UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Avaliação do Efeito Fotoprotetor de Compostos Fenólicos sobre
culturas de células da pele irradiadas por UVA e UVB.**

Andréa Costa Fruet

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvia Berlanga de Moraes
Barros

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvyia Stuchi Maria-Engler

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Avaliação do Efeito Fotoprotetor de Compostos Fenólicos sobre
culturas de células da pele irradiadas por UVA e UVB**

Andréa Costa Fruet

(Versão Corrigida)

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvia Berlanga de Moraes
Barros

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvy Stuchi Maria-Engler

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Fruet, Andréa Costa
F944a Avaliação do efeito fotoprotetor de compostos fenólicos
sobre
culturas de células da pele irradiadas por UVA e UVB / Andréa
Costa Fruet. -- São Paulo, 2015.
125p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Silvia Berlanga de Moraes Barros
Co-orientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi

1. Estresse oxidativo : Toxicologia 2. Toxicologia ambiental
3. Biologia celular I. T. II. Silvia Berlanga de Moraes Barros,
orientador. II. Maria-Engler, Silvy Stuchi, co-orientador.

615.9 CDD

Andréa Costa Fruet

**Avaliação do Efeito Fotoprotetor de Compostos Fenólicos sobre
culturas de células da pele irradiadas por UVA e UVB.**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a. Silvia Berlanga de Moraes Barros
Orientador/Presidente da Banca

Prof. Dr. André Rolim Baby
1º Examinador

Dr^a. Vanessa de Moura Sá Rocha
2º Examinador

Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck
3º Examinador

Dr^a. Mônica Beatriz Mathor
4º Examinador

São Paulo, 14 de Abril de 2015.

“Jamais considere seus estudos uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertence.”

– Albert Einstein

Dedicatória:

À minha família, pai, mãe, irmã Carol, cunha Carlos, avós paternos Isabel e Antenor (in memorian), avós maternos (in memorian), Florença e Wilson, aos tios e primas que me apoiaram na realização deste trabalho, e que torcem sempre para eu alcançar os meus sonhos.

*Ao meu namorado, Mauro
que me dava força conselhos e amparo nas dificuldades.*

Às minhas amigas e meus amigos de Campinas, que não importe o quão impossível são meus sonhos, estão sempre lá, me apoiando, ajudando e rindo de todos os meus problemas.

*“Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito.”
- Aristóteles*

Agradecimentos:

À Deus, por ter me sustentado e auxiliado nas minhas dificuldades.

Aos meus amigos do Laboratório de Citopatologia, os que já saíram e os que ficam (Kely, Diogo Rivelli, Fernanda Filipin, Paula Anastácia, Natália, Bianca, Manoela, Débora, Raquel, Renato, Laura, Paula Penacchi, Otávio, Maria Clara, Thalita, Thatiana, Carol, Fernanda Flores (ferfanda), Nayane, Gustavo, Érica, Michele, Silvana e Silvinha) e aos amigos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (Édson, Luzi, Renan, Fran) que ao longo dos dias me ofereceram suas amizades, alegrias, tristezas, ajudaram nos experimentos, compartilharam momentos bons e ruins, com toda ajuda e amizade me auxiliaram na realização deste trabalho e serão sempre lembrados como amigos para todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista e os funcionários Gabriel e Divino, do Instituto de Química (IQ-USP), pela ajuda e auxílio com o Simulador Solar.

Ao Prof. Dr. Mario Hirata, à Prof.^a Dr.^a Rosário Hirata, ao Álvaro Cerda e à Cristina Fajardo, do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas (FCF-USP) por me ajudarem nos experimentos com o Multiplex e com o RT-PCR.

Ao Prof. Dr. André Rolim Baby, as Dr.^{as} Fernanda Sarruf e Daniela D’Almeida, do Depto de Fármacos e Medicamentos, e ao Dr. Diogo Rivelli, do Lab Citopatologia, por conceder o uso do equipamento e realizar as leituras de FPS com o espectrofotômetro de reflectância.

Ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, por conceder o uso do equipamento de citometria de fluxo e á funcionária Renata Chaves Albuquerque (Renatinha), do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas (FCF-USP), por realizar as leituras no citômetro, pela ajuda e amizade.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa e projeto auxílio para a execução deste trabalho.

À todos os amigos, conhecidos, colegas do Depto de Análises Clínicas e Toxicológicas, que não lembrei no momento que escrevi os agradecimentos, de qualquer maneira me ajudaram nos meus experimentos, no meu dia-a-dia e que imensamente enriqueceram este trabalho, sempre com carinho e amizade.

*“Conhecemos pessoas que vem e que ficam,
Outras que, vem e passam.
Existem aquelas que,
Vem, ficam e depois de algum tempo se vão.
Mas existem aquelas que vem e se vão com uma enorme vontade de ficar...”
- Charles Chaplin*

Às Orientadoras:

Agradeço à Prof. ^a Dr. ^a Silvia Berlanga de Moraes Barros pela oportunidade de realizar o Doutorado em seu laboratório, por me confiar á uma linha de estudo do laboratório. Agradeço por me ajudar nas minhas dificuldades, pela orientação, sua paciência, amizade e todas as oportunidades oferecidas.

Agradeço à Prof. ^a Dr. ^a Silvyia Stuchi Maria-Engler pela co-orientação durante o Doutorado, por me ajudar nas dúvidas, por me dar conselhos, pela sua paciência e amizade.

*“A suprema arte do professor é despertar a alegria na expressão criativa do conhecimento, dar liberdade para que cada estudante desenvolva sua forma de pensar e entender o mundo, assim criamos pensadores, cientistas e artistas que expressarão em teus trabalhos aquilo que aprenderam com seus mestres.” – **Albert Einstein***

RESUMO

A exposição excessiva à radiação Ultravioleta (UV) resulta em manifestações clínicas à pele humana como queimaduras, fotoenvelhecimento e câncer. A radiação UVA, preferencialmente, induz à formação de espécies reativas de oxigênio, enquanto que a radiação UVB é absorvida diretamente pelo DNA. Apesar de mecanismos endógenos auxiliarem na prevenção/reparação dos danos causados pela radiação UV, quando o dano excede a capacidade de reparação celular, diversos efeitos lesivos ocorrem na pele como alterações da matriz dérmica, resposta inflamatória e desidratação do estrato córneo. O uso de compostos fenólicos com atividade antioxidante pode auxiliar na prevenção das consequências patológicas da exposição à radiação UV. O presente trabalho teve como objetivo estudar em cultura de células da pele (HaCaT -queratinócito humano imortalizado e FHPD - fibroblasto humano primário dermal) exposta às radiações UVA e UVB a atividade fotoprotetora de 3 compostos fenólicos, ácido cafeico (AC), clorogênico (ACG) e rosmarínico (AR). Inicialmente, células HaCaT e FHPD cultivadas em monocamada foram expostas às doses crescentes de radiação UVA ou UVB e, após 24 horas, foram analisadas quanto a viabilidade, marcadores de morte celular, mediadores inflamatórios, presença de aquaporina e lesões de DNA. HaCaT quando exposta às radiações UVA e UVB são conduzidas à morte por apoptose, com aumento de Caspases 3 e 9, p53 e redução de PARP. Após a exposição à radiação UVA, HaCaT responde com aumento na liberação de IL-6, TNF- α e COX-2, internalização/redução de AQP3 da membrana, redução na liberação de MMP-2 e 9, aumento na liberação de MMP-1 e na produção de ERO. Quando expostos à radiação UVB, HaCaT aumenta a liberação de IL-6 e COX-2, promove internalização/redução de AQP3 na membrana e redução na liberação de MMP-2 e 9. FHPD são menos sensíveis à exposição a ambas as radiações, mostrando redução de viabilidade com parada de ciclo apenas frente à radiação UVA. Além disto, FHPD exposto a radiação UVA responde com aumento na liberação de IL-6 e danos no DNA do tipo 8-oxo-dG. Dentre os compostos, o ACG apresentou melhor atividade fotoquimioprotetora perante ambas as radiações UVA e UVB, pois foi capaz de reverter em HaCaT a morte celular induzida por ambas as radiações e de reverter a parada de ciclo em FHPD expostos à radiação UVA. HaCaT tratado com ACG e exposto à radiação UVA responde com aumento na expressão de AQP3 e PARP, aumento na expressão gênica de AQP3, redução na expressão gênica de CDKN1A e na liberação de MMP-1, 2 e 9. Após a radiação UVB, o tratamento com ACG aumenta a expressão gênica de AQP3, reduz a expressão gênica de CDKN1A, reduz a produção de COX-2 e aumenta a liberação de MMP-2 e 9. O tratamento com o AR apresentou atividade fotoquimioprotetora frente à radiação UVA, com HaCaT respondendo a radiação com aumento na população de células viáveis, aumento na expressão de AQP3 e PARP e na expressão gênica de AQP3, redução na liberação de MMP-1 e 9 e redução na produção de COX-2. FHPD tratados com AR apresentaram aumento na população em fase G1, na expressão de p21, e redução de danos de DNA tipo 8-oxo-dG. O tratamento de HaCaT com AC foi capaz de reverter a morte celular, aumentar a expressão de p53 e aumentar a liberação de MMP-2 e 9 frente à radiação UVB e de reduzir a produção de ERO, a expressão de p21 e a liberação de MMP-1, 2 e 9 frente à radiação UVA. Para FHPD, o tratamento com AC foi capaz apenas de reduzir a formação de danos de DNA tipo 8-oxo-dG. Os resultados indicam que o modelo proposto foi capaz de discriminar a atividade fotoprotetora dos compostos frente à radiação UVA e UVB. Além disto, foi possível demonstrar que os compostos antioxidantes se comportam de maneira distinta enquanto fotoprotetores no modelo empregado.

Palavras-chaves: Fotoproteção, antioxidantes, fotoenvelhecimento, polifenóis, modelos *in vitro*.

ABSTRACT

Excessive exposure to Ultraviolet radiation (UV) results in clinical manifestations in human skin such as burns, photo-aging and cancer. UVA radiation preferentially induces formation of reactive oxygen species, while UVB radiation is absorbed directly by the DNA. Although endogenous mechanisms are able to prevent/repair cellular damages caused by UV radiation, excess cellular damage retains cells repair capacity and also results on diverse harmful effects on skin, such as, changes in the dermal matrix, inflammatory response and dehydration of the stratum corneum. The use of phenolic compounds with antioxidant activity may help preventing pathological conditions caused by UV radiation. This work aimed to study the photoprotective activity of three phenolic compounds, caffeic (CA), chlorogenic (CGA) and rosmarinic acid (RA) in human skin cells (HaCaT - immortalized human keratinocytes and HDSF - human dermal skin fibroblast) exposed to UVA and UVB radiation. Initially, HDSF and HaCaT cells were exposed to increasing doses of UVA and UVB radiation. After 24 hours of exposure, we evaluated cell viability, cell death, inflammatory mediators, aquaporin and DNA damage. Exposure to UVA and UVB radiation in HaCaT cells results on apoptotic cell death, with an increase of caspases 3 and 9, p53 and reduction of PARP. HaCaT cells when exposed to UVA radiation resulted on increased levels of IL-6, TNF- α and COX-2, internalization of the membrane AQP3, reduction of MMP-2 and MMP-9 release, increase of MMP-1 and ROS production. After UVB radiation, HaCaT cells resulted on an increase of IL-6 and COX-2 production, it also promoted internalization of membrane AQP3 and reduced release of MMP-2 and 9. HDSF were less sensitive to both radiations. Moreover, HDSF resulted in cell viability decrease and cell cycle arrest only after UVA radiation. Furthermore, HDSF when exposed to UVA radiation resulted on an increase of IL-6 production and in DNA damage (8-oxo-dG). Among the studied compounds, CGA presented better photochemiprotective activity towards UVA and UVB radiation. Also, this compound was able to reverse cell death in HaCaT after exposure to both radiations and inhibited cell cycle arrest in HDSF after UVA radiation exposure. HaCaT cells treated with CGA and exposed to UVA radiation resulted on an increase in AQP3 and PARP expression, increased in AQP3 gene expression, reduction in CDKN1A gene expression and reduction in MMP-1, 2 and 9 release. After UVB radiation, GCA treatment increases AQP3 gene expression, reduces CDKN1A gene expression, reduces COX-2 production and increase MMP-2 and 9 releases. The AR treatment showed photochemiprotective activity towards the effects of UVA radiation, with HaCaT responding with an increase on cells viability, increased in PARP and AQP3 expression and in AQP3 gene expression, decreased MMP-1 and 9 releases and reduced COX-2c production. HDSF when treated with AR showed an increase in G1 phase population, in p21 expression and reduced DNA damage-type 8-oxo-dG. HaCaT cells treated with AC reversed cell death, increased p53 expression and increased MMP-2 and 9 releases after UVB radiation and reduced ROS production, p21 expression and MMP -1, 2, 9 release after UVA radiation. HDSF treated with AC was only able to reduce the formation of 8-oxo-dG DNA damage. These results indicated that the proposed model was able to discriminate the photochemiprotective activity of the studied compounds against the UVA and UVB radiation. In addition, it was demonstrated that the each studied antioxidant have different photoprotective mode of action.

Keywords: Photoprotection, antioxidants, photoaging, polyphenols, *in vitro* models.

ABREVIATURAS

(6-4) PD	Fotoprodutos de pirimidina (6-4) pirimidona
8-oxo-dG	8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	<i>Activated protein-1</i>
AQP3	Aquaporina 3
Bax	<i>Bcl-2 Associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i> (Fator de transcrição)
CD95	<i>Cluster of differentiation 95</i> (Receptor da superfamília TNF membro 6)
CDK	Quinase dependente de ciclina (<i>Cyclin-dependent kinases</i>)
CDKN1A	Gene decodificador da proteína p21 (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>)
c-IAP2	Proteína inibidora de apoptose 2
COX	Ciclooxigenase
CPD	<i>Cys-syn</i> dímeros de ciclobutano pirimidina
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i> (Fator de transcrição)
DEM	Dose eritematosa mínima
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DR5	Ou TRAIL-R2 (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand – receptor 2</i>)
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
Faz/Apo-1	Ligante do receptor CD95 (<i>Apoptosis antigen 1</i>)
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FPS	Fator de proteção solar
FP-UVA	Fator de proteção UVA
HaCaT	Queratinócito humano imortalizado (<i>Human immortalized keratinocytes cell line</i>)
IL	Interleucina
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i> (Proteína quinases ativadora de mitose)
MEC	Matriz extracelular
MED	Dose mínima eritematosa (<i>minimal erythema dose</i>)
MMP	Metaloproteinase de matriz (<i>Matrix metalloproteinases</i>)
NRU	Inclusão de Vermelho neutro (<i>Neutral red uptake</i>)
PARP	Poli-(ADP-ribose) polimerase
PG	Prostaglandinas
PPAR γ	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PPD	Pigmentação persistente (<i>persistent pigment darkening</i>)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SBC	Células de queimadura solar (<i>sunburn cells</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TP53	Gene decodificador da proteína p53 (<i>Tumor protein 53</i>)
EU	União Européia
UVA/UVB	Ultravioleta A e B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de ativação da apoptose após exposição de queratinócitos a radiação UV (Fonte: LEE e col., 2013)	19
Figura 2. Estrutura química do ácido rosmarínico.....	24
Figura 3. Estrutura química do ácido clorogênico.....	25
Figura 4. Estrutura química do ácido cafeico.....	26
Figura 5. Esquema representativo do delineamento experimental com as culturas de queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) exposto à radiação UVA ou UVB. As análises foram realizadas 30 minutos, 6 horas ou 24 horas após a exposição às radiações.....	30
Figura 6. Efeito da radiação UVA e UVB sobre queratinócito humano imortalizado (HaCaT) 24 horas após exposição à radiação. (A e B) A viabilidade celular foi quantificada por NRU e está representada em leitura de absorbância (540nm). (C e D) A avaliação de morte celular foi quantificada por citometria de fluxo e está representada em média $\pm$ E.P.M. da porcentagem da população em cada tipo de morte. Ao lado (<i>dir. inf.</i>), os gráficos representativos do ensaio de morte por Necrose/Apoptose nas doses de radiação proposta para os estudos.....	43
Figura 7. Efeito da radiação UVA e UVB sobre fibroblasto humano primário dermal (FHPD) 24 horas após exposição à radiação. (A e B) A viabilidade celular foi quantificada por NRU e está representada em leitura de absorbância (540nm). (C e D) A avaliação de parada de ciclo foi quantificada por citometria de fluxo e está representada em média $\pm$ E.P.M. da porcentagem da população em cada fase do ciclo celular. Ao lado (<i>dir. inf.</i>), os gráficos representativos do ensaio de parada de ciclo celular nas doses de radiação propostas para os estudos.....	44
Figura 8. Expressão de p53, p21 e PARP em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) quando exposto à radiação UVA (5 e 10J/cm ²) e UVB (16, 24 e 32 mJ/cm ²), após 24 horas. A proteína β -actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica.....	45
Figura 9. Expressão de p53 e p21 em fibroblasto humano primário dermal (FHPD) quando exposto à radiação UVA (5 e 10J/cm ²) e UVB (16, 24 e 32 mJ/cm ²), após 24 horas. A proteína β -actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica.....	46
Figura 10. Expressão de Caspase-3 e 9 em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) quando exposto à radiação UVA (5 e 10J/cm ²) e UVB (16, 24 e 32 mJ/cm ²), após 24 horas. A proteína α -tubulina (52kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica.....	47
Figura 11. Expressão proteica de aquaporina-3 (AQP3) por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) 24 horas após a exposição à radiação UVA e UVB. (A) Imagem do gel de <i>Western Blotting</i> mostra a redução de AQP3 de membrana (forma não-glicosilada; 30kDa) e aumento da forma glicosilada internalizada (40kDa) após exposição à radiação UVA e UVB. Os valores no gráfico representam a média $\pm$ E.P.M. da quantidade de AQP3 internalizada (40kDa) e de membrana (30kDa) após a radiação UVA (B) e UVB (C). Abaixo, os gráficos representam a razão entre a quantidade de AQP3 na forma de 30kDa sobre a forma de 40kDa após a radiação UVA (D) e UVB (E).....	48
Figura 12. Expressão relativa dos genes endógenos GAPDH e ACTINA em HaCaT após 24 horas da radiação UVA e UVB. A leitura foi feita em equipamento <i>Fast-RT-PCR System</i> com auxílio do software 7500 V2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)	49
Figura 13. Expressão gênica de AQP3 e CDK1N1 de queratinócito humano imortalizado (HaCaT) exposto à radiação UVA (10J/cm ²) e UVB (24mJ/cm ²). O perfil da expressão gênica dos genes de CDKN1A e AQP3 estão representados em relação aos genes endógeno (ACTINA e GAPDH). A leitura foi feita em equipamento <i>Fast-RT-PCR System</i> com auxílio do software 7500 V2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram normalizadas com controle não-irradiado (NT).....	50
Figura 14. Liberação de proMMP-2 e 9 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) após a exposição à radiação UVA. Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-2 e 9 e MMP-2 ativa por HaCaT (A) e FHPD (B) após 24 horas da exposição à radiação UVA. Os valores representados indicam unidades arbitrárias em pixels da quantidade de proMMP-2 e proMMP-9 no sobrenadante de HaCaT e FHPD.....	51
Figura 15. Liberação de proMMP-2 e 9 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) após a exposição à radiação UVB. Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-2 e 9 por HaCaT (A) e proMMP-2 por FHPD (B) após 24 horas da exposição à radiação UVB. Os valores representados indicam unidades arbitrárias em pixels da quantidade de proMMP-2, 9 e MMP-2 ativa no sobrenadante de HaCaT e	

