreditamos que é possível que os dados espectrais desse animal reflitam alterações metabólicas na derme que ainda não se manifestaram histologicamente, uma vez que as técnicas de diagnóstico baseadas em EF têm o potencial de reunir as propriedades bioquímicas e morfológicas do tecido (RAMANUJAM, 2000); e os sinais espectroscópicos podem indicar mudanças bioquímicas, que geralmente precedem as mudanças morfológicas (BAGNATO et al., 2010).

Com a PCA, foi possível fazer a distinção entre os grupos normal e atrófico tanto para os espectros obtidos com laser de 532nm, quanto para os espectros obtidos com laser de 408nm. Entretanto esta distinção não foi tão pronunciada e, em ambas

as PCA (532 e 408nm), há regiões de sobreposição dos grupos normal e atrófico, o que prejudica a classificação baseada nessa análise.

Apesar de não ter sido possível reconhecer um algoritmo com alto grau de resolução na identificação da atrofia, os resultados apresentados mostram o potencial da espectroscopia de fluorescência para essa avaliação. Serão necessários mais estudos para explicar como cada fluoróforo contribui para o espectro de fluorescência na pele normal e na pele atrófica, o que, por sua vez, contribuirá para um melhor entendimento da atrofia causada por GC. Uma vez entendido esse processo, a espectroscopia de fluorescência pode representar um importante passo para o avanço da detecção de efeitos colaterais e no monitoramento de tratamentos com uso de GC.

## 6 – CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostraram:

1. O uso do glicocorticóide propionato de clobetasol a 0,05% diariamente, durante 14 dias consecutivos, é capaz de induzir atrofia cutânea em ratos Wistar.
2. Em situações de atrofia cutânea há alteração na distribuição e no arranjo das fibras colágenas na derme, especialmente nas fibras de colágeno tipo I.
3. A análise dos espectros de fluorescência obtidos com laser de excitação em 532nm e 408nm aponta para uma possível distinção espectral entre pele normal e pele atrofica, com o comprimento de onda de excitação em 408nm sendo mais adequado para essa análise. No futuro, a espectroscopia de fluorescência poderá ser usada como método de diagnóstico complementar na área da dermatologia.

## 7 - REFERÊNCIAS

ANDERSSON-ENGELS, S. et al. Malignant Tumor and Artherosclerotic Plaque Diagnosis Using Laser Induced Fluorescence. *IEEE J. Quant. Electron.* v.26 n.12, p. 2207-2217, 1990

ANDERSSON-ENGELS, S. et al. Fluorescence Imaging and Point Measurements of Tissue: Applications to the Demarcation of Malignant Tumors and Atherosclerotic Lesions from Normal Tissue. *Photochem. Photobiol.* v.53 n.6. p. 807-814, 1991

AHLUWALIA, A. Topical glucocorticoids and the skin-mechanisms of action: an update. *Mediators of Inflammation.* n.7. p.183–193, 1998.

AUTIO, P. et al. Systemic glucocorticoids decrease the synthesis of type I and type III collagen in human skin in vivo, whereas isotretinoin treatment has little effect, *Br J Dermatol*, v.131, n.5, p.660-663, 1994.

BAGNATO, V.S. et al. New perspectives for optical techniques in diagnostic and treatment of hepatic diseases. *Acta Cirúrgica Brasileira.* v.25, n.2, p.214-216, 2010.

BERLIN, A.L.; HUSSAIN, M.; GOLDBERG, D.J. Calcium Hydroxylapatite Filler for Facial Rejuvenation: A Histologic and Immunohistochemical Analysis. *Dermatological Surgery*, v.34, p.64-67, 2008.

BLACK, M.M. A modified radiographic method for measuring skin thickness. *Br J Dermatol.*, v.81, n.9, p.661-666, 1969.

BLIZNAKOVA, A.L. et al. Laser- and Light-Induced Autofluorescence Spectroscopy of Human Skin in Dependence on Excitation Wavelengths. *Acta Physica Polonica A*, v.112, n.5 p.1131- 1136, 2007.