FHPD.....	52
Figura 16. Ativação parácrina de HaCaT exposto à radiação UVB (24mJ/cm ²) sobre FHPD na liberação de proMMP-2 e 9 (A1) Imagens representativas do gel de zimografia mostrando o efeito da radiação UVB sobre HaCaT após 24 horas e sobre FHPD com meio condicionado de HaCaT por 48 horas. (A2) Os valores no gráfico representam a quantificação, em unidades arbitrárias, de liberação de proMMP-2, MMP-2 ativa e proMMP-9 no sobrenadante de FHPD com meio condicionado de HaCaT após 48h (n=3). (B) Representação gráfica da quantidade de MMP-2 (B1), 9 (B2) e 1 (B3) total no sobrenadante de HaCaT não-irradiado e irradiado por UVB (HaCaT UVB), FHPD cultivado por 48 horas (FHPD Controle) e FHPD com meio condicionado de HaCaT sem radiação (HaCaT sem UVB+ FHPD) e com radiação UVB (HaCaT UVB + FHPD), realizada com o kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA). (C) Representação gráfica da atividade de MMP-2 (C1) e 9 (C2) no sobrenadante de HaCaT não-irradiado (H NI) e irradiado por UVB (H UVB), FHPD cultivado por 48 horas (FHPD Controle) e FHPD com meio condicionado de HaCaT não irradiado (F+H NI) e irradiada por UVB (F+HUVB), realizada com o kit Biotrak (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)	53
Figura 17. Ativação parácrina de HaCaT exposto à radiação UVA (10J/cm ²) sobre FHPD na liberação de MMP-2 e 9 (A1) Imagens representativas do gel de zimografia mostrando o efeito da radiação UVA sobre HaCaT após 24 horas e sobre FHPD com meio condicionado de HaCaT por 48 horas. (A2) Os valores no gráfico representam a quantificação, em unidades arbitrárias, de liberação de proMMP-2, MMP-2 ativa e proMMP-9 no sobrenadante de FHPD com meio condicionado de HaCaT após 48h (n=3). (B) Representação gráfica da quantidade de MMP-2 (B1), 9 (B2) e 1 (B3) total no sobrenadante de HaCaT não-irradiado e irradiado por UVA (HaCaT UVA), FHPD cultivado por 48 horas (FHPD Controle) e FHPD com meio condicionado de HaCaT sem radiação (HaCaT sem UVA+ FHPD) e com radiação UVB (HaCaT UVA + FHPD), realizada com o kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA).....	54
Figura 18. Liberação de IL-6, IL-8 e TNF- α por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) após a exposição à radiação UVA e UVB. Os valores nos gráficos indicam a média $\pm$ E.P.M. da leitura de IL-6, IL-8 e TNF- α , em pg/mL, no sobrenadante de HaCaT (A1, B1 e C1) e FHPD (A2, B2 e C2) exposta a radiação UV.....	55
Figura 19. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) exposto à radiação UVA. As células foram incubadas com a sonda DCFH-Da (30 μ M) por 40 minutos, seguidas de exposição à radiação UVA (10J/cm ²). A leitura foi feita em citômetro de fluxo (canal FITC) após 30 minutos do início da exposição à radiação UVA.....	56
Figura 20. Produção de COX-2 em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) exposto à radiação UVA e UVB. A quantificação de COX-2 intracelular foi feita por ELISA em HaCaT 24 horas após a radiação e os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. em pg/mL.....	57
Figura 21. Formação de CPD em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) exposto à radiação UVB. (A) Quantificação de CPD foi feita por citometria de fluxo em HaCaT nos tempos de 2 e 6 horas após a radiação e os valores representados em média $\pm$ E.P.M. de MFI (Intensidade de fluorescência mediana). (B) Gráficos representativos da leitura de CPD em HaCaT após radiação UVB em citômetro de fluxo.....	57
Figura 22. Formação de 8-oxo-dG em fibroblasto humano primário dermal (FHPD) exposto à radiação UVA no tempo de 6 horas após a radiação e os valores representados em média $\pm$ E.P.M. da razão de MFI (Intensidade de fluorescência mediana). (B) Gráficos representativos da leitura de 8-oxo-dG em FHPD após radiação UVA em citômetro de fluxo.....	58
Figura 23. Eficácia fotoprotetora dos compostos após radiação UVA sobre a viabilidade de queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD). As células de HaCaT e FHPD foram tratadas com os compostos (ácido rosmarínico – AR -, clorogênico – ACG - e cafeico – AC - por 1 hora e expostas à radiação UVA e a viabilidade foi determinada por NRU 24 horas após a exposição a radiação.....	60
Figura 24. Eficácia fotoprotetora dos compostos após radiação UVB sobre a viabilidade de queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD). As células de HaCaT e FHPD foram tratadas com os compostos (ácido rosmarínico – AR -, clorogênico – ACG - e cafeico – AC - por 1 hora e expostas à radiação UVB e a viabilidade foi determinada por NRU 24 horas após a exposição a radiação.....	61
Figura 25. Expressão proteica de p53, p21 e PARP em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA (A. 10J/cm ²) e UVB (B.24 mJ/cm ²). As células foram tratadas com os compostos 1 hora antes da radiação e a quantificação de PARP (116kDa e 89kDa), p53 (53kDa) e	

- p21 (21kDa) foram feitas 24 horas após a exposição à radiação. A proteína β -actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica..... 62
- Figura 26.** Expressão proteica de Caspase-3 e 9 em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA (10J/cm²) e UVB (24 mJ/cm²). As células foram tratadas com os compostos 1 hora antes da radiação e a quantificação de Caspase-3 (35, 19 e 17 kDa) e Caspase-9 (47, 37, 35 e 17kDa) foram feitas 24 horas após a exposição à radiação. A proteína β -actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica..... 64
- Figura 27.** Expressão proteica de p53 e p21 em fibroblasto humano primário dermal (FHPD) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA (A. 10 J/cm²) e UVB (B. 24 mJ/cm²). As células foram tratadas com os compostos 1 hora antes da radiação e a quantificação de p53 (53kDa) e p21 (21kDa) foram feitas 24 horas após a exposição à radiação. A proteína β -actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica..... 65
- Figura 28.** Expressão proteica de aquaporina-3 (AQP3) por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA e UVB. Imagem do gel de *Western Blotting* mostra a modulação de AQP3 de membrana (forma não-glicosilada; 30kDa) e internalizada (forma glicosilada; 40kDa) de HaCaT tratado com os compostos e expostas às radiações UVA (A) e UVB (B). Os valores no gráfico representam a média $\pm$ E.P.M. da quantidade de AQP3 glicosilada (40kDa) e de membrana (30kDa) após a radiação UVA (C) e UVB (D). Abaixo, os gráficos representam a razão entre a quantidade de AQP3 na forma de 30kDa sobre a forma de 40kDa após a radiação UVA (E) e UVB (F)..... 67
- Figura 29.** Expressão gênica de AQP3 e CDKN1A em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos e exposto à radiação UVA (10J/cm²) e UVB (24mJ/cm²). O perfil da expressão gênica dos genes de CDKN1A e AQP3 estão representados em relação ao gene endógeno (ACTINA e GAPDH) à partir da técnica de PCR em tempo real. As amostras foram normalizadas com controle não-irradiado (NT)..... 68
- Figura 30.** Liberação de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos e exposto à radiação UVA. As células foram tratadas com os compostos AR, ACG e AC por 1 hora, seguidos de exposição à radiação UVA (10J/cm²) e o sobrenadante coletado 24 horas após a radiação. Os valores representam unidades arbitrárias (em pixels) da quantidade de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa no sobrenadante de HaCaT tratado com AR, ACG (A1) e AC (B1). Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa por HaCaT tratado com os compostos AR, ACG (A2) e AC (B2) 69
- Figura 31.** Liberação de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos e exposto à radiação UVB. As células foram tratadas com os compostos AR, ACG e AC por 1 hora, seguidos de exposição à radiação UVB (24mJ/cm²) e o sobrenadante coletado 24 horas após a radiação. Os valores representam unidades arbitrárias (em pixels) da quantidade de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa no sobrenadante de HaCaT tratado com AR, ACG (A1) e AC (B1). Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa por HaCaT tratado com os compostos AR, ACG (A2) e AC (B2) 70
- Figura 32.** Liberação de proMMP-2 por ativação parácrina de HaCaT pré-tratado com os compostos e irradiado por UVA sobre FHPD. HaCaT foi pré-tratado com os compostos AR, ACG e AC por 1 hora, exposto à radiação UVA (10J/cm²) e após 24 horas o meio condicionado de HaCaT foi transferido para FHPD por mais 48 horas. Gráfico e gel de zimografia mostrando a diminuição de proMMP-2 em HaCaT irradiado e o aumento de proMMP-2 liberada pelo FHPD com meio condicionado de HaCaT com os compostos AR e ACG (A) e AC (B). Os valores representam, em unidades arbitrárias, a liberação de proMMP-2 no sobrenadante de FHPD (n=3). (C) Gráfico de MMP-2 total, em pg/mL, no sobrenadante de FHPD cultivado por 48 horas com meio condicionado de HaCaT não-irradiado (NT ou NTE), irradiado por UVA (NT UVA ou NTE UVA) e pré-tratados com AR, ACG e AC, realizada com kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA; n=2) 71
- Figura 33.** Liberação de MMP-1 total por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) pré-tratado com os compostos AR, ACG e AC e exposto à radiação UVA e UVB. Os gráficos mostram a liberação de MMP-1 em HaCaT exposto à radiação UVA (A1) e UVB (B1) e em FHPD com meio condicionado de HaCaT pré-tratado com os compostos, seguido de exposição à radiação UVA (A2) e UVB (B2) realizada com o kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co.,

Billerica, MA EUA)	72
Figura 34. Liberação de MMP-2 e 9 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) pré-tratado com os compostos AR, ACG e AC e exposto à radiação UVA e UVB. Os gráficos apresentam a liberação de MMP-9 em HaCaT após a exposição à radiação UVA (A1) e UVB (B1), e de MMP-2 após a exposição à radiação UVA (A2) e UVB (B2) realizada com kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA)	73
Figura 35. Liberação de IL-6 e IL-8 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) pré-tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA. Os valores representados nos gráficos indicam a média $\pm$ E.P.M., em pg/mL, no sobrenadante de HaCaT (A e B) e FHPD (C e D) exposta a radiação UVA.....	74
Figura 36. Liberação de IL-6 e IL-8 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) tratados com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e expostos à radiação UVB. Os valores representados nos gráficos indicam a média $\pm$ E.P.M. da leitura em pg/mL, no sobrenadante de HaCaT (A e B) e FHPD (C e D) exposta a radiação UV.....	75
Figura 37. Liberação de TNF- α por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA. Os valores representados nos gráficos indicam a média $\pm$ E.P.M. da leitura de TNF- α , em pg/mL, no sobrenadante de HaCaT.....	75
Figura 38. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em HaCaT tratado com os compostos e exposto à radiação UVA. As células foram incubadas com a sonda DCFH-Da (30 μ M) por 40 minutos, tratadas com os compostos AR (A. 25 e 50 μ M), ACG (B. 50, 100 e 200 μ M) e AC (C. 50 e 75 μ M) por 1 hora, seguidas da exposição à radiação UVA. A leitura foi feita em citômetro de fluxo (canal PERC-P) após a irradiação e (D) os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. de intensidade de fluorescência (MFI) do composto DCF.....	76
Figura 39. Produção de COX-2 em HaCaT tratado com os compostos e exposto à radiação UVA e UVB. A quantificação de COX-2 intracelular foi feita por ELISA em HaCaT 24 horas após a radiação e os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. em pg/mL.....	77
Figura 40. Formação de CPD em HaCaT tratado com os compostos AR, ACG e AC e exposto à radiação UVB. A quantificação de CPD foi feita por citometria de fluxo em HaCaT 6 horas após a radiação e os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. de MFI.....	78
Figura 41. Formação de 8-oxo-dG em FHPD tratadas com os compostos AR, ACG e AC e exposta a radiação UVA. A quantificação de 8-oxo-dG foi feita por citometria de fluxo em FHPD 6 horas após a radiação e os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. da razão de MFI.....	79
Figura 42. Avaliação da citotoxicidade do A. ácido Rosmarínico (AR), B. ácido Clorogênico (ACG), C. ácido Cafeico (AC) em células de queratinócitos imortalizados (HaCaT) após 24 horas de tratamento avaliadas pelo método de exclusão por azul de Tripan (AT) (<i>esq.</i>) e método de retenção celular de vermelho neutro (NRU) (<i>centro</i>). As porcentagens representam a relação entre células vivas e células vivas + células mortas x 200 (AT) e a relação entre células vivas tratadas e células vivas não tratadas com os compostos x 100 (NRU).....	108
Figura 43. Avaliação da citotoxicidade do A. ácido Rosmarínico (AR), B. ácido Clorogênico (ACG), C. ácido Cafeico (AC) em fibroblasto humano primário dermal (FHPD) após 24 horas de tratamento avaliado pelo método de exclusão por azul de Tripan (AT) (<i>esq.</i>) e método de retenção celular de vermelho neutro (NRU) (<i>centro</i>). As porcentagens representam a relação entre células vivas e células vivas + células mortas x 200 (AT) e a relação entre células vivas tratadas e células vivas não tratadas com os compostos x 100 (NRU).....	109
Figura 44. Avaliação do ciclo celular de queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos testes, (A) ácido Rosmarínico (AR) e (B) ácido Clorogênico (ACG), por 24 horas e o ciclo celular foi avaliado pelo método de marcação por iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. As barras em rajado correspondem a fase Sub-G1, em cinza escuro a fase G1, em cinza claro a fase S e em branco a fase G2/M do ciclo celular. Controle NT CS = Células HaCaT não-tratadas e cultivadas em DMEM + 10% SFB; Controle NT SS = Células HaCaT não-tratadas e cultivadas em DMEM sem SFB.....	110
Figura 45. Liberação de proMMP-2, 9 e MMP-2 ativa por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado por 1 hora com os compostos AR (ácido rosmarínico), ACG (ácido clorogênico) e AC (ácido cafeico). (A) Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-2 e 9 por HaCaT após 24 horas do tratamento. (B) Os valores representados indicam média $\pm$ E.P.M. de unidades arbitrárias, em pixels, da quantidade de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa no sobrenadante de HaCaT 24 horas após o tratamento com os compostos.....	111

- Figura 46.** Liberação de citocinas IL-6 e IL-8 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD). As células foram tratadas com os compostos testes, ácido Rosmarínico (AR), ácido Clorogênico (ACG) e ácido Cafeico (AC), por 1 hora e a liberação de citocinas foi realizada 24 horas após, por ELISA (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, EUA). As barras em amarelo correspondem a liberação de IL-6 e as em verde a liberação de IL-8. As abreviações NT e NTE correspondem a controle não-tratado e controle não-tratado + 0.12% de etanol, respectivamente..... 111
- Figura 47.** Avaliação da expressão proteica de p53 e p21 em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) quando tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), ácido Clorogênico (ACG) e ácido Cafeico (AC), por 1 hora. A quantificação da expressão proteica foi realizada 24 horas após os tratamentos. A proteína β -actina (43 kDa) foi utilizada como controle..... 112
- Figura 48.** Expressão proteica de aquaporina-3 (AQP3) por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) após o tratamento com os compostos ácido Rosmarínico (AR), ácido Clorogênico (ACG) e ácido Cafeico (AC), por 1 hora. (A) Imagem do gel de *Western Blotting* após o tratamento com os compostos mostrando nenhuma alteração de AQP3 de membrana (forma não-glicosilada; 30kDa) ou na AQP3 internalizada (forma glicosilada; 35kDa). Abaixo, os valores no gráfico representam a média $\pm$ E.P.M. da (B) quantidade de AQP3 glicosilada (40kDa) e de membrana (30kDa) e da razão entre as quantidades de AQP3 de 30kDa/40kDa..... 113
- Figura 49.** Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em HaCaT tratado com os compostos e expostos ao peróxido de hidrogênio. As células foram incubadas com a sonda DCFH-Da (30 μ M) por 40 minutos, tratadas com os compostos fenólicos AR (A. 25 e 50 μ M), ACG (B. 50, 100 e 200 μ M) e AC (C. 50 e 75 μ M) por 1 hora, seguidas de tratamento com H₂O₂ (250 μ M) por 30 minutos. A leitura foi feita em citômetro de fluxo (canal FITC) após o tratamento com H₂O₂ e (D) os valores então representados em média de intensidade de fluorescência (MFI) $\pm$ E.P.M. e porcentagem em relação ao controle..... 114
- Figura 50.** Expressão relativa dos genes endógenos GAPDH e ACTINA em HaCaT tratado com os compostos por 1 hora, seguidas de 24 horas de cultivo. A leitura foi feita em equipamento *Fast-RT-PCR* System com auxílio do software 7500 V2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) 115
- Figura 51.** Expressão relativa dos genes AQP3 e CDKN1A em HaCaT tratado com os compostos por 1 hora, seguidas de 24 horas de cultivo. A leitura foi feita em equipamento *Fast-RT-PCR* System com auxílio do software 7500 V2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações dos compostos utilizadas nos experimentos de viabilidade celular nas células empregadas no estudo.....	29
Tabela 2. Proteção frente à radiação UVB, por meio do cálculo do fator de proteção solar estimado (FPS), e à radiação UVA avaliada por meio da determinação do comprimento de onda crítico (λ_c) e Coeficiente de variação (razão UVA/UVB)	80

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
Abreviaturas.....	3
Lista de Figuras.....	4
Lista de Tabelas.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Revisão Bibliográfica.....	16
2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Linhagens celulares, cultivo e tratamento com os compostos.....	29
3.2. Ensaio com as radiações UVA e UVB.....	29
3.3. Parâmetros avaliados.....	30
3.3.1. Viabilidade Celular por exclusão por Azul de Tripán (AT).....	30
3.3.2. Viabilidade Celular por Retenção de Vermelho Neutro (NRU).....	31
3.3.3. Avaliação do Ciclo celular por Iodeto de propídio.....	31
3.3.4. Avaliação de Morte (Apoptose/Necrose) por Anexina-APC/Iodeto de propídio.....	32
3.3.5. Quantificação de proteínas p53, p21 PARP, Caspase-3 e -9, e AQP3.....	33
3.3.6. Quantificação da expressão gênica de AQP3 e CDKN1A.....	34
3.3.7. Liberação e atividade de metaloproteinases (MMP)-1, 2 e 9.....	36
3.3.8. Quantificação de citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α	37
3.3.9. Quantificação de ERO.....	37
3.3.10. Quantificação de Ciclooxygenase-2 (COX-2) intracelular.....	38
3.3.11. Quantificação de Dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD)	38
3.3.12. Quantificação de fotoproduto 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxo-dG)	39
3.4. Avaliação da eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> por espectrofotometria de refletância (<i>in vitro</i>)	39
3.5. Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	41
Capítulo 1. Efeito da Radiação UVA e UVB sobre cultura de células da pele – modelo em monocamada com HaCaT e Fibroblasto humano primário dermal (FHPD).....	42
C1.1. Citotoxicidade da radiação UVA e UVB em cultura de HaCaT e FHPD.....	42
C1.2. Quantificação de proteínas p53, p21, PARP, Caspase-3 e -9.....	45
C1.3. Regulação de AQP3 de membrana em HaCaT.....	47
C1.4. Expressão gênica de AQP3 e CDKN1A em HaCaT.....	49
C1.5. Liberação de metaloproteinases (MMP)-1, 2 e 9.....	50
C1.6. Liberação de citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α	54
C1.7. Produção de ERO em HaCaT exposta à radiação UVA.....	56
C1.8. Produção de COX-2 em HaCaT.....	56
C1.9. Formação de fotoprodutos (CPD) em HaCaT exposta à radiação UVB.....	57
C1.10. Formação de fotoprodutos 8-oxo-dG em FHPD exposta à radiação UVA...	58
Capítulo 2. Avaliação fotoquimioprotetora dos compostos fenólicos sobre células de HaCaT e FHPD expostos a radiação UVA e UVB.....	59
C2.1. Viabilidade Celular – Fotocitoproteção dos compostos fenólicos.....	59
C2.2. Quantificação de proteínas p53, p21, PARP, Caspase-3 e -9.....	61
C2.3. Quantificação de AQP3 de membrana em HaCaT.....	66
C2.4. Expressão gênica de AQP3 e CDKN1A em HaCaT.....	67
C2.5. Liberação e atividade de MMP-1, 2 e 9.....	69
C2.6. Liberação de citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α	73

C2.7. Quantificação da produção de ERO em HaCaT exposta à radiação UVA	76
C2.8. Produção de COX-2 em HaCaT.....	77
C2.9. Formação de fotoprodutos CPD em HaCaT exposto à radiação UVB.....	78
C2.10. Formação de fotoprodutos 8-oxo-dG em FHPD exposto à radiação UVA...	78
C2.11. Efeito Fotoprotetor <i>In Vitro</i> dos compostos por Espectrofotometria de Refletância.....	79
5. DISCUSSÃO.....	81
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	93
7. REFERÊNCIAS.....	95
Anexo 1. Avaliação citotóxica de compostos fenólicos candidatos a estudos de fotoquimioprevenção <i>in vitro</i>	108
A1.1. Citotoxicidade dos compostos fenólicos sobre HaCaT e FHPD.....	108
A1.2. Avaliação do ciclo celular em HaCaT.....	109
A1.3. Liberação e atividade de MMP-2 e -9 por HaCaT.....	110
A1.4. Perfil de liberação de Citocinas IL-6 e IL-8.....	111
A1.5. Perfil de proteínas p53 e p21.....	112
A1.6. Perfil da proteína AQP3 em HaCaT.....	112
A1.7. Quantificação de ERO em HaCaT.....	113
A1.8. Expressão gênica de AQP3 e CDK1N1 em HaCaT.....	114
A1.9. Conclusões Parciais.....	116
Anexo 2. Comitê de Ética.....	117
Anexo 3. Currículo Escolar.....	119
Anexo 4. Histórico Escolar	123

1. INTRODUÇÃO

Em 1959, W. M. S. Russell e R. L. Burch publicaram o livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, que introduzia a ideia definida como os 3R’s (*replacement, reduction e refinement* – substituição, redução e refinamento) como estratégia-chave para a pesquisa com animais. O trabalho de Russell e Burch consistia em uma nova abordagem para o desenvolvimento de pesquisas pré-clínicas com finalidade de substituição parcial ou total do uso de animais, melhorias na qualidade experimental dos animais e minimização no número de animais submetidos à experimentação, dando início ao desenvolvimento de métodos alternativos (DARNESHIAN, 2010). Desde então, o desenvolvimento de métodos alternativos para a pesquisa por ativos e produtos cosméticos tem se tornado realidade, principalmente nos últimos anos, com a finalidade de redução/substituição de pesquisas com animais.

O desenvolvimento de métodos *in vitro* tomou impulso a partir da proibição pela União Europeia do uso de animais para a avaliação de segurança e eficácia de insumos e produtos cosméticos. Na União Europeia, a segurança de produtos cosméticos é regulada pela Diretiva Cosmética 76/768/EEC. Em 1993 foi adicionada uma 6ª alteração nessa diretiva, introduzindo a ideia de que produtos cosméticos que tivessem sido testados em animais após a data de 1º de janeiro de 1998 seriam banidos do mercado. Em 2003, o Parlamento Europeu aprovou a 7ª Alteração na Diretiva Cosmética (2003/15/EC), publicado no *Jornal Oficial da União Europeia* (ANON, 2003), impondo a total exclusão do uso de animais em pesquisas de produtos cosméticos, tanto de ingredientes como de formulações no prazo de até 6 anos da sua implementação (HARTUNG e col., 2003). A partir de então, a Diretiva Cosmética da UE estabeleceu um calendário onde testes de ingredientes cosméticos ou a combinação de ingredientes cosméticos em animais seriam proibidos a partir de 11 de março de 2009. E a data de 11 de março 2013 foi estabelecida para que todos os produtos cosméticos que foram testados em animais fossem banidos do mercado europeu, independentemente da disponibilidade de testes alternativos ao uso animal (ANON, 2003).

Diversos órgãos de validação de métodos alternativos foram criados como a ECVAM, ICCVAM, e JaCVAM, e recentemente o BRACVAM em 2014 no Brasil, visando a validação de métodos alternativos para a busca da segurança e eficácia tanto de ingredientes quanto de produtos acabados, cosméticos e farmacêuticos. Ao longo da aceitação e validação de novos métodos alternativos, os cosméticos desenvolvidos com uso de animais começariam a ser banidos comercialmente (SCHUMANN, 2002).

No Brasil, a avaliação da eficácia de fotoprotetores exigida pela agência regulatória nacional (ANVISA) é feita em estudos clínicos, de acordo com a metodologia publicada pelo FDA ou COLIPA/JCIA/CTFA-SA. Voluntários, com tipo de pele clara (segundo a classificação de Fitzpatrick, de fototipo I, II e III – para a exposição à radiação UVB – e fototipo II, III e IV – para exposição à radiação UVA), recebem aplicações do produto na região dorsal e são expostos a uma série de doses controladas de radiação UV gerados por uma fonte que simula o espectro da luz solar (ANVISA, RDC nº 30, 2012). Este estudo permite avaliar a dose mínima que irá gerar o eritema (MED – *minimal erythema dose* - para radiação UVB) ou pigmentação persistente (PPD – *persistent pigment darkening* - para radiação UVA). O valor do fator de proteção solar (FPS), o qual avalia a proteção à formação de eritema após a exposição à radiação UVB, e o fator de proteção UVA (FP-UVA) são valores de proteção exigida para a comercialização de produtos fotoprotetores (ANVISA, RDC nº 30, 2012). O estudo apenas permite quantificar a resposta final da exposição à radiação UV, quanto ao desenvolvimento de inflamação e pigmentação, enquanto que os danos ao DNA e outras alterações nas células da pele não são considerados por este método.

Diversos estudos *in vitro* utilizando culturas celulares humanas já foram desenvolvidos e validados para avaliar a segurança de produtos para a pele, como os ensaios de corrosão (OECD nº 435, 2006; OECD nº 431, 2004), irritação (OECD nº 439, 2010), genotoxicidade (OECD nº 487, 2014; OECD nº 473, 2014) e o teste OECD 432 que avalia a fototoxicidade de compostos frente à radiação UVA (3T3 NRU PT, OECD nº 432, 2004). Este último teste avalia o potencial fototóxico agudo, por comparação da citotoxicidade, de compostos na presença e ausência de doses não-tóxicas de radiação UVA (DOMINGUEZ e col., 2011). Embora não padronizado e validado para este fim, o protocolo de fototoxicidade é muitas vezes empregado para avaliação de fotoproteção (ZANATTA e cols., 2010). Outro teste de fototoxicidade que utiliza o modelo de pele 3D *in vitro* (*Human 3-D Skin model in vitro Phototoxicity test* - H3D-PT) também é empregado para ensaios de fotoproteção (GASPAR e cols., 2013; KEJLOVÁ e cols., 2007).

Métodos alternativos empregando culturas celulares que permitam avaliar os danos precoces das radiações UVA e UVB às células da pele, bem como a atividade fotoprotetora de compostos de interesse, ainda não foram validados. Desta forma, o desenvolvimento de modelos *in vitro* que possam utilizar parâmetros precoces indicativos de lesões induzidas pela radiação UV na pele e prever a atividade fotoprotetora, podem auxiliar na avaliação mais eficaz de compostos que protejam a pele da radiação solar.

Os efeitos deletérios promovidos pela exposição excessiva e crônica à radiação UV já foram amplamente descritos, incluindo efeitos agudos como queimaduras e imunossupressão (COOPER e col., 1992), e crônicos como câncer e envelhecimento prematuro da pele (FISHER e col., 1997). Ambas as radiações UVA e UVB promovem reações fotoquímicas de sensibilização do tipo I, correspondendo à absorção direta da energia solar por substâncias cromóforas (p. e. DNA), ou do tipo II, onde a absorção da energia solar é realizada por um oxigênio molecular levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (WONDRAK e col., 2006). A regulação de ERO intracelular é controlada por antioxidantes endógenos enzimáticos, como catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, e não-enzimáticos, como vitamina A, vitamina E, glutathione entre outras. Antioxidantes são alterados quimicamente devido à oxidação por espécies reativas e sua ação é geralmente limitada pela quantidade presente na pele (MURRAY e col., 2008). A produção exacerbada de ERO devido à radiação UV resulta em danos oxidativos de macromoléculas, proteínas e lipídeos (SANDER e col., 2002), ativando ou inativando enzimas e alterando cascatas sinalizadoras. A liberação de citocinas/quimiocinas inflamatórias também ocorre nos sítios irradiados (PILLAI e col., 2005; CLYDESDALE e col., 2001) e são estimulados devido ao aumento de ERO intracelular. Alterações na resposta imune devido à exposição à radiação UV dependem de fatores genéticos, da dose recebida e da frequência de exposição à luz UV e sua fonte (CORRÊA e col., 2010).

Os filtros solares empregados em produtos fotoprotetores atuam na pele por mecanismos de absorção ou reflexão da radiação UV. Contudo mesmo com o uso destes filtros, parte da radiação UV é absorvida por células da pele devido à má distribuição ou baixa quantidade do produto fotoprotetor aplicado sobre a pele. Bernerd e col. (2003) ilustram que o potencial fotoprotetor atribuído a duas formulações de valores similares de FPS não previne igualmente os danos na derme, relacionados ao fotoenvelhecimento.

O uso de compostos que auxiliam as defesas naturais contra os efeitos danosos da luz UV serviria para compensar o enfraquecimento do sistema de defesa da pele (WIRTH e col., 2008). Um ponto importante para evitar o dano cutâneo induzido pela radiação UV é a aplicação de compostos com atividade antioxidante. Dentre estes compostos destacam-se aqueles derivados de extratos vegetais. A combinação de polifenóis em fotoprotetores ou em produtos para cuidados da pele poderia proporcionar uma estratégia efetiva para reduzir estes efeitos danosos e assim auxiliar na prevenção do câncer de pele e do fotoenvelhecimento devido à exposição aos raios solares (NICHOLS e col., 2010; HEO e col., 2001). Produtos contendo filtros solares e vitamina C, E, β -carotenos e compostos fenólicos com atividade

antioxidante tem sido incorporado em formulações, proporcionando feitos benéficos à pele como a redução na geração de ERO e do estresse oxidativo ocasionado pela luz UV, prevenindo assim eventos patológicos como fotoenvelhecimento e câncer (SVOBODOVÁ e col., 2003).

Os polifenóis são moléculas produzidas por plantas e são caracterizados pela presença de pelo menos uma unidade de fenol na estrutura molecular (MURRAY e col., 2008). Estes compostos podem atuar como moduladores dos efeitos bioquímicos ocasionados pela radiação UV, como o ácido cafeico (SAIJA e col., 2000), silimarina (MEERAN e col., 2006), quercetina, resveratrol, polifenóis do chá-verde (epigallocatequina, epicatequina, epicatequina-3-galato e epigallocatequina-3-galato) (KATIIYAR & ELMETS, 2001) e o 4-nerolidilcatecol (ROPKE e col., 2006). Antioxidantes funcionam por mecanismos diferentes dos filtros solares, oferecendo proteção à pele através da modulação da resposta celular, e a combinação destes providenciaria melhor efeito fotoprotetor à pele (MURRAY e col., 2008).

Diferentemente do valor de FPS e FP-UVA, que possui um sistema de avaliação legalmente padronizado, a avaliação de antioxidantes como agente fotoprotetor não possui ainda um método de avaliação padronizado (PALMER e col., 2010). A associação de testes com matrizes poliméricas e estudos de marcadores biológicos *in vitro* em culturas de células expostas à radiação UVB e UVA torna-se viável para os estudos de fotoproteção.

O presente estudo traz como objetivo estudar em cultura de células da pele (HaCaT - queratinócito humano imortalizado e FHPD- fibroblasto humano primário da derme) exposta à radiação UVA e UVB a atividade fotoprotetora de 3 compostos fenólicos com atividade antioxidante, ácido clorogênico (ACG), rosmarínico (AR) e cafeico (AC). Este estudo permitirá avaliar a capacidade destes compostos em modular os eventos iniciais induzidos em células expostas à radiação UVA e UVB relacionados ao fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese.

1.1 Revisão Bibliográfica

Efeito da radiação Ultravioleta (UV) sobre a pele

A luz solar é composta por um espectro contínuo de radiação eletromagnética, dividida de acordo com o conteúdo energético e o intervalo do comprimento de onda (λ). As principais radiações que atingem a Terra são as radiações UV, de 190-400nm, a radiação visível, de 400-780nm e a infravermelha, acima de 780 nm.

A radiação UV pode ser subdividida em 3 tipos, UVA, UVB e UVC, conforme seu comprimento de onda (de 400-320, 280-320 e 280-190 nm, respectivamente). A UVA é aproximadamente 20 vezes mais penetrante na pele humana do que a UVB e por ser um comprimento de onda maior é responsável pelas mudanças observadas na derme fotoenvelhecida. A radiação UVB, com menor comprimento de onda, é absorvida principalmente pela camada mais externa da pele, a epiderme (AGAR e col., 2004). Contudo, ambas as radiações interferem nos diversos tipos celulares da pele. A radiação UVC não está presente no espectro solar que atinge a terra (WONDRAK e col., 2006), pois é 100% absorvido pela camada de ozônio.

A exposição crônica e excessiva à radiação UV resulta em efeitos deletérios à pele humana, podendo gerar quadros clínicos agudos como queimaduras e imunossupressão (COOPER e col., 1992), e crônicos como câncer e envelhecimento prematuro da pele (FISHER e col., 1997). Clinicamente, o fotoenvelhecimento da pele é caracterizado pela presença de rugas profundas, flacidez, pigmentação irregular, manchas e aparência escamosa (aspecto ressecado) em contraste com a pele cronicamente envelhecida e protegida da radiação UV, que se apresenta fina com elasticidade reduzida e rugas finas (SCHARFFETTER-KOCHANNEK e col., 2000).

A radiação UV desencadeia reações fotoquímicas na pele a partir da excitação de elétrons em moléculas cromóforas, podendo interagir diretamente com substratos moleculares, como o DNA (reações de foto-sensibilização tipo I) ou indiretamente, gerando oxigênio molecular (reações de fotossensibilização tipo II) e produzindo ERO (WONDRAK e col., 2006). Em sistemas biológicos, a luz pode interagir tanto com moléculas fotossensíveis exógenas, originárias de fármacos ou cosméticos, quanto endógenas, como ácidos nucleicos e proteínas. Dependendo do tempo de exposição, comprimento de onda e da região exposta, essas interações podem produzir, direta ou indiretamente, efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células da pele (DE GRUIJL, 2002).

O estresse oxidativo promovido pela radiação UV na pele (foto-oxidação) ocorre devido à formação de ERO por cromóforos endógenos, atuando como fotosensibilizadores (SCHARFFETTER-KOCHANNEK e col., 1997). Apesar das ERO serem rapidamente removidas por antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, tioredoxina redutase e glutathione peroxidase) e não-enzimáticos (tocoferol, glutathione e ácido ascórbico), a sua exacerbação na pele pode resultar na deterioração estrutural e funcional das células, levando ao estresse oxidativo e dano oxidativo fótico de proteínas e outras macromoléculas (SANDER e col., 2002). O estresse foto-oxidativo na pele apresenta papel central na iniciação e condução de resposta celular (RITTIE e col., 2002), ativando diversas vias de sinalização celular como indução da proteína p53 (MÉPLAN e col., 2000), de proteína-quinases ativadoras de mitose (MAPK) (IORDANOV e col., 1998, ASSEFA e col., 1997), da resposta inflamatória e de metaloproteinases de matriz (MMP) (RITTIE e col., 2002, INOMATA e col., 2003; ONOUE e col., 2003).

A formação de fotoprodutos, ERO e do processo inflamatório induzido pela radiação UV estão relacionados à iniciação da mutagênese e carcinogênese da pele (NISHIGORI, 2006). Existem diferenças no mecanismo de indução de dano celular entre as radiações UVA e UVB. Enquanto que a radiação UVA é caracterizada pelo dano indireto no DNA devido à formação de ERO, a radiação UVB é caracterizada por danificar diretamente o DNA (BRENNER e col., 2005). A absorção da radiação UVB pelo DNA resulta principalmente na formação de dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPD) e de pirimidina-pirimidona [(6-4) PD], enquanto que a radiação UVA promove indiretamente a oxidação de resíduos de guanina, formando 8-oxo-7,8-diidro-2' -deoxiguanosina (8-oxo-dG) (WONDRAK e col., 2006). A capacidade da luz UV em induzir a formação de fotoprodutos de DNA diminui exponencialmente com o aumento do comprimento de onda, sugerindo que a radiação UVA ainda é capaz de gerar danos ao DNA, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (FREEMAN e col., 1987; MATSUNAGA e col., 1991; KIELBASSA e col. 1997; LEY & FOURTANIER, 2000). Douki e col. (2003) relataram que, em células expostas à radiação UVA, rupturas de única fita de DNA, formação de pirimidinas oxidadas, purinas oxidadas (especialmente resíduos de guanina), e CPD ocorrem em uma relação de 1:1:3:10.

A reparação de DNA danificado é uma das primeiras respostas da célula aos danos ocasionados pela radiação UV. O produto do gene *TP53* é uma fosfoproteína nuclear curta multifuncional, que apresenta papel fundamental na modulação dos genes reguladores do reparo de DNA danificado (KOMAROVA e col., 2005; SMITH e col., 1997). A proteína p53 atua promovendo a remoção de fotoprodutos, principalmente os CPD (ZATTRA e col.,

2009) e os danos oxidativos do DNA (ACHANTA e col., 2004), protegendo a integridade do genoma (LANE e col., 1992). A Poli-(ADP-ribose) polimerase (PARP) é uma enzima nuclear que controla uma variedade de processos celulares, como reparação do DNA, regulação da transcrição, formação de corpos sub-nucleares e inibição da divisão celular (SANDHU e col., 2013; GIBSON e col., 2012). A proteína PARP participa diretamente do reparo de DNA lesionado por ruptura ou oxidação (QIN e col., 2012), através do processo de excisão de bases (SANDHU e col., 2013) após a exposição à radiação UV. O bloqueio no ciclo celular também ocorre após a exposição à radiação UV visando à reparação celular. O gene CDKN1A é alvo da proteína p53 e o seu transcrito (proteína p21) apresenta papel regulador do ciclo celular (PONTÉN e col., 1995), inibindo a atividade do complexo ciclina-CDK, bloqueando a transição entre a fase G1 (gap1) para a S (Síntese) do ciclo celular (PARRISH e col., 1978) e evitando assim a replicação de DNA lesionado.

A exposição da epiderme à radiação UVB em doses próximas ou abaixo da dose eritematosa mínima leva a formação de células de queimadura solar (SBC - *Sunburn cells*). As SBC, caracterizadas por queratinócitos em processo de apoptose, são resultantes da ação do gene supressor tumoral *TP53* como mecanismo final para lidar com DNA danificado (VERSCHOOTEN e col., 2010) e eliminação de células potencialmente transformadas (MURPHY e col., 2001; HEENEN e col., 2001). Outros mecanismos envolvidos na eliminação de queratinócitos potencialmente transformados são ativação de receptores de TNF/CD95 e o estresse oxidativo (MURPHY e col., 2001; SCHWARZ e col., 1995). O aumento na expressão de p53 resulta na ativação de proteínas pró-apoptóticas Bax, Faz/Apo-1 e DR5 ou na diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 e proteína inibidora de apoptose 2 (c-IAP2) (OUHTIT e col., 2000; PONTÉN e col., 1995). A relação entre as proteínas Bcl-2/ Bax tem sido considerada como um evento primário no processo apoptótico e na integridade das mitocôndrias (AFAQ e col., 2007). A via intrínseca da apoptose ocorre por translocação de Bax do citosol para a membrana da mitocôndria, levando a liberação do citocromo C mitocondrial e assim ativação da cascata de caspases (VAN LAETHEM e col., 2004; CORY e col., 2002). A via extrínseca da apoptose, também ativada após exposição à radiação UVB, ocorre após liberação de TNF- α , com ativação de receptores denominados “domínio de morte” (TNF, CD95) e consequente ativação das caspases via conjugação de caspase-8 e FADD (LEE e col., 2013). As caspases são cisteína-proteases que apresentam papel central durante a apoptose. Uma vez ativadas, as caspases clivam vários componentes celulares e principalmente o DNA (MARROT e col., 2003). Caspases pró-apoptóticas estão agrupadas em caspases promotoras (caspase-8, 9 e 10) e executoras

e estabelecendo a mutação (KAPPES e col., 2006). Assim, a baixa indução da proteína p53, implicaria numa maior chance de sobrevivência da célula com danos no DNA e maior capacidade do desenvolvimento do câncer de pele (KAPPES e col., 2006). Contudo, se o dano ocorrer no gene *TP53*, comprometendo a funcionalidade do gene, a célula perde sua capacidade apoptótica. Outro efeito ocasionado pela radiação UV devido a formação de CPD em queratinócitos é a liberação de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-10 e TNF- α (WOLF e cols., 2000; PETIT-FRERE e cols., 1998), afetando a resposta imune local e sistêmica, levando a perda da hipersensibilização de contato e capacidade apresentadora de antígeno (VINK e col., 2001).