BORGES, L.F. et al. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron*, v.38, n.6, p.580-583, 2007.

BORGES, L.F.; TABOGA, S.R.; GUTIERREZ, P.S. Simultaneous observation of collagen and elastin in normal and pathological tissues: analysis of Sirius-red-stained sections by fluorescence microscopy. *Cell Tissue Res.*, v.320, n.3, p.551-552, 2005.

BRADSHAW, A.D. et al. SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J. Invest. Dermatol.*, v.120, n.6, p.949-955, 2003.

BRANCALEON, L. et al. In vivo Fluorescence Spectroscopy of Nonmelanoma Skin. *Photochemistry and Photobiology*, v.73, n.2, p.178-183, 2001.

BRAZZINI, B.; PIMPINELLI, N. New and established topical corticosteroids in dermatology: clinical pharmacology and therapeutic use. *Am. J. Clin. Dermatol.*, v.3, n.1, p.47-58, 2002.

CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. *Histologia básica*. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

CASTRO, M.D. Efeitos antiinflamatórios e antiproliferativos dos glicocorticóides: concordância ou discordância? *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.49, n.3, p.334-336, 2005.

CHAHADE, W.; NEUBARTH, R.D.; SZAJUBOK, J.C. M. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. *Einstein*, v.6, supl.1, p.159 -165, 2008.

CHWIROT, B.W. et al.; Detection of Melanomas by Digital Imaging of Spectrally Resolved Ultraviolet Light-induced Auto-fluorescence of Human Skin. *European Journal of Cancer*, v.34, n.11, p.1730 -1734, 1998.

COSSMANN, M.; WELZEL, J. Evaluation of the atrophogenic potential of different glucocorticoids using optical coherence tomography, 20-MHz ultrasound and profilometry; a double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Dermatol.*, v.155, n.4, p. 700-706, 2006.

COSTA, A.D.; MACHADO, S.; SELORES, M. Corticóides tópicos - Considerações sobre a sua aplicação na patologia cutânea. *Rev. Port. Clin. Geral*, v.21, p.367-373, 2005.

CUTRONEO, K. R.; STASSEN, F. L.; CARDINALE, G. J. Anti-inflammatory steroids and collagen metabolism: glucocorticoid-mediated decrease of prolyl hydroxylase, *Mol Pharmacol*, v.11 n.1, p.44-51, 1975.

CUTTLE, L.; NATAATNADJA, M.; FRASER J.F. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picosirius red. *Wound Rep Reg.* v.13, p.198-204, 2005.

DaCOSTA, R. S.; WILSON, B. C.; MARCON, N.E. Photodiagnostic Techniques for the Endoscopic Detection of Premalignant Gastrointestinal Lesions. *Digestive Endoscopy*, v.15, p. 153-173, 2003.

DANYAN, D. et al. Are the polarization colors of Picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*, v.93, n.1, p.27-29, 1989.

DRAKAKI, E. et al. Laser induced autofluorescence studies of animal skin used in modeling of human cutaneous tissue spectroscopic measurements. *Skin Research and Technology*, v.13 n.4 p. 350-359, 2007.

DRAKAKI, E. et al. Laser-Induced Fluorescence and Reflectance Spectroscopy for the Discrimination of Basal Cell Carcinoma from the Surrounding Normal Skin Tissue. *Skin Pharmacol Physiol*, v.22 n.3 p. 158-165, 2009.

FELDMAN, S.R. et al. Clobetasol propionate spray 0.05% add-on therapy to a stable regimen of biologic treatment in patients with moderate to very severe plaque psoriasis. *Cutis*, v.84, n.4, Suppl, p.25-32, 2009.

FERREIRA, E. Morfologia e histoquímica da pele de ratas hipotireóideas castradas e não castradas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.55, n.1,p.51-60, 2003.

GRAS, M.P. et al. Downregulation of human type VII collagen (COL7A1) promoter activity by dexamethasone. Identification of a glucocorticoid receptor binding region. *Exp. Dermatol.*, v.10, n.1, p.28-34, 2001.