A liberação de mediadores inflamatórios por uma variedade de células da pele após a exposição à radiação UV, resulta no aumento da permeabilidade de capilares, levando a infiltração e ativação de neutrófilos e outras células fagocíticas na pele (PILLAI e col., 2005; CLYDESDALE e col., 2001). Queratinócitos apresentam uma importante função na resposta inflamatória (KONDO, 1999), liberando vários mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas em resposta à radiação UV (PILLAI e col., 2005). Cultura de queratinócitos apresentam aumento na expressão e na transcrição de IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF- α quando submetidos à radiação UVA (AN e col., 2010; BASHIR e col., 2009; WU e col., 2008), enquanto que a radiação UVB estimula a liberação de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, Interferon (IFN)- γ e TNF- α (YOSHIZUMI e col., 2008) e bloqueia a expressão de IL-10 (SHEN e col., 1999). Warskulat e col. (2008) descreveram que fibroblastos quando submetidos à radiação UVA apresentaram aumento na expressão e liberação de IL-6, relacionando este efeito à ativação da expressão de collagenases (WLASCHEK e col., 1993). Estudos relacionados à liberação de citocinas por fibroblastos ainda são pouco relatados aos fibroblastos quando expostos à radiação UVA ou UVB.

A desidratação da pele é característica do fotoenvelhecimento e está diretamente relacionada à produção de ERO após a exposição à radiação UV (CAO e col., 2008). A perda normal de água pela barreira epitelial ocorre na camada mais externa da epiderme, o estrato córneo. O teor e a capacidade de retenção de água do estrato córneo muitas vezes diminuem após a exposição à UV, acarretando em danos a sua função e levando aos efeitos deletérios à pele como a formação de rugas e o retardamento da cicatrização (WEISS e col. 1988; ROUPE, 2001).

O movimento da água pela membrana plasmática ocorre por difusão pela bicamada de fosfolipídios ou através de canais de água, conhecido como aquaporinas (AQP) presente nos queratinócitos (HARA-CHIKUMA & VERKMAN, 2005; NAKAKOSHI e col. 2006). As

AQP compõem uma família de 13 pequenas (aproximadamente 30kDa) proteínas hidrofóbicas da membrana (VERKMAN, 2005) e estão envolvidas no transporte de fluidos, bem como em outros tipos de células não relacionados a transporte de fluidos. A AQP3 é especificamente expressa em queratinócitos da camada basal da pele (HARA-CHIKUMA & VERKMAN, 2005; VERKMAN, 2005) e apresenta papel crucial na hidratação da epiderme (MA e col., 2002), na migração celular e cicatrização de feridas (HARA e col., 2002; HARA & VERKMAN, 2003; CAO e col., 2006). Cultura de queratinócitos expostos à radiação UVB apresentam uma redução de AQP3 na membrana, sugerindo que esta diminuição é devida a presença de ERO na célula (CAO e col., 2008).

O aumento de ERO após a radiação UV induz a degradação oxidativa de membranas lipídicas e consequente liberação de ácido araquidônico. Concomitantemente, a radiação UVB leva ao aumento da expressão gênica e proteica de ciclooxigenase (COX)-2 em cultura de queratinócitos, promovendo a produção de prostaglandinas (PG) e exacerbando a resposta inflamatória. O aumento da COX-2 atua como inibidor da apoptose, aumentando a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (TSUJII e col., 1995). Devido a isso, a produção de COX-2 pode ser utilizada como marcador inicial a tumorigênese da pele (BUCKMAN e col., 1998). Mutações no gene *TP53* estão correlacionadas com aumento da expressão de COX-2 em células de câncer de estômago (LEUNG e col., 2001), portanto a integridade do *TP53* é essencial para garantir a homeostase da pele após a exposição à radiação solar. A inibição de COX-2 após a exposição de queratinócitos a radiação UV diminui a proliferação e diferenciação de queratinócitos e aumenta a apoptose de células danificadas (TRIPP e col., 2003). Portanto a inibição de COX-2 pode apresentar valor terapêutico na prevenção do câncer de pele induzido por radiação UV (ASSEFA e col., 2005).

Na derme, a matriz extracelular (MEC) é composta principalmente por colágeno tipo I e em menores quantidades de colágeno tipo III, elastina, proteoglicanos e fibronectina, a qual, juntamente com a barreira dermo-epidérmica fornece suporte mecânico a epiderme (SCHARFFETTER-KOCHANNEK e col., 2000). As fibrilas de colágeno são responsáveis pela resistência e elasticidade conferidas a pele (UITTO e col., 1986), enquanto que as fibras elásticas constituem elementos estruturais do tecido conjuntivo com núcleo central amorfo hidrofóbico de ligação cruzada de elastina envolta por microfibrilas ricas em fibrilinas (SCHARFFETTER-KOCHANNEK e col., 2000). A pele fotoenvelhecida apresenta alterações clínicas como perda de elasticidade devido ao prolongamento da rede de fibras elásticas pela junção derme-epiderme para o interior da derme. Alterações bioquímicas como a diminuição de precursores de colágeno tipo I (TALWAR e col., 1995), o aumento de colágeno tipo II

(SCHWARTZ e col., 1993) e aumento do processo degenerativo da elastina (WLASCHEK e col., 2001; TSUKAHARA e col., 2004; NAYLOR e col., 2011) também são características bioquímicas evidenciadas na pele fotoenvelhecida.

A degradação de componentes da MEC ocorre pela ação de MMP resultando a remodelação do tecido conjuntivo. As MMP são enzimas da família de metaloendopeptidases, dependentes de zinco, que clivam componentes proteicos da MEC, moléculas de superfície e outras proteínas pericelulares (EGEBLAD & WERB, 2002). A radiação UV eleva a síntese das MMP, como MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9 e -12 (RITTIE e col., 2002, INOMATA e col., 2003). As MMP-2 e -9, pertencentes ao grupo das gelatinases, possuem a capacidade de degradar e desnaturar o colágeno (STEFFENSEN e col., 2001; VISSE e col., 2003). Gelatinase A (MMP-2, 72 kDa) é expressa em uma variedade de células normais e transformadas, incluindo fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e condrócitos, enquanto que a Gelatinase B (MMP-9, 92 kDa) é produzida por queratinócitos, monócitos, macrófagos e diversas células neoplásicas (KERKELA e col., 2003). A MMP-9 possui um papel importante na regulação da biologia de leucócitos no contexto da resposta inflamatória (ROSARIO e col., 2004; OPDENAKKER e col., 2001). Neutrófilos estão presentes na derme 6 h após a irradiação e seu número aumenta significativamente após 24 h da irradiação (SCHOMAGEL e cols., 2004; LEE e cols., 2008). Assim, a liberação de MMP após exposição à radiação UV é uma combinação da liberação por queratinócitos, fibroblastos e neutrófilos infiltrados na pele, e o desenvolvimento de inibidores de MMP é um importante foco (VAYALIL e col., 2004) para prevenir as lesões induzidas pela radiação solar.

Além das mudanças na organização dos componentes estruturais do tecido conjuntivo após a exposição à radiação UV, o fibroblasto residente da derme pode desaparecer da derme papilar devido ao processo de morte celular (BERNERD e col., 1998) ou se tornar senescentes devido às alterações da MEC fotoenvelhecida (VARANI e col., 2000).

Compostos fenólicos como agentes fotoquimioprotetores

Fatores como exposição à radiação UV, à xenobióticos, ou o desenvolvimento de doenças crônicas exacerbam a produção de ERO nas células. O estresse oxidativo é desencadeado no organismo devido ao acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), promovendo a depleção de ATP, NADPH e GSH e consequente aumento de cálcio intracelular (YEN e col., 2002). Este processo apresenta um

papel central na iniciação e condução de eventos que levam à iniciação da mutagênese e carcinogênese (NISHIGORI, 2006). Tanto a produção de radicais livres quanto o estresse oxidativo são conhecidos como fatores importantes na etiologia de diversas doenças crônicas (BABICH e col., 2003), como câncer, diabetes, desordens neurológicas entre outras assim como no processo de envelhecimento (VALKO e col., 2007).

Diversos compostos de origem vegetal têm recebido especial atenção para uso como agentes fotoprotetores (TOMARINO e col., 2006). Polifenóis naturais apresentam efeitos benéficos na prevenção do câncer relacionado à sua propriedade antioxidante (AGARWAL e col., 1993). A presença de grupos hidroxilas em arranjo catecol (posição para) no anel aromático e de grupamentos doadores de prótons (como exemplo hidroxilas, carboxílico, tiol) são estruturas que permitem aos polifenóis apresentarem atividade antioxidante (LU e col., 2006; LEE e col., 2007; RICE-EVANS e col., 1997). Antioxidantes aplicados topicamente ou administrados oralmente apresentam uma perspectiva promissora de prevenção de doenças cutâneas ao enriquecer o sistema antioxidante cutâneo endógeno (ROPKE e col., 2006; AFAQ e col., 2002, SAIJA e col., 1998; FUCHS, 1998; LOPEZ-TORRES e col., 1998). Compostos como os flavonóides, fenilpropanóides e fenólicos, individualmente ou em combinação, auxiliam na atividade antioxidante (RICE-EVANS e col., 1997), sendo capazes de atuar em cascatas sinalizadoras que inibem danos ao DNA (RICE-EVANS e col., 2000).

Compostos derivados do ácido cinâmico como os ácidos rosmarínico (AR) e clorogênico (ACG) foram escolhidos para os ensaios de fotoproteção devido a semelhanças estruturais com substâncias com conhecida atividade fotoprotetora como, por exemplo, o metoxicinamato de octila. Compostos derivados do ácido cinâmico são descritos em absorver a radiação solar apenas no comprimento da UV (EDREVA e col., 2005). Ambos os compostos, AR e ACG, são formas esterificadas do cafeico e devido a isso o ácido cafeico (AC) também foi escolhido para avaliar a participação do núcleo fenólico isoladamente quanto a possível atividade fotoprotetora.

Ácido Rosmarínico

O ácido rosmarínico (AR; Figura 2) é um composto fenólico, éster derivado de ácido cafeico com ácido 3,4-dihidroxifenil láctico (SÁNCHEZ-CAMPILLO e col., 2009). Diversas plantas aromáticas e não-aromáticas da família Lamiaceae apresentam AR como o Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Sálvia (*Salvia officinalis* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.),

lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), bálsamo (*Melissa officinalis* L.) e hortelã (*Mentha spicata* L.) (WANG e col., 2004; AL-SEREITI e col., 1999).

Ácido Rosmarínico (AR)

Figura 2. Estrutura química do ácido rosmarínico

O AR apresenta inúmeras aplicações, desde como conservantes alimentares até cosméticos. Várias atividades biológicas de interesse já foram relatadas, incluindo ação antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante, justificando seus efeitos benéficos e promotores de saúde (SÁNCHEZ-CAMPILLO e col., 2009). A atividade antioxidante do AR foi descrita por diversos tipos de ensaios *in vitro* como inibidores de lipoperoxidação, de radicais livres e como quelante de íons metálicos (FRANKEL e col., 1996; SÁNCHEZ-CAMPILLO e col., 2008; DING e col., 2010).

Cultura de HaCaT exposta à radiação UVA e tratadas com AR por 6 horas após a radiação apresentaram recuperação da viabilidade celular, com redução na produção de ERO, na expressão de Caspase-3 e da fragmentação do DNA (PSOTOVÁ e col., 2006). Quando exposta à radiação UVB, o AR reduziu a fragmentação de DNA, a atividade de Caspases-3 e 9, a produção de ERO e a liberação de IL-6 (VOSTÁLOVÁ e col., 2010). A partir de evidências como efeito melanogênico (LEE e col., 2007) e efeito antioxidante, Sanches-Campillo *e col.*, (2008) propõe que o AR possa ser usado como agente fotoprotetor. Contudo, todos os estudos anteriormente descritos foram conduzidos com o tratamento de AR após a exposição das células à radiação UV. Nenhum estudo foi conduzido em células tratadas previamente com o composto e expostas à radiação.

Ácido Clorogênico

O Ácido Clorogênico (ACG; Figura 3) é um éster do ácido cafeico com o ácido quínico e é um dos compostos polifenólicos mais abundantes, encontrados em vários

produtos agrícolas como o café, feijão, batatas e maçãs (ZANG e col., 2003; NARDINI e col., 2002; ZHAO e col., 2008).

Ácido Clorogênico (ACG)

Figura 3. Estrutura química do ácido clorogênico

Experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram as várias propriedades biológicas do ACG como atividade antibacteriana, antioxidante e anticancerígena (ALMEIDA e col., 2006; KONO e col., 1998; HUANG e col., 1988; BANDYOPADHYAY e col., 2004; FENG e col., 2005). A atividade antioxidante do ACG foi descrita por ensaios *in vitro* como inibição da oxidação de lipídios (MARINOVA e col., 2009), de radicais livres (KONO e col., 1997) e como quelante de íons metálicos (KONO e col., 1998). Em células neoplásicas, o ACG inibiu a atividade de MMP-9 (JIM e col., 2005) e a secreção de proMMP-2 (BELKAID e col., 2006), enquanto que Granado-Serrano e col. (2007) mostraram que o ACG diminuiu a formação de ERO e aumentou os níveis de glutathione em células de hepatomas. Contudo, o efeito do ACG parece não interferir na ativação de apoptose (RAMOS e col., 2005; GRANADO-SERRANO e col., 2007) não ativando a caspase-3 ou alterando os níveis de Bax (pró-apoptótico) ou de Bcl-xl (anti-apoptótico) em células de hepatoma (GRANADO-SERRANO e col., 2007).

Estudo de permeação comparativa entre os ácidos clorogênico e cafeico em pele de orelha de porco demonstrou que ambos os compostos são capazes de penetrar através do estrato córneo sendo que o ácido clorogênico possui uma absorção percutânea superior em relação ao ácido cafeico (MARTI-MESTRES e col., 2007). Queratinócitos murinos quando expostos à radiação UVB e tratados com ACG apresentam redução de AP-1 e NF-kB, de modo concentração-dependente, e redução de fosforilação das MAPK (JNK, p38, ERK, MKK4) (FENG e col., 2005). Contudo, nenhum estudo foi conduzido em células de queratinócito ou fibroblastos humanos tratados previamente com o composto ACG e expostos à radiação UV.

Ácido Cafeico

O ácido cafeico (AC; ácido 3,4-dihidrocinâmico; Figura 4) é um ácido fenólico largamente presente em diversos produtos alimentares de origem vegetal como sementes de girassol, café e seus derivados, erva mate entre outros (STANIFORT e col., 2006). O AC e seus derivados ésteres são substratos que podem ser oxidados por enzimas vegetais, como oxidases polifenólicas, ou por influência de metais, podendo desencadear oxidação de diversos componentes celulares (BASSIL e col., 2009; SIMÕES e col., 1999).

Figura 4. Estrutura química do ácido cafeico

Diversos estudos descrevem sua ação antioxidante *in vitro* como sequestrador de radicais livres, inibidor de peroxidação lipídica e como quelante de íons metálicos (GÜLÇİN, 2005; WANG e col., 2012).

O AC tem mostrado um amplo espectro de atividades biológicas e diversos estudos sugerem sua eficácia como fotoprotetor em uso tópico. Estudos de permeação cutânea mostraram que o AC é absorvido pela pele tanto em solução de pH 3 quanto de pH 7.2 (SAIJA e col., 2000). Análises indicam que o AC impede a degradação por oxidação de colágeno tipo III promovido pela xantina oxidase (FACINO e col., 1995) sugerindo assim um efeito protetor na matriz colagênica da derme quando exposta a espécies reativas.

Estudos *in vitro* com cultura de células humanas expostas da radiação UV mostram que o tratamento com AC impede liberação de MMP-1, aumenta expressão de catalase e GPx, mantém níveis basais de antioxidantes endógenos, inibe danos ao DNA, diminui a atividade da xantina oxidase e impede a formação de produtos de lipoperoxidação (LARROSA e col., 2008; PRASAD e col., 2009; HSIEH e col., 2005; PLUEMSAMRAM e col., 2012). Animais expostos à radiação UV e tratados com AC apresentaram redução na expressão de IL-10, inibição da cascata MAPK p38, inibição da atividade da xantina oxidase e dos níveis de malonildialdeído, prevenindo assim a imunossupressão no local, transcrição

de AP-1 e NF- κ B, produção de COX-2 e de PGE2 (STANIFORT e col., 2006; LARROSA e col., 2008). O AC também inibiu a geração de espécies reativas na pele de camundongos quando expostos a radiação UVA (SAKURAI e col., 2005).

Ensaio clínico já foram conduzidos com aplicação tópica de AC 3 horas após a exposição à radiação UVB e mostraram que o AC previne a formação de eritema em até 26% em relação ao grupo controle (SAIJA e col., 2000).

2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar em cultura de células da pele (HaCaT - queratinócito humano imortalizado e FHPD - fibroblasto humano primário dermal) exposta às radiações UVA e UVB a atividade fotoprotetora de compostos fenólicos com atividade antioxidante, a saber, dos ácidos cafeico (AC), clorogênico (ACG) e rosmarínico (AR). Adicionalmente, a eficácia fotoprotetora dos compostos foi analisada por espectrofotometria de reflectância.

Para atingir este objetivo um estudo foi realizado para identificar no modelo proposto os parâmetros associados à exposição às radiações UVA e UVB. Na segunda etapa as células foram tratadas com os compostos e posteriormente expostas às radiações visando a estudar o possível efeito fotoprotetor dos compostos selecionados

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares, cultivo e tratamento com os compostos.

Fibroblastos humanos primários (FHPD) foram isolados em nosso laboratório a partir de peças de cirurgia de prepúcio e empregados em passagens entre 2 a 18, Queratinócito humano imortalizado (HaCaT) foram doadas pelo Prof. Dr. Enrique Boccardo (Laboratório de Virologia; Instituto Ludwig - SP) e empregadas em passagens entre 2 a 8. As células foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e antibióticos (penicilina e estreptomicina). O pH (7.4) e a temperatura foram mantidas na faixa fisiológica por incubação em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade saturada. Estoques celulares foram congelados, com passagens entre 5 a 12 em meio de cultura contendo 8% de dimetilsulfóxido e 30% de SFB em freezer -80° C. As taxas de dobramento das linhagens em fase Log foram calculadas e são de 24 horas e 14 horas para FHPD e HaCaT respectivamente.

Para os ensaios de viabilidade celular, os ácidos rosmarínico (AR), clorogênico (ACG) e cafeico (AC), foram empregados em diferentes concentrações (Tabela 1).

Tabela 1: Concentrações dos compostos utilizadas nos experimentos de viabilidade celular nas células empregadas no estudo.

Ácido Rosmarínico (µM)		Ácido Clorogênico (µM)		Ácido Cafeico (µM)	
HaCaT	FHPD	HaCaT	FHPD	HaCaT	FHPD
100	50	800	100	100	100
200	100	1000	200	200	150
400	150	1200	300	300	200
600	175	1400	400	400	250
800	200	1600	500	500	300

3.2. Ensaios com as radiações UVA e UVB

Para estabelecer as doses de radiação UVA e UVB a serem utilizadas nos estudos de fotoproteção, culturas de HaCaT e FHPD foram expostas à radiação UVA ou UVB de acordo com o protocolo de fototoxicidade descrito pela ECVAM (2010) com modificações. As células foram plaqueadas em placa de 24 poços e quando apresentaram 65-70% de confluência, os meios das culturas foram removidos, seguido de 2 lavagens com PBS-A

estéril e substituídos por uma fina camada (300µL) de PBS-A. As células foram expostas à radiação UVA (400-320nm) ou UVB (320-280 nm) emitidas por Simulador Solar (Sciencetech Inc., London, Ontário, Canadá) empregando-se uma lâmpada OSRAM (Xenon Arc XBO 2500W/HS OFR, Berlin, Alemanha). Os filtros empregados para a obtenção da radiação UVA foram filtros UV Hot, UV pass e UVB cut, e para a radiação UVB foram empregados os filtros UV Hot, UV pass e UVB. Curvas de viabilidade dose-resposta foram estabelecidas para ambas as células pelo método de NRU (Barenfreund e col., 1984) e as doses a serem utilizadas nos ensaios de fotoproteção (10 J/cm² de UVA e 24 mJ/cm² de UVB) foram estabelecidas considerando a célula mais sensível (HaCaT).

Os ensaios de fotoproteção com os compostos AR, ACG e AC foram conduzidos com a menor concentração não citotóxica detectada nos ensaios de citotoxicidade por NRU (Anexo I). O tratamento com os compostos foi realizado durante 1 hora antes da exposição às radiações UVA e UVB separadamente (Figura 5).