GILLIES, R.; ZONIOS, G.; ANDERSON, R.R.; KOLLIAS, N. Fluorescence excitation spectroscopy provides information about human skin in vivo. *J Invest Dermatol.*, v.115, n.4, p.704-707, 2000.

HAISHAN, Z. et al. Reconstruction of in vivo skin autofluorescence spectrum from microscopic properties by Monte Carlo simulation. *Photochem. Photobiol.*, v.38, p. 234-240, 1996.

HATA, H. et al. Fibrous stroma and vascularity of pancreatic carcinoma: correlation with enhancement patterns on CT. *Abdom Imaging*, v.35, p.172–180, 2008.

HENGGE, U.R. et al. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.54, n.1, p.1-15; quiz 16-18, 2006.

JACKSON, S.; GILCHRIST, H, NESBITT, L.T., Jr; Update on the dermatologic use of systemic glucocorticosteroids. *Dermatologic therapy.*; v.20, p.187–205. 2007.

JAMES. M.P.; BLACK, M.M.; SPARKES, C.G. Proceedings: Measurement of dermal atrophy induced by topical steroids using a radiographic technique. *Br J Dermatol.*, v.95, supl. 14, p. 12, 1976.

JOLLIFFE, I. *Principal Component Analysis*. 1ª Edição. New York: Springer-Verlag New York Inc, 1986. 271p.

KERSCHER, M.J.; KORTING, H.C. Topical glucocorticoids of the non-fluorinated double-ester type. Lack of atrophogenicity in normal skin as assessed by high-frequency ultrasound. *Acta Derm Venereol.*, v.72, n.3, p.214-216, 1992.

KIMURA, T.; DOI, K. Dorsal skin reactions of hairless dogs to topical treatment with corticosteroids, *Toxicol Pathol*, v.27, n.5, p. 528-35, 1999.

KOENIG, F. et al. Autofluorescence Guided Biopsy for the Early Diagnosis of Bladder Carcinoma. *J. Urol.* , v.159 n.6, p.1871-1875, 1998.

KOLBE, L. et al. Corticosteroid-induced atrophy and barrier impairment measured by non-invasive methods in human skin. *Skin Res. Technol.*, v.7, n.2, p.73-77, 2001.

KOLLIAS, N.; GILLIES, R.; MORAN, M.; KOCHEVAR, I.E.; ANDERSON, R.R. Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging. *J Invest Dermatol.*, v.111, n.5, p.776-780, 1998.

KOLLIAS N.; STAMATAS GN.; Optical Non-Invasive Approaches to Diagnosis of Skin Diseases. *Optical Diagnostics in Dermatology.*, v.7, n.1, p.64-75, 2002.

KORTING, H.C. Topical glucocorticoids and thinning of normal skin as to be assessed by ultrasound. *Curr Probl Dermatol.*, v.21, p.114-121, 1993.

KORTING, H.C. et al. Different skin thinning potential of equipotent medium-strength glucocorticoids. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, v.15, n.2, p.85-91, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. *Robbins e Cotran: Patologia: bases patológicas das doenças*. 8<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 1480p.

KYLMANIEMI, M. et al. Effects of dexamethasone and cell proliferation on the expression of matrix metalloproteinases in human mucosal normal and malignant cells, *J Dent Res*, v.75, n.3, p.919-926, 1996.

LANGE, K. et al. Cutaneous inflammation and proliferation in vitro: differential effects and mode of action of topical glucocorticoids, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* v.13, n.2, p. 93-103, 2000.

LAVKER, R. M. et al. Hairless micropig skin. A novel model for studies of cutaneous biology, *Am J Pathol*, v.138, n.3, p. 687-97, 1991

LEEUWM, J.D. et al. Fluorescence Detection and Diagnosis of Non-Melanoma Skin Cancer at an Early Stage. *Lasers in Surgery and Medicine* ,v. 41, p. 96-103, 2009.