Figura 5. Esquema representativo do delineamento experimental com as culturas de Queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e Fibroblasto humano primário dermal (FHPD) expostos à radiação UVA ou UVB. As análises foram realizadas 30 minutos, 6 horas ou 24 horas após a exposição às radiações.

3.3. Parâmetros avaliados

3.3.1. Viabilidade Celular por exclusão do Azul de Tripan (AT).

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão do corante Azul de Tripan (0,4% Azul de Tripan em PBS pH 7,4), descrito por TENNANT e col., 1964, para a avaliação de citotoxicidade dos compostos. Células são consideradas não viáveis quando, ao se analisar

por microscopia óptica, apresentarem no seu interior o corante Azul de Tripan. Isto ocorre devido à perda da integridade da membrana e aumento de sua permeabilidade, permitindo a entrada do corante no interior das células. Células de HaCaT (3×10^4 células/poço) e FHPD (1×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e após 24 horas, quando apresentaram 60-70% de confluência, foram tratadas com os compostos fenólicos em meio de cultura contendo 10% SFB. Após 24 horas do início do tratamento, as células foram coletadas por tripsinização e à suspensão celular foi adicionado o corante Azul de Tripan (AT) a 0,4%. As suspensões de células foram contadas em câmara de Neubauer (2 campos por amostra). Os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

3.3.2. Viabilidade Celular por Retenção de Vermelho Neutro (NRU).

O método de retenção de vermelho neutro (NRU) foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Barenfreund e col. (1984) como um teste de viabilidade celular por quimio-sensitividade. O ensaio baseia-se na habilidade das células viáveis incorporarem e armazenarem o composto vermelho neutro. Esse composto fracamente catiônico penetra pela membrana celular por difusão iônica passiva e se concentra nos lisossomos em células viáveis, o qual se liga por ligação hidrofóbica eletrostática a grupos iônicos ou/e fosfatos da matriz lisossomal. Células de HaCaT (3×10^4 células/poço) e FHPD (1×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e após 24 horas, quando apresentaram 60-70% de confluência, as células foram tratadas com os compostos e/ou expostas à radiação UV. Após 24 horas, o meio de cultura das células foi substituído por DMEM contendo o composto vermelho neutro ($170 \mu\text{M}$). Após incubação por 3 horas em estufa de cultura (37°C , 5% de CO_2), o corante foi extraído das células viáveis com o uso de uma solução de ácido acético (1%) em etanol 50%, e a leitura da absorbância do corante foi quantificado a 540 nm em espectrofotômetro SynergyTM HT (BioTek Instruments INC., Winnoski, Vermont, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

3.3.3. Avaliação do Ciclo celular por Iodeto de propídio.

A avaliação do ciclo celular foi realizada por marcação com iodeto de propídio (IP). O IP é um agente intercalante de ácidos nucléicos que penetra na membrana de células viáveis após a incubação em tampão contendo Triton X-100 0.01% e citrato de sódio 0.01%. O método consiste na detecção e quantificação do conteúdo de material genético das células em

suspensão marcadas pelo IP, que passam alinhadas uma a uma pelo feixe de laser do citômetro de fluxo. Células de HaCaT (3×10^5 células/placa) e FHPD (1×10^5 células/placa) previamente semeadas sob confluência de 70-80% em placa p 35mm e carenciadas (cultivadas em meio DMEM sem SFB por 18 horas) foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos e/ou expostas à radiação UV. Como controle positivo do ensaio, um conjunto de células foi cultivado em meio de cultura na ausência de SFB por 24 horas. Após 24 horas, as células foram coletadas por tripsinização e lavadas 2 vezes com PBS-A não estéril, seguidas de centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos em cada lavagem. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão de incubação, adicionado de 80µg de enzima RNase A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), livre de proteases e DNases e incubado por 45 minutos em banho-maria 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram marcadas com 6 µg iodeto de propídio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e a fluorescência foi medida por citometria de fluxo (FACS). A quantificação de DNA foi analisada utilizando um citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) com o canal de fluorescência 2 (PI) para iodeto de propídio. As análises foram realizadas usando o software “Cell Quest” (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA), que analisa todas as células adquiridas (10.000/amostra). Os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

3.3.4. Avaliação de Morte (Apoptose/Necrose) por Anexina-APC/Iodeto de propídio.

A avaliação de morte por apoptose e necrose foi realizada por marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP). O IP é um agente intercalante de ácidos nucleicos, enquanto que a anexina-APC é uma proteína que se liga à fosfatidilserina (FS) de membrana. A presença de FS na membrana é decorrente de uma mudança estrutural da célula como indicativo de apoptose, e serve para a sinalização e reconhecimento por fagócitos. O método consiste na marcação de material genético por IP e/ou marcação de fosfatidilserina por anexina-APC nas células em suspensão, que passam alinhadas uma a uma pelo feixe de laser do citômetro de fluxo. Células de HaCaT (3×10^5 células/placas) previamente semeadas sob confluência de 70-80% em placa p35mm foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos e/ou expostas à radiação UV. Após 24 horas, as células foram coletadas por tripsinização e lavadas 2 vezes com PBS-A não estéril, seguidas de centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos em cada lavagem. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão de ligação (HEPES 10mM [pH7.4], NaCl 150mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM e CaCl₂ 1,8mM), contendo Anexina-APC em diluição

1:500 e incubado por 20 minutos, temperatura ambiente, no escuro. Após incubação, as amostras receberam 80µg de IP e a fluorescência foi medida por citometria de fluxo (FACS). A quantificação foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) com o canal de fluorescência PI para o IP e canal APC para anexina-APC. As análises foram realizadas usando o software “Cell Quest” (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA), que analisa todas as células adquiridas (10.000/amostra). Os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

3.3.5. *Quantificação de proteínas p53, p21, PARP, Caspase-3 e -9 e AQP3.*

As proteínas p53, p21, PARP, AQP3, Caspase-3 e 9 foram quantificadas por ensaios de *Western blotting* de acordo com a metodologia descrita em CORRÊA e col., (2010). Os anticorpos primários para p53 (CM1; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), p21 (p21^{Waf1/Cip1}; Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, EUA), PARP (46D11 - Rabbit mAb - Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, EUA), Caspase-3 (Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, EUA), Caspase-9 (Human Specific; Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, EUA) e AQP3 (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) foram utilizados. Como controle de ensaio foram utilizadas as proteínas endógenas α -tubulina (52kDa; t5168, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e β -actina (43kDa; a5441, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). A diluição dos anticorpos primários foi feita de acordo com o sugerido pelo fabricante, enquanto que os secundários foram diluídos 1:5000. Células de HaCaT e FHPD foram plaqueadas em placa 6 poços e após atingirem confluência de 60-70% as células foram tratadas com os compostos e/ou expostas a radiação UVA ou UVB. Após 24 horas do tratamento e/ou exposição à radiação, a proteína foi coletada com tampão RIPA modificado (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 5% Nonidet P-40, 0.1mM EDTA), de acordo com Patridge e col. (2007), acrescido com inibidores de protease SIGMAFAST™ (Protease Inhibitor Tablets, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), 3µg de Aprotinina, 10µg de Pepstatina A e 10µg de Leupeptina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). Após centrifugação por 10 minutos a 10.600 xg, os sobrenadantes foram coletados e as amostras de proteínas quantificadas por Bradford e col. (1976).

Géis SDS-PAGE de 10-15% de acrilamida foram preparados para a separação protéica contendo 30µg de proteína total de cada amostra, acrescidas de tampão de amostra 5x (312,5mM Tris-HCL pH 6.8, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,01%, 25% β -mercaptoetanol) e aquecimento por 5 minutos a 95° C (condições denaturantes). O padrão de

peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foi utilizado para a corrida, em cada gel. A corrida foi feita por 30 minutos, 50V (para o gel de empacotamento) e 120 minutos, 100V (para o gel de separação) com tampão de corrida (25mM Tris-base pH8.3, 0,2M Glicina, 0,1% SDS). A transferência úmida foi feita em membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF Amersham Hybond-P, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), a 4° C, por 120 minutos, 70V na presença de tampão de transferência (25mM Tris-base pH8.3, Glicina 0,2M) contendo 20% de metanol.

A incubação das membranas com os anticorpos primários foi realizada a 4° C, overnight (12-18 horas), com incubação prévia em TBS-T (24,8mM Tris-base pH 7.6, 137mM NaCl, 2,8mM KCl, 0.1% Tween 20) ou PBS-T (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4, 0.1% Tween 20) acrescido de 5% leite sem gordura ou 3% de BSA por 1 hora em temperatura ambiente. As lavagens entre a incubação com anticorpo primário e secundário e do secundário até a revelação foram feitas em TBS-T ou PBS-T (3 vezes, 10 minutos cada lavagem). A incubação com anticorpo secundário foi feita em TBS-T ou PBS-T por 1 hora a temperatura ambiente com ECL anti-rabbit IgG (Horseradish peroxidase linked whole antibody [from donkey], GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) ou ECL anti-mouse IgG (Horseradish peroxidase linked whole antibody [from sheep], GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As membranas foram reveladas com kit ECL (AmershamTM ECLTM Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) em filme Amersham HyperfilmTM ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As bandas foram quantificadas com o software ImageJ 1.44p (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.6. Quantificação da expressão gênica de AQP3 e CDKN1A.

A expressão gênica de AQP3 e CDKN1A (p21) foi analisada por *Real Time*-PCR com kit TaqMan (TaqMan Universal Master Mix II, with UNG; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as sugestões do fabricante.

Para a obtenção de RNA, células de HaCaT foram plaqueadas em placa de 100mm e após atingirem confluência de 60-70% foram tratadas com os compostos e/ou exposta à radiação UVA ou UVB. Após 24 horas, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, secas por escoamento e o RNA extraído por kit RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação de RNA foi feita em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA). RNA de boa qualidade foi considerado

quando a relação de 230/260 e a de 260/280 apresentaram valores próximo de 2,0. Géis de agarose 1% foram utilizados para conferir a integridade e qualidade do RNA, onde foram considerados satisfatórios quando apresentavam bandas referentes às frações 28S e 18S, sem detecção de outras bandas.

A obtenção de cDNA foi realizada com kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a partir de amostras de RNA extraídos, seguindo as instruções do fabricante.

As reações de *Real time*-PCR foram feitas em volume final de 10µL contendo 5µL de Master Mix e 3,5µL água livre de RNA e DNA, fornecidos pelo kit TaqMan Universal Master Mix II e 1µL da amostra de cDNA. Os primers utilizados foram de CDKN1A (p21; Hs00355782_m1), AQP3 (Hs01105469_g1), GAPDH (Hs01060665_g1) e ACTINA (Hs02758991_g1). Os desenhos dos primers são de responsabilidade do fabricante do kit TaqMan. As leituras foram realizadas em equipamento *Fast-RT*-PCR System com auxílio do software 7500 V2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para a análise da expressão gênica foi utilizado o método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta Ct$) descrito por Livak & Schmittgen, 2001 e Schmittgen & Livak, 2008. Calcula-se inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores de Ct (*Threshold cycle* ou limiar do ciclo) do gene controle, GAPDH ou Actina, dos valores de Ct do gene alvo. Após a determinação do ΔCt da amostra, escolhe-se a amostra normalizadora (Controle NT, NT UVB e NT UVA). Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(amostra)} - \Delta Ct_{(amostra\ normalizadora)}$$

Uma vez determinado o $\Delta\Delta Ct$, aplica-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que resulta no valor da expressão relativa.

Para a realização dos ensaios de *rt*-PCR, primeiramente foi realizada a curva de eficiência das amostras do estudo. Um *pool* de todas as amostras (Tratamentos X não irradiado + Tratamento X irradiado por UVA e UVB) em diversas concentrações (puro, 1:3, 1:9, 1:27 e 1:81) foi avaliado para os genes de interesse (AQP3 e CDKN1A) e os endógenos (B2M, HMBS, ACTINA, S18, GAPDH). Na seqüência, a escolha dos endógenos foi realizada com todas as amostras do estudo e foi selecionado o GAPDH e ACTINA a partir do *software* geNorm (VBA *applied for* Microsoft Excel; <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), onde é avaliado o gene mais estável entre as amostras.

3.3.7. Liberação e atividade de metaloproteinases (MMP)-1, 2 e 9.

A liberação de MMP-2 e 9 foi analisada nos sobrenadante de ambas as células, utilizado o ensaio de zimografia descrito conforme da KATO e col. (2002), com kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA) e com o kit MMP-2 e MMP-9 Biotrak Activity Assay System (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As células foram plaqueadas em placa de 24 poços e quando atingiram 60-70% de confluência foram tratadas com os compostos e/ou expostas à radiação UVA ou UVB. Durante as 24 horas seguintes, as células foram cultivadas em meio DMEM com 0.1% de BSA (Albumina sérica bovina). Os sobrenadantes foram coletados, centrifugados à 8.000 xg por 10 minutos e estocados em -80°C até a realização dos ensaios. A concentração de proteína total dos sobrenadantes foi determinada pelo método de Lowry (1951). Todos os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

Para o ensaio de zimografia, géis SDS-PAGE de 10% de acrilamida acrescidos de 0,05% de gelatina (EIA grade Reagent Gelatin, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foram preparados para a separação protéica contendo 30µg de proteína total por poço de cada amostra, acrescidas de tampão de amostra 5x (312,5mM Tris-HCL pH 6.8, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,01%). O padrão de peso molecular Precision Plus Protein All Blue Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foi utilizado para a corrida, em cada gel. A corrida foi feita por 30 minutos, 50V (para o gel de empacotamento) e 120 minutos, 100V (para o gel de separação) com tampão de corrida (25mM Tris-base pH 8.3, 0,2M Glicina, 0,1% SDS). Após a corrida, os géis foram lavados em solução 2,5% Triton X-100 (2 vezes, 10 minutos cada lavagem), e incubados overnight (16-18 horas) com solução de incubação (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM CaCl₂, 1µM ZnCl₂) em banho-maria à 37°C para ativação das enzimas MMP-2 e 9. Após a incubação, os géis foram corados com solução de 0,5% Comassie brilliant blue R-250 em 30% de metanol e 10% ácido acético glacial e descoradas com solução de 10% de metanol e 10% de ácido acético glacial. A presença e quantidade da proforma e forma ativa de MMP-2 e 9 são reveladas no gel de zimografia em regiões (bandas) sem o corante devido a degradação da gelatina. As imagens foram analisadas no software ImageJ 1.44p (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) as leituras descritas em pixels.

A quantidade de MMP-1, 2 e 9 totais foi avaliada por imunensaio empregando o kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em leitor Luminex 200™ (EMD

Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), e a quantidade de MMP-2 e MMP-9 total foi expressa em pg/mL.

A quantidade de MMP-2 e 9 ativas foi avaliada por imunoenensaio empregando o kit MMP-2 e MMP-9 Biotrak Activity Assay System (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Synergy™ HT (BioTek Instruments INC., Winnoski, Vermont, USA) em 405nm, e a quantidade de MMP-2 e 9 ativa foi expressa em pg/mL.

3.3.8. *Quantificação de citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α .*

As citocinas inflamatórias IL-6 (DY206), IL-8 (DY208) e TNF- α (DY210) foram quantificadas no sobrenadante de HaCaT e FHPD tratado com os compostos e/ou expostas às radiações UVA e UVB por método imunoenzimático empregando-se kits R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). Os sobrenadantes foram coletados após 24 horas, seguidos de centrifugação a 10.600 xg por 10 minutos, 4° C, e estocados em -80° C. A leitura de absorbância em 450nm foi realizada em espectrofotômetro Synergy™ HT (BioTek Instruments INC., Winnoski, Vermont, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

3.3.9. *Quantificação de ERO.*

A formação de ERO foi quantificada pelo método de Wang & Joseph (1999). A sonda 2',7' -diclorofloresceína diacetato (DCFH-DA) permite medir a quantidade de ERO na célula por fluorescência devido a sua oxidação. As células foram incubadas com DCFH-Da por 40 minutos para que ocorra a lise do DCFH-Da por enzimas esterases formando a 2',7' -diclorofloreceína (DCFH) não fluorescente. Após a lise, o DCFH em contato com ERO é convertido á DCF fluorescente. A leitura foi realizada 30 minutos após a radiação UVA, utilizando um citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) com o canal de fluorescência FITC. As análises foram realizadas usando o software "Cell Quest" (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA), que analisa a intensidade de fluorescência mediana (MFI) nas células adquiridas (10.000/amostra) sob gráfico *dotblot* FSC (tamanho celular) x SSC (complexidade celular). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.10. Quantificação de Ciclooxygenase-2 (COX-2) intracelular.

A produção de COX-2 em HaCaT foi quantificada de acordo com o protocolo do kit de ELISA COX-2 intracell (DYC4198; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Após 24 do tratamento/radiação, proteínas foram coletadas com tampão de lise (1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 10 µg/mL de Leupeptina, 10 µg/mL de Pepstatina A, 100 µM de PMSF, 3 µg/mL de Aprotinina em PBS, pH 7.2-7.4). A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de Bradford e col. (1976). A leitura de absorbância em 450nm foi realizada em espectrofotômetro Synergy™ HT (BioTek Instruments INC., Winnoski, Vermont, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.11. Quantificação de Dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD).

A quantificação de CPD foi realizada por imunomarcção de fluorescência, seguida por leitura em citômetro de fluxo, de acordo com GEINERT e col. (2000). HaCaT foram plaqueadas em placa de 60mm e após atingirem confluência de 60-70% foram tratadas com os compostos e expostas a radiação UVB. Após 6 horas da exposição à radiação, as células foram coletadas por tripsinização, fixadas em etanol 70% e estocadas em freezer -20° C até a realização do ensaio. Inicialmente, as células foram reidratadas em PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄; pH7.4) por 20 minutos, seguidas de permeação das membranas em solução de 0.1% Triton X-100 em PBS por 10 minutos, desnaturação do DNA em solução de 1,5M HCl por 30 minutos e bloqueio inespecífico em solução 3% de BSA em PBS por 30 minutos. As células foram então incubadas com anticorpo primário Anti-Thymine Dimer mAb, clone KTM53 (Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, EUA) diluído 1:500 em PBS por 2 horas em temperatura ambiente. Na sequência, as células foram marcadas com anticorpo secundário Fluorescein anti-mouse IgG (H+L) [made in horse] (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) diluído 1:200 em PBS por 30 minutos, temperatura ambiente, protegido da luz. A detecção e quantificação de CPD em células marcadas foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) com o canal de fluorescência para FITC (verde). As análises foram calculadas usando o software “Cell Quest” (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA), que analisa a intensidade de fluorescência mediana (MFI) nas células adquiridas (10.000/amostra) sob gráfico *dotblot* FSC (tamanho celular) x SSC (complexidade celular). Os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

3.3.12. Quantificação de 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxo-dG).

A quantificação de 8-oxo-dG foi realizada por imunomarcção de fluorescência, seguida por leituras em citômetro de fluxo. FHPD foram plaqueadas em placa de 60mm e após atingirem confluência de 60-70% foram tratados com os compostos e expostos a radiação UVA. Após 6 horas da exposição à radiação, as células foram coletadas por tripsinização, fixadas em etanol 70% e estocadas em freezer -20° C até a realização do ensaio. Inicialmente, as células foram reidratadas em PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄; pH7.4) por 20 minutos, seguidas de incubação em banho-maria a 37°C com 100µg/mL de RNase A (Sigma-Aldrich;, St Louis, MO, EUA) em PBS por 45 minutos, desnaturação do DNA em solução de 1,5M HCl por 5 minutos e bloqueio inespecífico em solução 3% de BSA em PBS por 30 minutos. As células foram então incubadas com anticorpo primário Anti-8-oxo-dG, clone 2E2 (Trevigen - R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) diluído 1:250 em PBS por 1,5 horas em temperatura ambiente. Na sequência, as células foram marcadas com anticorpo secundário Fluorescein anti-mouse IgG (H+L) [made in horse] (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) diluído 1:200 em PBS por 30 minutos, temperatura ambiente, protegido da luz. A detecção e quantificação de 8-oxo-dG em células marcadas foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) com o canal de fluorescência para FITC (verde). As análises foram calculadas usando o software “Cell Quest” (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA), que analisa a intensidade de fluorescência mediana (MFI) nas células adquiridas (10.000/amostra) sob gráfico *dotblot* FSC (tamanho celular) x SSC (complexidade celular). Os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

3.4. Avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* por espectrofotometria de refletância

A eficácia fotoprotetora *in vitro* dos compostos testes foi avaliada com espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração, *Labsphere*® UV2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer* (Labsphere, Inc., North Sutton, NH, EUA) e as leituras realizadas pelo programa *Labsphere*® UV2000S software. Utilizou-se como substrato três membranas poliméricas, de tamanho 5x5cm, a saber, VitroSkin® (IMS Inc.; Portland, ME,

USA), PMMA Helioscience HD 5-7 (Peaux-Cibles Sarl, Marceau, França) e Transpore® (3M do Brasil, Sumaré SP, Brasil). O substrato VitroSkin® passou inicialmente por processo de hidratação em água destilada e glicerina (85:15) pelo período de 16-24 h a 18,0 °C anteriormente ao ensaio, de acordo como o descrito pelo fabricante.

Os compostos foram incorporados na base para fotoprotetores (sistemas emulsionados O/A) à 1% (m/m) 24 horas antes das análises e aplicado sobre as matrizes numa distribuição de 2mg de produto final para cada cm², e aguardado 30 minutos para realizar as leituras. Para cada matriz polimérica 3 leituras para cada composto foram realizadas. A composição da formulação da base para fotoprotetores é uma formulação padrão da farmácia de manipulação Botica Biofármacos® (São Paulo, SP). A composição da base continha água, óleo mineral, lanolina, álcool cetílico, cetearato-20, vaselina, propileno glicol, ciclometicona, ciclopentasiloxano, dimeticona, hexoxietanol, metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, uréia imidazolidinil, goma xantana, EDTA e BHT. Protetores solar Sundown® (Johnson & Johnson's, São José dos Campos, SP, Brasil) FPS 15 e 30 foram utilizados como referência para as análises.

3.5. Análise Estatística

Os resultados dos ensaios foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância (teste de *Dunnet* comparado com controle não-irradiado ou teste Tukey comparando tratamentos com irradiado e não irradiado). Significância estatística foi considerada para valores abaixo de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Para avaliar a atividade fotoprotetora dos compostos em células da pele expostas às radiações UVA e UVB, primeiramente estudamos a curva dose-respostas das células expostas às radiações e os parâmetros moleculares alterados foram analisados num primeiro momento. Visto os melhores parâmetros moleculares alterados pelas radiações, a atividade fotoprotetores dos compostos fenólicos, a saber, ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico, foram estudados.

Visando o melhor entendimento do leitor, os resultados foram organizados em dois capítulos:

Capítulo 1 - Efeito da Radiação UVA e UVB sobre cultura de células da pele – modelo em monocamada de HaCaT e de Fibroblasto humano primário dermal (FHPD).

Capítulo 2 - Avaliação fotoquimioprotetora dos compostos fenólicos sobre células de HaCaT e FHPD expostos a radiação UVA e UVB.

Ao final do capítulo 2 estão descritos os resultados dos experimentos de avaliação do efeito fotoprotetor *in vitro* dos compostos por Espectrofotometria de Refletância

Capítulo 1 - Efeito da Radiação UVA e UVB sobre cultura de células da pele – modelo em monocamada de HaCaT e de Fibroblasto humano primário dermal (FHPD).

C1.1. Citotoxicidade das radiações UVA e UVB sobre cultura de HaCaT e FHPD

HaCaT quando exposto a ambas as radiações UVA e UVB apresenta redução na viabilidade celular de forma dose-dependente (Figura 6, A e B), sendo que essa morte é por apoptose e necrose/apoptose tardia a partir das doses de 10 J/cm² de UVA e 24 mJ/cm² de UVB (Figura 6, C e D).

Quando FHPD é exposto à radiação UV, a viabilidade celular apresenta-se reduzida em 50% a partir da dose de 10 J/cm² de UVA e em 70% a partir da dose de 16 mJ/cm² de UVB, de maneira dose-independente (Figura 7, A e B). Contudo apenas após a radiação UVA nota-se um aumento da população de FHPD em fase G2 e redução em fase G1 (Figura 7C), enquanto que após a radiação UVB não houve diferença entre as populações de FHPD em fases G1, S e G2 (Figura 7D).

Em conjunto estes resultados indicam que HaCaT apresentam maior sensibilidade às radiações, sendo conduzidas à morte, quando comparado à FHPD, que apresentam parada de ciclo.

Figura 6. Efeito da radiação UVA e UVB sobre queratinócito humano imortalizado (HaCaT) 24 horas após exposição à radiação. (A e B) A viabilidade celular foi quantificada por NRU e está representada em leitura de absorbância (540nm). (C e D) A avaliação de morte celular foi quantificada por citometria de fluxo e está representada em média $\pm$ E.P.M. da porcentagem da população em cada tipo de morte. Ao lado (*dir. inf.*), os gráficos representativos do ensaio de morte por Necrose/Apoptose nas doses de radiação proposta para os estudos. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão e diferem do controle não-irradiado (0mJ/cm² ou 0J/cm²) em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

Figura 7. Efeito da radiação UVA e UVB sobre fibroblasto humano primário dermal (FHPD) 24 horas após exposição à radiação. (A e B) A viabilidade celular foi quantificada por NRU e está representada em leitura de absorbância (540nm). (C e D) A avaliação de parada de ciclo foi quantificada por citometria de fluxo e está representada em média $\pm$ E.P.M. da porcentagem da população em cada fase do ciclo celular. Ao lado (*dir. inf.*), os gráficos representativos do ensaio de parada de ciclo celular nas doses de radiação propostas para os estudos. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão e diferem do controle não-irradiado ($0mJ/cm^2$ ou $0J/cm^2$) em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

C1.2. Quantificação de proteínas p53, p21, PARP e Caspase-3 e -9

A expressão das proteínas relacionadas à integridade do genoma (p53) e parada de ciclo (p21) foram quantificadas para ambas as células HaCaT e FHPD expostas à radiação UVA e UVB. Apenas para HaCaT as proteínas relacionadas à apoptose (Caspase-3 e 9) e reparo do DNA (PARP) foram quantificadas.

A radiação UVA reduz a expressão de p53 e de p21 a partir da dose de 5 J/cm² e reduz a expressão de PARP a partir da dose de 10 J/cm² em HaCaT (Figura 8). A radiação UVB aumenta a expressão de p53 em HaCaT na dose de 24 mJ/cm², contudo na dose de 32 mJ/cm² a expressão de p53 é reduzida. Nenhuma alteração em p21 e em PARP é observado em HaCaT após exposição à radiação UVB (Figura 8).

Figura 8. Expressão de p53, p21 e PARP em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) quando exposto à radiação UVA (5 e 10 J/cm²) e UVB (16, 24 e 32 mJ/cm²), após 24 horas. A proteína β -actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica. Os valores diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ do controle não-irradiado (0 mJ/cm² ou 0 J/cm²). Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A radiação UVA reduz a pró-Caspase-9 (47 kDa) na dose de 10 J/cm² (Figura 9) enquanto que aumenta a pró-Caspase-3 na dose de 5 J/cm² e reduz em 10 J/cm² de UVA (Figura 9). A radiação UVB reduz a expressão de pro-Caspase-9 (Figura 9; 47 kDa) e de pro-Caspase-3 a partir da dose de 16 mJ/cm² em HaCaT (Figura 9).

Figura 9. Expressão de Caspase-3 e 9 em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) quando exposto à radiação UVA (5 e 10 J/cm²) e UVB (16, 24 e 32 mJ/cm²), após 24 horas. A proteína α -tubulina (52 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para o FHPD, a radiação UVA aumenta a expressão de p21 em FHPD a partir da dose de 5 J/cm² e reduz a expressão de p53 em 10 J/cm² (Figura 10). A radiação UVB aumenta a expressão de p21 em FHPD a partir da dose de 24 mJ/cm² e de p53 a partir de 16 mJ/cm² (Figura 10).

Figura 10. Expressão de p53 e p21 em fibroblasto humano primário dermal (FHPD) quando exposto à radiação UVA (5 e 10 J/cm²) e UVB (16, 24 e 32 mJ/cm²), após 24 horas. A proteína β -actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica. Os valores diferem em *p < 0.05 e **p < 0.01 do controle não-irradiado (0 mJ/cm² ou 0 J/cm²). Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Em conjunto, os resultados indicam que HaCaT exposto às radiações UVA e UVB apresentou perfis similares, com redução na expressão de p53, PARP e das proformas de Caspase-3 e 9, confirmando que HaCaT são conduzidas à morte por apoptose após exposição às ambas radiações. Diferenças na expressão de p21 foram observadas em HaCaT, com redução após a radiação UVA e aumento após a radiação UVB, indicando que o tipo de morte por apoptose é mais proeminente após a radiação UVA em HaCaT. O perfil apresentando em FHPD exposto à radiação UVA confirma a indução à parada de ciclo, com aumento de p21 e redução de p53, enquanto que o aumento em ambas as proteínas p21 e p53 após a radiação UVB indicam a uma possível indução à senescência.

C1.3. Regulação de AQP3 de membrana em HaCaT

A regulação de AQP3 foi avaliada em HaCaT exposto à radiação UVA e UVB (Figura 11). Ambas as radiações reduzem a forma não-glicosilada de AQP3 (30 kDa), indicando uma redução de AQP3 na membrana em HaCaT. Apenas após a exposição à

radiação UVA a forma glicosilada de AQP3 (40kDa) está aumentada, indicando que a radiação UVA promove a internalização de AQP3 (Figura 11). A razão entre AQP3 de membrana e AQP3 internalizada apresenta-se reduzida a partir da dose de 5J/cm² de UVA (Figura 11, D) e da dose de 24mJ/cm² de UVB (Figura 11, E).

Figura 11. Expressão proteica de aquaporina-3 (AQP3) por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) 24 horas após a exposição à radiação UVA e UVB. (A) Imagem do gel de *Western Blotting* mostra a redução de AQP3 de membrana (forma não-glicosilada; 30kDa) e aumento da forma glicosilada internalizada (40kDa) após exposição à radiação UVA e UVB. Os valores no gráfico representam a média $\pm$ E.P.M. da quantidade de AQP3 internalizada (40kDa) e de membrana (30kDa) após a radiação UVA (B) e UVB (C). Abaixo, os gráficos representam a razão entre a quantidade de AQP3 na forma de 30kDa sobre a forma de 40kDa após a radiação UVA (D) e UVB (E). Os valores diferem do controle não-irradiado (0mJ/cm² ou 0J/cm²) em *p<0.05 e **p<0.01. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

O perfil apresentado por HaCaT mostra uma diminuição de AQP3 (30kDa) quando exposto à ambas as radiações UVA e UVB, indicando redução na captação de água pela membrana de HaCaT, favorecendo a desidratação. Apenas a exposição à radiação UVA induz aumento na quantidade de AQP3 (40kDa), indicando uma internalização desta proteína pela radiação.

C1.4. Expressão gênica de AQP3 e CDK1N1 em HaCaT

A expressão relativa dos genes endógenos GAPDH e ACTINA foi avaliada em HaCaT após a exposição à radiação UVA e UVB. A radiação UVA aumentou a expressão do gene endógeno GAPDH e reduziu a expressão do gene ACTINA (Figura 12).

Figura 12. Expressão relativa dos genes endógenos GAPDH e ACTINA em HaCaT após 24 horas da radiação UVA e UVB. A leitura foi feita em equipamento *Fast-RT-PCR System* com auxílio do software 7500 V2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. e diferem do controle não-irradiado (NT) em * $p < 0.05$ e em ** $p < 0.01$. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A radiação UVA aumenta a expressão de ambos os genes CDKN1A e AQP3, enquanto que a radiação UVB aumenta apenas CDKN1A. A radiação UVB não altera a expressão gênica de AQP3 em HaCaT (Figura 13).

Figura 13. Expressão gênica de AQP3 e CDKN1A de queratinócito humano imortalizado (HaCaT) exposto à radiação UVA (10J/cm²) e UVB (24mJ/cm²). O perfil da expressão gênica dos genes de CDKN1A e AQP3 estão representados em relação aos genes endógeno (ACTINA e GAPDH). A leitura foi feita em equipamento *Fast-RT-PCR System* com auxílio do software 7500 V2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram normalizadas com controle não-irradiado (NT). Os valores representam média $\pm$ E.P.M. e diferem do controle não-irradiado (0mJ/cm² ou 0J/cm²) em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os ensaios foram realizados em quadruplicata experimental.

O perfil apresentado por HaCaT mostra que a radiação UVB não altera a expressão dos genes endógenos GAPDH e ACTINA. O mesmo não é evidenciado após a exposição à radiação UVA, sugerindo que a expressão destes genes é alterada após a radiação. A expressão gênica de CDKN1A (p21) está aumentada após a radiação UVB, mostrando que este aumento corresponde aos resultados de *western blotting*. Contudo o aumento na expressão de CDKN1A após a radiação UVA não corresponde com a expressão proteica, indicando uma redução na transcrição de p21. A expressão de AQP3 após a radiação UVA corrobora com o aumento de AQP3 de 40kDa apresentado nos resultados de *western blotting*, sugerindo o acúmulo intracelular desta proteína.

C1.5. Liberação de metaloproteinases (MMP)-1, 2 e 9

A liberação de proMMP-2 e 9 por HaCaT e FHPD expostos à radiação UVA e UVB foi avaliado por zimografia (Figuras 14 e 15).

A radiação UVA reduz a liberação de proMMP-2 e de proMMP-9 em HaCaT de forma dose-dependente (Figura 14A). Para FHPD, a radiação UVA reduz a liberação de proMMP-2 e de MMP-2 ativa apenas na dose de 20 J/cm² (Figura 14B).

Figura 14. Liberação de proMMP-2 e 9 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) após a exposição à radiação UVA. Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-2 e 9 e MMP-2 ativa por HaCaT (A) e FHPD (B) após 24 horas da exposição à radiação UVA. Os valores representados indicam unidades arbitrárias em pixels da quantidade de proMMP-2 e proMMP-9 no sobrenadante de HaCaT e FHPD. Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. e diferem do controle não-irradiado (0mJ/cm² ou 0J/cm²) em $**p < 0.01$. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

A radiação UVB reduz a liberação de proMMP-2 e de proMMP-9 a partir da dose de 16mJ/cm² para HaCaT, sem relação dose-resposta (Figura 15, A). Para FHPD, após 24 horas da exposição à radiação UVB não se observa alteração no perfil de liberação de proMMP-2 nas doses empregadas no experimento (Figura 15, B).

Figura 15. Liberação de proMMP-2 e 9 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) após a exposição à radiação UVB. Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-2 e 9 por HaCaT (A) e proMMP-2 por FHPD (B) após 24 horas da exposição à radiação UVB. Os valores representados indicam unidades arbitrárias em pixels da quantidade de proMMP-2, 9 e MMP-2 ativa no sobrenadante de HaCaT e FHPD. Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. e diferem do controle não-irradiado (0mJ/cm² ou 0J/cm²) em **p<0.01. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

A atividade parácrina de HaCaT sobre FHPD quanto à liberação de MMP após a radiação UVA (10 J/cm²) e UVB (24 mJ/cm²) foi realizada para avaliar se o efeito das radiações UVA e UVB sobre fibroblastos ocorre indiretamente, de acordo com o descrito em Fagot e cols. (2004). Para tanto, culturas de HaCaT exposta a radiação UVB (24mJ/cm²) e UVA (10J/cm²) foram cultivadas em DMEM sem soro por 24 horas e o sobrenadante destas culturas foi transferido para culturas de FHPD não-irradiados e cultivadas por 48 horas. A liberação de MMP foi avaliada por zimografia (como método qualitativo e semi-quantitativo de liberação de próMMP-2 e 9 e formas ativas) e imunoensaio (pelos métodos quantitativos: Multiplex, para liberação de MMP-1, 2 e 9 totais, e Biotrak, para liberação de MMP-2 e 9 ativas).

A radiação UVB reduz a liberação d MMP-2 e 9 totais em HaCaT e aumenta a liberação de MMP-2 ativa (Figura 16, C1) e reduz de MMP-9 ativa (Figura 16, C2) em FHPD com meio condicionado de HaCaT exposto à radiação. A radiação UVB não altera a liberação de MMP-1 total por HaCaT, contudo FHPD com meio condicionado de HaCaT exposto à radiação UVB apresenta aumento de MMP-1 total (Figura 16, B3).

Figura 16. Ativação parácrina de HaCaT exposto à radiação UVB (24mJ/cm²) sobre FHPD na liberação de proMMP-2 e 9 (A1) Imagens representativas do gel de zimografia mostrando o efeito da radiação UVB sobre HaCaT após 24 horas e sobre FHPD com meio condicionado de HaCaT por 48 horas. (A2) Os valores no gráfico representam a quantificação, em unidades arbitrárias, de liberação de proMMP-2, MMP-2 ativa e proMMP-9 no sobrenadante de FHPD com meio condicionado de HaCaT após 48h (n=3). (B) Representação gráfica da quantidade de MMP-2 (B1), 9 (B2) e 1 (B3) total no sobrenadante de HaCaT não-irradiado e irradiado por UVB (HaCaT UVB), FHPD cultivado por 48 horas (FHPD Controle) e FHPD com meio condicionado de HaCaT sem radiação (HaCaT sem UVB+ FHPD) e com radiação UVB (HaCaT UVB + FHPD), realizada com o kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA). (C) Representação gráfica da atividade de MMP-2 (C1) e 9 (C2) no sobrenadante de HaCaT não-irradiado (H NI) e irradiado por UVB (H UVB), FHPD cultivado por 48 horas (FHPD Controle) e FHPD com meio condicionado de HaCaT não irradiada (F+H NI) e irradiada por UVB (F+HUVB), realizada com o kit Biotrak (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Os valores diferem do controle não irradiado em *p<0.05 e **p<0.01. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A radiação UVA aumenta a liberação de pró-MMP-2 (Figura 17, A2) e de MMP-2 total (Figura 17, B1) em FHPD com meio condicionado de HaCaT exposto à radiação UVA. HaCaT exposto à radiação UVA aumenta a liberação de MMP-1 total, contudo esta liberação é reduzida em FHPD cultivados com meio condicionado de HaCaT exposta à radiação UVA (Figura 17, B3).

Figura 17. Ativação parácrina de HaCaT exposto à radiação UVA (10J/cm²) sobre FHPD na liberação de MMP-2 e 9 (A1) Imagens representativas do gel de zimografia mostrando o efeito da radiação UVA sobre HaCaT após 24 horas e sobre FHPD com meio condicionado de HaCaT por 48 horas. (A2) Os valores no gráfico representam a quantificação, em unidades arbitrárias, de liberação de proMMP-2, MMP-2 ativa e proMMP-9 no sobrenadante de FHPD com meio condicionado de HaCaT após 48h (n=3). (B) Representação gráfica da quantidade de MMP-2 (B1), 9 (B2) e 1 (B3) total no sobrenadante de HaCaT não-irradiado e irradiado por UVA (HaCaT UVA), FHPD cultivado por 48 horas (FHPD Controle) e FHPD com meio condicionado de HaCaT sem radiação (HaCaT sem UVA + FHPD) e com radiação UVB (HaCaT UVA + FHPD), realizada com o kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA). Os valores diferem do controle não-irradiado em *p<0.05 e **p<0.01. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O perfil apresentado pelas células expostas às radiações UVA e UVB demonstram que ambas reduzem a liberação de proMMP-2 e 9 em HaCaT, sem alterar a liberação e atividade de MMP-2 em FHPD. A atividade parácrina de HaCaT exposto à radiação UVB sobre FHPD demonstra um aumento na liberação de MMP-1 total e MMP-2 ativa e redução na liberação de MMP-9 ativa. Após a radiação UVA, FHPD cultivado em sobrenadante de HaCaT exposto à radiação apresenta aumento na liberação de proMMP-2 e MMP-2 total e redução na liberação de MMP-1.

C1.6. Liberação de citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α

Citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α foram avaliadas nos sobrenadante das culturas de HaCaT e FHPD após 24 horas da exposição à radiação UVA e UVB.

A radiação UVA aumenta a liberação de IL-6 e diminui a liberação de IL-8 em HaCaT nas doses de 5 e 10 J/cm², enquanto que TNF- α está aumentada apenas na dose de 10J/cm² de UVA (Figura 18). Para FHPD, a radiação UVA aumenta a liberação de IL-6 de

maneira dose-dependente e reduz de IL-8 apenas na dose de 10 J/cm² (Figura 18, A2 e B2). Não foi possível detectar a liberação de TNF- α em FHPD no método empregado após a radiação UVA (<15 pg/mL, limite de detecção do modelo; Figura 18, C2).