LEFFELL, J.D. et al. In vivo fluorescence of human skin. A potential marker of photoaging. *Arch Dermatol*, v. 124 n.103, p.1514-1518, 1988.

LÉVY, J. et al. Comparison of the effects of calcipotriol, prednicarbate and clobetasol 17-propionate on normal skin assessed by ultrasound measurement of skin thickness. *Skin Pharmacol.*, v.7, n.4, p.231-236, 1994.

LOHMANN, L.I.; PAUL, J.A. In situ detection of melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften*, v.75, n.4, p.201-202, 1988.

LOHMANN, L.I et al. In situ differentiation between nevi and malignant melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften*. v.78, n.10, p.456-457, 1991

MASTER, K. et al. Multiphoton Excitation Fluorescence Microscopy and Spectroscopy of In Vivo Human Skin, *Biophys J*. v.72, n.6, p. 2405- 2412, 1997.

MARKS, R.; DYKES, P.J.; ROBERTS, E. The measurement of corticosteroid induced dermal atrophy by a radiological method. *Arch Dermatol Res.* v.253, n.2, p.93-96, 1975.

MARKS, R. Methods for the assessment of skin atrophogenicity of topical corticosteroids. *Dermatologica*, v.152, n.1, p. 117-126, 1976.

MCKAY, L.I.; CIDLOWSKI, J.A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.*, v.20, n.4, p.435-459, 1999.

MCKAY, L.I.; CIDLOWSKI, J.A. Corticosteroids. In Kufe DW et al. (ed). *Cancer Medicine 6*. Hamilton: BC Decker Inc, 2003. p. 927–938.

MICHALANY, J. *Técnicas histológicas em anatomia patológica*. 3ª Edição. São Paulo: Artes Médicas, 1998. 295p.

NEWTON, J.A. et al. A comparison of pulsed ultrasound, radiography and micrometer screw gauge in the measurement of skin thickness. *Curr. Med. Res. Opin.*, v.9, n.2, p.113-118, 1984.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v.86 n.3, p.1-11, 1991.

NA, R.; STENDER, I.M.; WULF, H.C. Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence. *Acta Derm Venereol.*, v.81, n.4, p.246-249, 2001.

OIKARINEN, A. et al. The molecular basis of glucocorticoid-induced skin atrophy: topical glucocorticoid apparently decreases both collagen synthesis and the

corresponding collagen mRNA level in human skin in vivo, *Br J Dermatol*, v.139 n.6, p.1106-1110, 1998.

OIKARINEN, A.; AUTIO, P. New aspects of the mechanism of corticosteroid-induced dermal atrophy. *Clin. Exp. Dermatol.*, v.16, n.6, p.416-419, 1991.

OIKARINEN, A.; HANNUKSELA, M. Effect of hydrocortisone-17-butyrate, hydrocortisone, and clobetasol-17-propionate on prolyl hydroxylase activity in human skin, *Arch Dermatol Res*, V.267, n.1, p.79-82, 1980.

OISHI, Y. et al. Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Br. J. Dermatol.*, v.147, n.5, p.859-868, 2002.

PANJEHPOUR, M.; JULIUS, C.E.; PHAN, M.N.; VO-DINH, T.; OVERHOLT, S. Laser-induced fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of non-melanoma skin cancers. *Lasers Surg Med.*, v.31, n.5, p.367-373, 2002.

PEERS, S.H.; FLOWER, R.J. Site of anti-inflammatory action of dexamethasone in rabbit skin. *Eur. J. Pharmacol.*, v.196, n.1, p.37-41, 1991.

PELS, R.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Clobetasol propionate--where, when, why? *Drugs Today (Barc.)*, v.44, n.7, p. 547-557, 2008.

PONEC M. et al. Effects of glucocorticosteroids on cultured human skin fibroblasts-IV. Specific decrease in the synthesis of collagen but no effect on its hydroxylation, *Biochem Pharmacol*, v.28, n.18, p. 2777-2783, 1979.