A radiação UVB aumenta a liberação de IL-6 em HaCaT nas doses de 24 e 32 mJ/cm² (Figura 18, A1) e de TNF- α apenas na dose de 32 mJ/cm² (Figura 18, C1). A radiação UVB não alterou a liberação de IL-8 em HaCaT. Para FHPD, a radiação UVB reduz apenas a liberação de IL-8 apenas na dose de 32 mJ/cm², sem alterar a liberação de IL-6. A liberação de TNF- α em FHPD após a radiação UVB não foi possível de ser detectada no método empregado (<15 pg/mL, limite de detecção do modelo; Figura 18, C2).

Figura 18. Liberação de IL-6, IL-8 e TNF- α por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) após a exposição à radiação UVA e UVB. Os valores nos gráficos indicam a média $\pm$ E.P.M. da leitura de IL-6, IL-8 e TNF- α , em pg/mL, no sobrenadante de HaCaT (A1, B1 e C1) e FHPD (A2, B2 e C2) exposta a radiação UV. Os valores diferem em * p <0.05 e ** p <0.01 do controle não-irradiado (0mJ/cm² ou 0J/cm²). Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O perfil de liberação de interleucinas por HaCaT e FHPD foram similares com aumento na liberação de IL-6 e redução de IL-8 após a radiação UVA. Este fenômeno foi

mais expressivo em HaCaT do que em FHPD nas doses de radiação empregados. Entretanto, apenas HaCaT responde com aumento na liberação de $\text{TNF-}\alpha$ e apenas nas maiores doses de UVA e UVB estudadas.

C1.7. Produção de ERO em HaCaT exposto à radiação UVA

A produção de ERO foi quantificado em HaCaT 30 minutos após o início da exposição à radiação UVA. A radiação UVA aumenta a produção de ERO de forma dose-dependente (Figura 19).

Figura 19. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) exposto à radiação UVA. As células foram incubadas com a sonda DCFH-Da (30 μ M) por 40 minutos, seguidas de exposição à radiação UVA (10J/cm²). A leitura foi feita em citômetro de fluxo (canal FITC) após 30 minutos do início da exposição à radiação UVA. Os valores então representados em média de intensidade de fluorescência (MFI) $\pm$ E.P.M. e difere em ** $p < 0.01$ do controle sem radiação (0J/cm²). Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Nossos resultados mostram que a radiação UVA induz a produção de espécie reativas de oxigênio em HaCaT de modo dose-dependente, imediatamente após a exposição à radiação.

C1.8. Produção de COX-2 em HaCaT

A produção de COX-2 por HaCaT exposto às radiações UVA e UVB foi quantificado 24 horas após a radiação. Ambas as radiações aumentam de produção de COX-2 em HaCaT a partir de 24 mJ/cm² de UVB e de 5 J/cm² de UVA (Figura 20).

Figura 20. Produção de COX-2 em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) exposto à radiação UVA e UVB. A quantificação de COX-2 intracelular foi feita por ELISA em HaCaT 24 horas após a radiação e os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. em pg/mL. Os valores diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ quando comparados ao controle não irradiado. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em duplicata para a radiação UVB e em quadruplicata para a radiação UVA.

Os resultados mostram que ambas as radiações induzem a produção de COX-2 em HaCaT, podendo contribuir com a exacerbação da resposta inflamatória.

C1.9. Formação de fotoprodutos (CPD) em HaCaT exposta à radiação UVB

A formação de CPD como principal dano direto ao DNA induzido pela radiação UVB foi quantificado em HaCaT, 2 e 6 horas após exposição à radiação UVB. A formação de CPD aumenta a partir da dose de 16 mJ/cm² de UVB de forma dose-dependente (Figura 21). Nota-se que após 6 horas da radiação UVB, há redução de CPD em comparação ao tempo de 2h, indicando que a célula recupera o DNA lesado por remoção do CPD formado.

Figura 21. Formação de CPD em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) exposto à radiação UVB. (A) Quantificação de CPD foi feita por citometria de fluxo em HaCaT nos tempos de 2 e 6 horas após a radiação e os valores representados em média $\pm$ E.P.M. de MFI (Intensidade de fluorescência mediana). (B) Gráficos representativos da leitura de CPD em HaCaT após radiação UVB em citômetro de fluxo. Os valores diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ quando comparados ao controle não-irradiado (0 mJ/cm²). Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O perfil apresentado por HaCaT exposto à radiação UVB mostra a formação de danos de DNA do tipo CPD com remoção parcial do dano após 6 horas da exposição.

C1.10. Formação de fotoprodutos 8-oxo-dG em FHPD exposto à radiação UVA

A formação de 8-oxo-dG foi quantificada em FHPD 6 horas após a exposição à radiação UVA, por citometria de fluxo, como principal dano oxidativo de DNA gerado pela radiação UVA. O tempo de 6 horas foi escolhido de acordo com os resultados apresentados por Catalfo e col. (2005), onde o pico de formação de 8-oxo-dG em fibroblastos humanos primários apresenta-se em 7 horas após a exposição à radiação UVA. A formação de 8-oxo-dG apresenta redução na dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$, e aumentada em $10\text{J}/\text{cm}^2$ de UVA (Figura 22).

Figura 22. Formação de 8-oxo-dG em fibroblasto humano primário dermal (FHPD) exposto à radiação UVA no tempo de 6 horas após a radiação e os valores representados em média $\pm$ E.P.M. da razão de MFI (Intensidade de fluorescência mediana). (B) Gráficos representativos da leitura de 8-oxo-dG em FHPD após radiação UVA em citômetro de fluxo. Os valores diferem em $**p < 0.01$ quando comparados ao controle não-irradiado ($0\text{ J}/\text{cm}^2$). Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O perfil apresentado por FHPD exposto à radiação UVA mostra a formação de danos de DNA do tipo 8-oxo-dG na maior dose estudada, indicando que a radiação UVA promove a formação de dano oxidativo no DNA de FHPD.

Capítulo 2 - Avaliação fotoquimioprotetora dos compostos fenólicos sobre células de HaCaT e FHPD expostos a radiação UVA e UVB.

A partir dos resultados de citotoxicidade dos compostos sobre HaCaT e FHPD (Anexo 1), as concentrações escolhidas para os ensaios de fotoproteção foram aquelas seguras para FHPD, devido a sua maior sensibilidade ao tratamento com os compostos. Quanto à dose das radiações UVA e UVB, foram escolhidas aquelas que reduziram a viabilidade celular em valores não superiores a 40%. Assim, os experimentos de fotoproteção foram conduzidos com dose de 10 J/cm² de UVA e 24 mJ/cm² de UVB, e os compostos nas seguintes concentrações: 25µM de AR, 100µM de ACG e 75µM de AC.

C2.1. Viabilidade Celular

A eficácia fotoprotetora dos compostos sobre a viabilidade de HaCaT e FHPD exposta a radiação UVA (10J/cm²) e UVB (24 mJ/cm²) foi avaliada por NRU e por citometria de fluxo.

O tratamento prévio com os compostos não foi capaz de proteger os queratinócitos da morte celular induzida pela radiação UVA quando analisado por NRU (Figura 23, A1). O ACG na concentração de 100 µM embora não reduza o efeito de morte celular induzido pela radiação UVA quando avaliado por NRU, reduz a morte em HaCaT por necrose/apoptose tardia e aumenta a população de células viáveis (Figura 23, A2). Interessantemente, o tratamento com 200 µM ACG promove um efeito fototóxico com a radiação UVA, reduzindo a viabilidade de HaCaT para 16% em relação ao controle não irradiado (Figura 23, A1). Para FHPD, o tratamento com os compostos AR e ACG revertem parte do efeito citotóxico da radiação UVA (Figura 1, B1), aumentando a população em fase G1 (AR 25µM e ACG 100µM) e reduzindo em fase G2 (ACG 100µM; Figura 23, B2).

Figura 23. Eficácia fotoprotetora dos compostos após radiação UVA sobre a viabilidade de queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD). As células de HaCaT e FHPD foram tratadas com os compostos (ácido rosmarínico – AR -, clorogênico – ACG - e cafeico – AC - por 1 hora e expostas a radiação UVA e a viabilidade foi determinada por NRU 24 horas após a exposição a radiação. Os valores diferem do controle não-irradiado em # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ e do controle irradiado em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. Os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico ANOVA por composto seguido de teste de Dunnett.

O tratamento prévio de HaCaT com AR (25 μM), ACG (100 μM) e AC (75 μM) reverte parte do efeito citotóxico da radiação UVB (Figura 24), contudo apenas para o tratamento com ACG em 100 μM foi observado uma redução da população em necrose/apoptose tardia (Figura 24, A2). Para FHPD, o tratamento prévio com AR (25 μM) e ACG (200 μM) reverte o efeito citotóxico da radiação UVB (Figura 24, B1), sem alterar o ciclo celular (Figura 24, B2).

Figura 24. Eficácia fotoprotetora dos compostos após radiação UVB sobre a viabilidade de queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD). As células de HaCaT e FHPD foram tratadas com os compostos (ácido rosmarínico – AR –, clorogênico – ACG - e cafeico – AC - por 1 hora e expostas a radiação UVB e a viabilidade foi determinada por NRU 24 horas após a exposição a radiação. Os valores diferem do controle não-irradiado em $^{\#}p<0.05$ e $^{##}p<0.01$ e do controle irradiado em $^{*}p<0.05$ e $^{**}p<0.01$. Os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico ANOVA por composto seguido de teste de Dunnet.

Sendo assim, os tratamentos com AR em 25 μ M e ACG em 100 μ M revertem parte do efeito de redução na viabilidade de FHPD após ambas as radiações, reduzindo a população de células em fase G2 e aumentando em fase G1 após a radiação UVA. Os mesmos compostos revertem o efeito da radiação UVB sobre a viabilidade de HaCaT, com aumento da população de células viáveis em HaCaT tratada com ACG. O composto AC em 75 μ M foi capaz apenas de reverter o efeito da radiação UVB em HaCaT. Considerando estes resultados, apenas uma concentração de cada composto (25 μ M de AR, 100 μ M de ACG e 75 μ M de AC) foi utilizada para estudar os demais parâmetros.

C2.2. Quantificação das proteínas p53, p21, PARP, Caspase-3 e -9.

As proteínas p53, p21, PARP e Caspase-3 e 9 foram analisadas em células HaCaT pré-tratadas com os compostos AR, ACG e AC, e expostas à radiação UVA e UVB.

O aumento na expressão de p53, promovido por ambas as radiações UVA e UVB (Figura 25, A e B), indica que a célula está avaliando os danos de DNA induzidos pela fotoexposição e conduzindo a célula a apoptose. Apenas o tratamento com ACG reduz a expressão de p53 em HaCaT exposto à radiação UVB (Figura 25, B), fazendo com que a

célula escape do processo de apoptose, corroborando com o aumento na viabilidade (*Item C2.1*). A presença de etanol não altera a expressão de p53 após ambas as radiações UVA e UVB (Figura 25, A e B). O tratamento com AC em HaCaT exposto à radiação UVB altera o efeito do etanol, aumentando a expressão de p53 (Figura 25, B), que pode estar relacionado com o aumento da viabilidade de HaCaT (*Item C2.1*).

Devido a apoptose ser bem mais pronunciada após a radiação UVA do que após a radiação UVB (*Item C2.1*), a radiação UVA reduz significativamente a expressão de PARP e p21 em HaCaT (Figura 25, A). O tratamento com AR aumenta a expressão de PARP em HaCaT exposto à ambas as radiações (Figura 25, A e B), enquanto que o tratamento com ACG aumenta a expressão de PARP apenas após a radiação UVA (Figura 25, A). Isso demonstra que ambos os compostos induzem à reparação dos danos de DNA gerados em HaCaT. O tratamento com ACG reduz a expressão de p21 em HaCaT após ambas as radiações (Figura 25, A e B), impedindo à parada no ciclo celular. A presença de etanol reduz a expressão de p21 em HaCaT após ambas as radiações (Figura 25, A e B), e o AC acentua essa redução após a radiação UVA (Figura 25, A).

Figura 25. Expressão proteica de p53, p21 e PARP em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA (A. 10J/cm²) e UVB (B. 24 mJ/cm²). As células foram tratadas com os compostos 1 hora antes da radiação e a quantificação de PARP (116kDa e 89kDa), p53 (53kDa) e p21 (21kDa) foram feitas 24 horas após a exposição à radiação. A proteína β-actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica. Os valores diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ do controle não-irradiado (NT ou NTE) e em # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ do controle irradiado (NT UVA/NT UVB ou NTE UVA/NTE UVB). Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dummet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Ambas as radiações UVA e UVB reduzem a quantidade de pró-caspase-3 e 9 em HaCaT, indicando que essas caspases foram clivadas e conduzindo a célula para a apoptose (Figura 26). Contudo, o aumento da caspase-9 clivada é observado apenas após a radiação UVB (Figura 26, B).

Dentre os tratamentos, o ACG impede a clivagem de ambas as caspases em HaCaT exposto a ambas radiações UVA e UVB, aumentando a quantidade de pró-caspase-9 (caspase iniciadora; Figura 26, A e B) e de pró-caspase-3 (caspase efetora; Figura 26, C e D). Assim, o ACG reduz a indução de apoptose pelas radiações, aumentando a viabilidade de HaCaT (*Item C2.1*).

O tratamento com AR aumenta a quantidade de caspase-9 clivada (17kDa; Figura 26, A e B), contudo a quantidade da pró-caspase-3 está aumentada (Figura 26, C e D) após ambas as radiações. Contudo apenas após a radiação UVB tem-se aumento de pró-caspase-9, sugerindo que a iniciação da apoptose ocorre em HaCaT tratado com AR, mas a sinalização final de apoptose não é ativada, possibilitando o aumento da viabilidade de HaCaT (*Item C2.1*).

A presença de etanol em HaCaT exposto à radiação UVA aumenta a quantidade de caspase-9 clivada (17kDa) e reduz a pro-caspase-3 (Figura 26, A e C). Contudo quando HaCaT é exposto à radiação UVB, o etanol interfere na sinalização das caspases, reduzindo a clivagem de caspase-9 (17kDa) e não reduz a quantidade de pró-caspase-3 (Figura 26, B e D). Isto justifica em parte a menor efeito redução da viabilidade de HaCaT exposta à UVB.

O tratamento com AC apenas aumenta a quantidade de pró-caspase-3 em HaCaT exposto à radiação UVB, (Figura 26, D), inibindo assim a ativação da apoptose e aumentando a viabilidade celular (*Item C2.1*). Nenhum efeito é observado nas caspases de HaCaT exposto à radiação UVA.

Figura 26. Expressão proteica de Caspase-3 (C e D) e Caspase-9 (A e B) em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA (10J/cm²) e UVB (24 mJ/cm²). As células foram tratadas com os compostos 1 hora antes da radiação e a quantificação de Caspase-3 (35, 19 e 17 kDa) e Caspase-9 (47, 37, 35 e 17kDa) foram feitas 24 horas após a exposição à radiação. A proteína β-actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Dentre os resultados apresentados com HaCaT podemos inferir que o tratamento com AR contribui na reparação dos danos induzidos em HaCaT após ambas as radiações. Apenas após a radiação UVB o tratamento com AR auxilia na inibição da apoptose, aumentando a viabilidade de HaCaT. Já o tratamento com ACG auxilia na reparação e impede a sinalização de parada de ciclo em HaCaT após a radiação UVA. Após a radiação UVB o tratamento com ACG contribui na inibição da apoptose, aumentando a viabilidade de HaCaT. O tratamento com AC apesar de não interferir nas proteínas associadas a apoptose, induziu aumento na viabilidade de HaCaT exposta à radiação UVB.

A expressão de p53 em FHPD permite que a célula rastreie os danos formados no DNA em células fotoexpostas, e assim sinalizar para a parada de ciclo e reparação celular (KOMAROVA e col., 2005; SMITH e col., 1997; ZATTRA e col., 2009; ACHANTA e col., 2004). Após a radiação UVA ambos os tratamentos AR e ACG aumentam a expressão de p53 (Figura 27, A), sugerindo que os compostos estão auxiliando o monitoramento em FHPD e assim aumentando a população em fase G1 (Figura 23). Contudo apenas a radiação UVB induz aumento de p53 em FHPD, sugerindo que este aumento está relacionado a uma indução de danos ao DNA mais agressiva. Nenhum dos tratamentos alteraram a expressão de p53 em FHPD após a radiação UVB (Figura 27, B).

A proteína p21, induzida pela proteína p53 como auxílio para a reparação da célula, induz a parada do ciclo celular e está aumentada em FHPD quando exposto às radiações UVA e UVB. Apesar de ser uma proteína relacionada ao controle de parada de ciclo, apenas FHPD quando exposto à radiação UVA apresenta parada de ciclo em fase G2 (*Item C2.1*). Dentre os tratamentos, o ACG reduz a expressão de p21 enquanto que o AC aumenta a expressão desta proteína após a radiação UVB (Figura 27, B). Nenhuma relação com a viabilidade foi encontrada, visto que os compostos ACG e AC não reverteram o efeito da radiação UVB na viabilidade de FHPD (*Item C2.1*). A presença de etanol em FHPD apresentou um perfil inesperado, pois no controle (NTE) dos experimentos com a radiação UVA a expressão de p21 foi maior que o controle (NT), enquanto que no controle de etanol (NTE) dos experimentos com a radiação UVB, uma redução na expressão de p21 é observada (Figura 27, A e B). Este perfil se repete no controle de FHPD exposto às radiações UVA e UVB, sugerindo que esse efeito seja devido ao tempo que a célula fica em PBS durante o tempo de exposição às radiações. O tratamento com AC aumenta a quantidade de p21 em FHPD exposto à radiação UVB (Figura 27, B).

Figura 27. Expressão proteica de p53 e p21 em fibroblasto humano primário dermal (FHPD) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA (A. 10 J/cm²) e UVB (B. 24 mJ/cm²). As células foram tratadas com os compostos 1 hora antes da radiação e a quantificação de p53 (53kDa) e p21 (21kDa) foram feitas 24 horas após a exposição à radiação. A proteína β-actina (43 kDa) foi utilizada como controle de quantificação proteica. Os valores diferem em *p<0.05 e **p<0.01 do controle não-irradiado (NT ou NTE), em #p<0.05 e ##p<0.01 do controle irradiado (NT UVA/NT UVB ou NTE UVA/NTE UVB) e em \$p<0.05 quando comparado ao controle não-irradiado (NT). Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Dentre os resultados apresentados com FHPD podemos inferir que os tratamentos com AR e ACG auxiliam na reparação celular, levando à recuperação parcial da viabilidade de FHPD exposto à radiação UVA. Após a radiação UVB, os compostos ACG e AC alteram a regulação de parada de ciclo, contudo não reverteram o efeito da radiação UVB. O etanol não atua como um solvente apropriado para estudar a expressão de p21 em FHPD exposto às radiações UVA e UVB.

C2.3. Quantificação de AQP3 de membrana em HaCaT

A regulação da proteína AQP3 foi avaliada em HaCaT tratado com os compostos AR, ACG e AC e exposto a radiação UVA e UVB (Figura 28).

Os compostos AR e ACG induzem aumento de AQP3 de membrana e redução de AQP3 internalizada em HaCaT exposto à radiação UVA (Figura 28, C), aumentando a razão entre as quantidades de 30kDa/40kDa (Figura 28, E). A presença de etanol aumenta a quantidade de AQP3 de membrana em HaCaT irradiado com UVA, bem como a razão entre as quantidades de 30kDa/40kDa. O tratamento com AC não altera as quantidades de AQP3 de membrana e internalizada em HaCaT irradiado com UVA, contudo a razão entre as quantidades de 30kDa/40kDa é reduzida com o tratamento.

Após a radiação UVB, nenhum dos tratamentos revertem os efeitos da radiação UVB sobre a regulação de AQP3 em HaCaT (Figura 28, F). A presença de etanol não altera a quantidade de AQP3 tanto no controle não irradiado como no controle exposto a radiação UVB (Figura 28, F).