RAMANUJAM, N. Fluorescence Spectroscopy In Vivo. In R.A. Meyers (Ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Nova Jersey: John Wiley & Sons Ltd, 2000. p. 20-56.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J.A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.*, v.353, n.16, p.1711-1723, 2005.

ROBERT, L.; LABAT-ROBERT, J.; ROBERT, A.M. Physiology of skin aging. *Pathol. Biol. (Paris)*, v.57, n.4, p.336-341, 2009.

SANDBY-MOLLER, J.; THIEDEN, E.; PHILIPSEN, P.A.; HEYDENREICH, J.; WULF, H.C. Skin autofluorescence as a biological UVR dosimeter. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. V.20, n.1, p.33-40, 2004.

SCHAKE H et al. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.101, p. 227–232, 2004.

SCHACKERT, C.; KORTING, H.C.; SCHAFER-KORTING, M. Qualitative and quantitative assessment of the benefit-risk ratio of medium potency topical corticosteroids in vitro and in vivo: characterization of drugs with an increased benefit-risk ratio. *BioDrugs*, v.13, n.4, p.267-277, 2000.

SCHOEPE, S. *Investigations of in vitro Test Systems for the Detection of Glucocorticoid-induced Skin Atrophy as a Tool in Drug Discovery*. 2009. 94f. Tese de Doutorado. Faculdade de Biologia. Universidade Humboldt. *Berlim*, 2009.

SCHOEPE, S. et al. Identification of Novel in vitro Test Systems for the Determination of Glucocorticoid Receptor Ligand-Induced Skin Atrophy. *Skin Pharmacol. Physiol.*, v.23, n.3, p.139-151, 2010.

SELLHEYER K, KRAHL D. Skin mesenchymal stem cells: Prospects for clinical dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2010 (no prelo).

SHEU, H. M. et al. Permeability barrier abnormality of hairless mouse epidermis after topical corticosteroid: characterization of stratum corneum lipids by ruthenium tetroxide staining and high-performance thin-layer chromatography, *J Dermatol* V.25, N.5, p. 281-, 1998.

SHULL, S.; CUTRONEO, K. R. Glucocorticoids coordinately regulate procollagens type I and type III synthesis, *J Biol Chem* v.258 n.5, p.3364-3369, 1983.

SNYDER, D.S.; GREENBERG, R.A. Radiographic measurement of topical corticosteroid-induced atrophy. *J Invest Dermatol.*, v.69, n.3, p.279-281, 1977.

STAMATAS, G. N. et al., Infant Skin Microstructure Assessed In Vivo Differs from Adult Skin in Organization and at Cellular Level. *Pediatric Dermatology* , v.27, n.2, p. 125-131, 2010.

STEMPIEN-OTERO, A et al. Mechanisms of cardiac fibrosis induced by urokinase plasminogen activator. *J Biol Chem*. v.281, n.22, p.15345–1535, 2006.

STERRY, W.; ASADULLAH, K. Topical glucocorticoid therapy in dermatology In CATO A.C.B., (Ed). *Recent advances in glucocorticoid receptor action*, Ernst Schering Res Foundation. 2002. p. 39-54.

TAKEMA, Y.; YORIMOTO, Y.; OHSU, H.; OSANAI, O.; KAWAI, M. Age-related discontinuous changes in the in vivo fluorescence of human facial skin. *J Dermatol Sci*,v.15, n.1, p.55-58, 1997.

TAN, C.Y.; MARKS, R.; PAYNE, P. Comparison of xeroradiographic and ultrasound detection of corticosteroid induced dermal thinning. *J Invest Dermatol.*, v.76, n.2, p.126-128, 1981.

VO-DINH, T. *Biomedical Photonics Handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2003. 1864p.

VOGEL, A.I. *Análise química quantitativa*. 6ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462p.

WAGNIERES, G.; STAR W.; WILSON, B.; In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications. *Photochem. Photobiol.* , v.68, n.5, p.603-632, 1998

WERNER, B. Biópsia de pele e seu estudo histológico: Por quê? Para quê? Como? Parte I. *An. Bras. Dermatol.*, v.84, n.4, p.391-395, 2009.