Figura 28. Expressão proteica de aquaporina-3 (AQP3) por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA e UVB. Imagem do gel de *Western Blotting* mostra a modulação de AQP3 de membrana (forma não-glicosilada; 30kDa) e internalizada (forma glicosilada; 40kDa) de HaCaT tratada com os compostos e expostas às radiações UVA (A) e UVB (B). Os valores no gráfico representam a média $\pm$ E.P.M. da quantidade de AQP3 glicosilada (40kDa) e de membrana (30kDa) após a radiação UVA (C) e UVB (D). Abaixo, os gráficos representam a razão entre a quantidade de AQP3 na forma de 30kDa sobre a forma de 40kDa após a radiação UVA (E) e UVB (F). Os valores diferem do controle não-irradiado (0mJ/cm² ou 0J/cm²) em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnett*. Ao lado, representação do possível mecanismo de internalização da proteína de membrana (imagem retirada de Ji e col., 2010). Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

Sendo assim, os compostos AR e ACG reverteram o efeito da radiação UVA sobre a regulação de AQP3 em HaCaT, aumentando a disponibilidade de AQP3 na membrana e reduzindo sua internalização, auxiliando assim na hidratação da célula. O etanol não funciona como um solvente apropriado para estudar este parâmetro induzido pelas radiações UVA e UVB.

C2.4. Expressão gênica de AQP3 e CDKN1A em HaCaT

A expressão dos genes AQP3 e CDKN1A foi analisada em HaCaT tratado com AR, ACG e AC e exposto às radiações UVA e UVB (Figura 29).

O gene AQP3 está relacionado com a expressão da proteína AQP3, responsável pela regulação hídrica da célula. O tratamento com AR e ACG aumenta a expressão gênica de AQP3 em HaCaT exposta à radiação UVA (AQP3/GAPDH; Figura 29, B), o que pode ter contribuído com o aumento na quantidade de AQP3 de membrana em HaCaT observado no *item C2.3*. Os mesmos compostos induzem aumento na expressão gênica de AQP3 em HaCaT exposto à radiação UVB (AQP3/ACTINA; Figura 29, C), contudo nenhum efeito pode ser observado na expressão proteica (*Item C2.3*). A presença de etanol (NTE) induz aumento na expressão de AQP3 em HaCaT exposto às ambas radiações, contudo esse aumento é observado apenas no controle exposto à radiação UVA (Figura 29, A e B), enquanto que a radiação UVB não altera a expressão deste gene no controle (Figura 29, C e D).

O gene CDKN1A, responsável pela expressão de p21, está relacionado à parada de ciclo. O tratamento com ACG reduz a expressão gênica de CDKN1A/GAPDH em HaCaT exposto à ambas as radiações (Figura 29, B e D), efeito que pode ter contribuído a redução na expressão de p21 (*Item C2.2*). O tratamento com AR reduz a expressão de CDKN1A/GAPDH apenas em HaCaT exposto a radiação UVB (Figura 29, D), contudo o mesmo não foi observado na expressão de p21 (*Item C2.2*).

Figura 29. Expressão gênica de AQP3 e CDKN1A em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos e exposto à radiação UVA (A e B, 10J/cm²) e UVB (C e D, 24mJ/cm²). O perfil da expressão gênica dos genes de CDKN1A e AQP3 estão representados em relação ao gene endógeno (ACTINA – A e C e GAPDH – B e D) à partir da técnica de PCR em tempo real. As amostras foram normalizadas com controle não-irradiado (NT) ou do controle irradiado em $^{\#}p<0.05$ ou $^{\#\#}p<0.01$. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os ensaios foram realizados em quadruplicata experimental.

O tratamento com AR e ACG induz a expressão gênica de AQP3 em HaCaT exposto à radiação UVA, corroborando com os experimentos de regulação da AQP3 apresentado no item C2.3, auxiliando assim na hidratação da célula. Contudo o uso do etanol não funciona apropriadamente sobre este parâmetro em HaCaT, pois altera a resposta celular à radiação UVB.

C2.5. Quantificação de MMP-1, 2 e 9.

A liberação de proMMP-2, 9 e ativação de MMP- 2 foi avaliada em HaCaT pré-tratado com AR, ACG e AC e exposto à radiação UVA e UVB (Figuras 30 e 31).

A radiação UVA reduz a liberação de proMMP-2 e de proMMP-9 em HaCaT e todos os compostos reduzem ainda mais essa liberação de proMMP-9 (AR, ACG e AC), de proMMP-2 (ACG e AC) e de MMP-2 ativa (ACG) após a radiação UVA (Figura 30).

Figura 30. Liberação de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos e exposto à radiação UVA. As células foram tratadas com os compostos AR, ACG e AC por 1 hora, seguidos de exposição à radiação UVA (10J/cm²) e o sobrenadante coletado 24 horas após a radiação. Os valores representam unidades arbitrárias (em pixels) da quantidade de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa no sobrenadante de HaCaT tratada com AR, ACG (A1) e AC (B1). Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa por HaCaT tratados com os compostos AR, ACG (A2) e AC (B2). Os valores estão representados em média $\pm$ E.P.M. e diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, comparado ao controle não-irradiado (NT ou NTE) e em # $p < 0.05$ e # $p < 0.01$ comparado ao controle irradiado (NT UVA ou NTE UVA). Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

A radiação UVB reduz a liberação de proMMP-9, -2 e de MMP-2 ativa em HaCaT, contudo a presença de etanol não permitiu essa redução após a radiação UVB (Figura 35, B1 e B2). Todos os compostos aumentam a liberação de proMMP-9 (ACG e AC), de proMMP-2 (AR, ACG e AC) e de MMP-2 ativa (AR e ACG) em HaCaT após a radiação UVB (Figura 31).

Figura 31. Liberação de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos e exposto à radiação UVB. As células foram tratadas com os compostos AR, ACG e AC por 1 hora, seguidos de exposição à radiação UVB (24mJ/cm²) e o sobrenadante coletado 24 horas após a radiação. Os valores representam unidades arbitrárias (em pixels) da quantidade de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa no sobrenadante de HaCaT tratada com AR, ACG (A1) e AC (B1). Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa por HaCaT tratados com os compostos AR, ACG (A2) e AC (B2). Os valores estão representados em média $\pm$ E.P.M. e diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, comparado ao controle não-irradiado (NT ou NTE) e em ## $p < 0.01$ comparado ao controle irradiado (NT UVB ou NTE UVB). Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

A atividade parácrina foi avaliada sobre a liberação de MMP-2 e MMP-1 por FHDP com o meio condicionado de HaCaT tratado com os compostos e exposta a radiação UVA (Figura 32).

HaCaT quando exposto à radiação UVA induz a liberação de proMMP-2 por FHPD, contudo a presença de etanol não permitiu esse aumento por FHPD após a radiação UVA (Figura 32, B). Este efeito também foi observado na quantificação de MMP-2 total (Figura 32, C). Nenhum dos tratamentos alteraram a liberação de proMMP-2 por FHPD com o meio condicionado de HaCaT exposto à radiação UVA (Figura 32, A e B). O pré-tratamento de

HaCaT com o AR aumenta a quantidade de MMP-2 total em FHPD após a radiação UVA (Figura 32, C).

Figura 32. Liberação de proMMP-2 por ativação parácrina de HaCaT pré-tratado com os compostos e irradiado por UVA sobre FHPD. HaCaT foi pré-tratado com os compostos AR, ACG e AC por 1 hora, exposto à radiação UVA (10J/cm²) e após 24 horas o meio condicionado de HaCaT foi transferido para FHPD por mais 48 horas. Gráfico e gel de zimografia mostrando a diminuição de proMMP-2 em HaCaT irradiado e o aumento de proMMP-2 liberada pelo FHPD com meio condicionado de HaCaT com os compostos AR e ACG (A) e AC (B). Os valores representam, em unidades arbitrárias, a liberação de proMMP-2 no sobrenadante de FHPD (n=3). (C) Gráfico de MMP-2 total, em pg/mL, no sobrenadante de FHPD cultivado por 48 horas com meio condicionado de HaCaT não-irradiado (NT ou NTE), irradiado por UVA (NT UVA ou NTE UVA) e pré-tratados com AR, ACG e AC, realizada com kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA; n=2). Os valores estão representados em média $\pm$ E.P.M. e diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, comparado ao controle não-irradiado e em # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ comparado ao controle irradiado.

A radiação UVA aumenta a liberação de MMP-1 total em HaCaT e o mesmo é observado na presença de etanol (Figura 33, A1). Todos os compostos reduzem a liberação de MMP-1 total em HaCaT exposto à radiação UVA (Figura 33, A1). A presença de etanol reduz a liberação de MMP-1 total em FHPD com meio condicionado de HaCaT tanto sem ou com a radiação UVA. O pré-tratamento com o ACG e AC aumenta a liberação de MMP-1 em FHPD com o meio condicionado de HaCaT exposto a radiação UVA (Figura 33, A2).

Após a radiação UVB, nenhum dos tratamentos ou a presença de etanol altera a liberação de MMP-1 total em HaCaT (Figura 33, B1). O pré-tratamento de HaCaT com AR e exposta à radiação UVB reduz a liberação de MMP-1 em FHPD (Figura 33, B2).

Figura 33. Liberação de MMP-1 total por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) pré-tratado com os compostos AR, ACG e AC e exposto à radiação UVA e UVB. Os gráficos mostram a liberação de MMP-1 em HaCaT expostas à radiação UVA (A1) e UVB (B1) e em FHPD com meio condicionado de HaCaT pré-tratada com os compostos, seguido de exposição a radiação UVA (A2) e UVB (B2) realizada com o kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA). Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. de MMP-1 em pg/mL e diferem do controle não-irradiado (NT e NTE) em * $p < 0.05$ e em ** $p < 0.01$, do controle irradiado em # $p < 0.05$ e em ## $p < 0.01$ e do controle não irradiado sem etanol em \$ $p < 0.05$. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Apenas a radiação UVB reduz a liberação de MMP-2 e 9 totais em HaCaT (Figura 34, B1 e B2) e apenas o pré-tratamento com AR aumenta a liberação de MMP-2 total (Figura 34, B2). Após a radiação UVA, o pré-tratamento com AR e ACG reduz a liberação de MMP-2 e 9 totais por HaCaT (Figura 34, A1 e A2).

Figura 34. Liberação de MMP-2 e 9 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) pré-tratado com os compostos AR, ACG e AC e exposto à radiação UVA e UVB. Os gráficos apresentam a liberação de MMP-9 em HaCaT após a exposição a radiação UVA (A1) e UVB (B1), e de MMP-2 após a exposição a radiação UVA (A2) e UVB (B2) realizada com kit Milliplex Map Human MMP Panel 2 (EMD Millipore Co., Billerica, MA EUA). Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. das leituras em pg/mL, e diferem do controle não-irradiado (NT e NTE) em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ e do controle irradiado em # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Todos os compostos reduzem a liberação de proMMP-2, 9 e MMP-2 ativa em HaCaT expostas a ambas radiações. Também todos os compostos reduzem a liberação de MMP-1 em HaCaT induzida pela radiação UVA. Contudo, os compostos ACG e AC não foram favoráveis na liberação de MMP-1 total por FHPD por atividade parácrina após a radiação UVA. Já o tratamento com AR reduz a liberação de MMP-1 por FHPD por atividade parácrina após a radiação UVB.

C2.6. Liberação de citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α

A liberação de IL-6 e IL-8 por HaCaT e FHPD pré-tratados com AR, ACG e AC foram quantificadas após a exposição às radiações UVA e UVB (Figura 35).

A radiação UVA reduz a liberação de IL-8 em HaCaT e FHPD e os tratamentos com ACG e AC retornam a liberação de IL-8 aos valores normais (Figura 35). Ambas as células apresentam aumento na liberação de IL-6 após a exposição à radiação UVA, e todos os tratamentos acentuam a liberação de IL-6 (Figura 35).

Figura 35. Liberação de IL-6 e IL-8 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) pré-tratados com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e expostos à radiação UVA. Os valores representados nos gráficos indicam a média $\pm$ E.P.M., em pg/mL, no sobrenadante de HaCaT (A e B) e FHPD (C e D) exposta a radiação UVA. Os valores diferem do controle não-irradiado (NT e NTE) em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ e do controle irradiado em # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A radiação UVB aumenta a liberação de IL-6 em HaCaT, sem alterar a liberação de IL-8 em ambas as células (Figura 36), enquanto que a presença de etanol (NTE) aumenta a liberação de IL-6 e IL-8 tanto em HaCaT quanto em FHPD. Apenas o pré-tratamento com AR aumenta a liberação de IL-6 em FHPD após a radiação UVB.

Figura 36. Liberação de IL-6 e IL-8 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) tratados com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e expostos à radiação UVB. Os valores representados nos gráficos indicam a média $\pm$ E.P.M. da leitura em pg/mL, no sobrenadante de HaCaT (A e B) e FHPD (C e D) exposta a radiação UV. Os valores diferem do controle não-irradiado (NT e NTE) em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ e do controle irradiado em ## $p < 0.01$. Teste estatístico ANOVA seguido do teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O efeito dos compostos sobre a liberação de TNF- α por HaCaT foi avaliada apenas após a radiação UVA, visto que somente HaCaT responde à exposição na dose de UVA empregada nos estudos. Todos os compostos aumentam a liberação de TNF- α (Figura 37). A presença de etanol (NTE) não responde a liberação de TNF- α em HaCaT exposto à radiação UVA (Figura 37).

Figura 37. Liberação de TNF- α por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), Clorogênico (ACG) e Cafeico (AC) e exposto à radiação UVA. Os valores representados nos gráficos indicam a média $\pm$ E.P.M. da leitura de TNF- α , em pg/mL, no sobrenadante de HaCaT. Os valores diferem do controle não-irradiado (NT e NTE) em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ e do controle irradiado em ## $p < 0.01$. Teste estatístico ANOVA seguido do teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Estes resultados permitem concluir que nenhum dos compostos reduz a liberação de IL-6 e TNF- α promovida por ambas as radiações em HaCaT e FHPD. Apenas o ACG

aumenta a liberação de IL-8 para níveis acima da liberação basal em HaCaT exposto à radiação UVA.

C2.7. Quantificação da produção de ERO em HaCaT exposta à radiação UVA

A radiação UVA induz aumento de ERO (intensidade de fluorescência - MFI - do DCF), enquanto que o tratamento com etanol (NTE) não altera após a radiação UVA. Da mesma maneira ao observado nos experimentos com peróxido de hidrogênio (apresentados no Anexo 1), o pré-tratamento com AR promoveu aumento de ERO em HaCaT exposto a radiação UVA, indicando um efeito pro-oxidante deste composto frente a radiação UVA (Figura 38, A). O pré-tratamento com ACG não alterou a quantidade de ERO em HaCaT após a radiação UVA (Figura 38, B). Apenas o AC reduziu a quantidade de ERO produzida por HaCaT exposto à radiação UVA (Figura 38, C).

Figura 38. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em HaCaT tratado com os compostos e exposto à radiação UVA. As células foram incubadas com a sonda DCFH-Da (30µM) por 40 minutos, tratadas com os compostos AR (A. 25 e 50 µM), ACG (B. 50, 100 e 200 µM) e AC (C. 50 e 75 µM) por 1 hora, seguidas da exposição a radiação UVA. A leitura foi feita em citômetro de fluxo (canal PERC-P) após a irradiação e (D) os valores então representados em média ± E.P.M. de intensidade de fluorescência (MFI) do composto DCF. Os valores diferem do controle irradiado em *P< 0.05 e **P< 0.01. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Sendo assim, os resultados mostram que o AR induz a produção de espécies reativas em HaCaT exposto à radiação UVA, enquanto que o AC reduz este efeito.

C2.8. Produção de COX-2 em HaCaT

A radiação UVB induz aumento na produção de COX-2 em HaCaT e apenas o composto ACG é capaz de reduzir este aumento. O pré-tratamento com AC aumenta a produção de COX-2 a valores similares ao basal, tentando reverter o efeito do etanol (Figura 39, A).

A radiação UVA aumenta a produção de COX-2 em HaCaT (Figura 39, B). O pré-tratamento com AR reduz a produção de COX-2, enquanto que o AC aumenta após a radiação UVA (Figura 39, B).

A presença do etanol (NTE) aumenta a produção de COX-2 em HaCaT e após a radiação UVB uma redução de COX-2 é observada. Contudo a presença do etanol não altera a produção de COX-2 em HaCaT nos experimentos de UVA, e esse mesmo perfil se mantém após a radiação UVA. Este mesmo efeito já foi sugerindo anteriormente (*Item C2.2*), devido ao tempo que a célula fica em PBS durante o tempo de exposição às radiações, até serem retornadas ao meio de cultura DMEM+10% SFB.

Figura 39. Produção de COX-2 em HaCaT tratado com os compostos e exposto à radiação UVA e UVB. A quantificação de COX-2 intracelular foi feita por ELISA em HaCaT 24 horas após a radiação e os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. em pg/mL. Os valores diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ quando comparados ao controle não irradiado, em # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ quando comparados ao controle irradiado e em \$\$ $p < 0.01$ quando comparados ao controle sem etanol. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Dentre os resultados obtidos, o tratamento com AR foi capaz de inibir a produção de COX-2 em HaCaT irradiado com UVA e o ACG foi mais eficiente em HaCaT irradiado com UVB. O etanol não se mostra um solvente adequado para avaliação deste parâmetro, visto

que reduz a produção de COX-2 após a radiação UVB e não aumenta a produção de COX-2 após a radiação UVA.

C2.9. Quantidade de fotoprodutos CPD em HaCaT exposto à radiação UVB

A quantidade de CPD formado pela radiação UVB em HaCaT pré-tratado com os compostos foi quantificada 6 horas após a radiação UVB. Nenhum dos tratamentos foi capaz de reverter a indução de lesões tipo CPD nas células irradiadas, ao contrário tanto o AR quanto o AC induziram um aumento destas lesões (Figura 40).

Figura 40. Formação de CPD em HaCaT tratado com os compostos AR, ACG e AC e exposto à radiação UVB. A quantificação de CPD foi feita por citometria de fluxo em HaCaT 6 horas após a radiação e os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. de MFI. Os valores diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ quando comparados ao controle irradiado. Teste estatístico ANOVA seguido do teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados mostram que no modelo empregado, os compostos AR e AC agravam a formação de CPD em HaCaT após a radiação UVB, enquanto que o ACG não interfere neste processo.

C2.10. Formação de fotoprodutos 8-oxo-dG em FHPD expostos à radiação UVA

A quantidade de 8-oxo-dG formado pela radiação UVA em FHPD pré-tratado com os compostos foi quantificada 6 horas após a irradiação. Na ausência de radiação UVA, etanol promoveu a formação de 8-oxo-dG em FHPD quando comparado ao controle. Todos os compostos auxiliaram na remoção de 8-oxo-dG em FHPD exposto à radiação UVA (Figura 41).

Figura 41. Formação de 8-oxo-dG em FHPD tratado com os compostos AR, ACG e AC e exposto à radiação UVA. A quantificação de 8-oxo-dG foi feita por citometria de fluxo em FHPD 6 horas após a radiação e os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. da razão de MFI. Os valores diferem em * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ quando comparados ao controle não irradiado, em # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ quando comparados ao controle irradiado e em \$ $p < 0.05$ quando comparado ao controle sem etanol (NT). Teste estatístico ANOVA seguido do teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados mostram que todos os compostos reduzem a formação de 8-oxo-dG em FHPD expostos à radiação UVA. Etanol não se mostra como um bom solvente visto que aumenta a formação de 8-oxo-dG em 50% em fibroblastos quando não irradiado.

C2.11. Efeito Fotoprotetor *In Vitro* dos compostos por Espectrofotometria de Refletância

Valores do fator de proteção solar estimado (FPS), a determinação do comprimento de onda crítico (λ_c) e Coeficiente de variação (razão UVA/UVB) dos compostos testes incorporados à formulação estão representados na Tabela 2. Nota-se que as formulações contendo 1% de AR ou de ACG apresentaram valores semelhantes de FPS ao protetor de referência Sundown® 15 quando testados sobre a matriz polimérica VitroSkin (Tabela 2), sugerindo que os compostos em questão reduzem a transmitância de UVB pela matriz polimérica, conferindo assim uma proteção à radiação UVA *in vitro*. Quando a AC é incorporado 1% na formulação, nota-se que o valor de FPS e a razão UVA/UVB apresentam-se muito maiores na matriz VitroSkin, superando os valores encontrados para o Sundown® 30. Contudo o mesmo não foi possível de ser observado sobre as outras matrizes poliméricas utilizadas no estudo (PMMA e Transpore).

A razão UVA/UVB deriva da excitação do espectro da formulação fotoprotetora, representando em valores numéricos a abrangência entre os espectros de UVA com de UVB do produto. Como observado na tabela 2, nenhum dos compostos testados bem como dos protetores de referência apresentaram valor alto de coeficiente de variação em nenhuma das três plataformas poliméricas, com exceção do AC quando testado na matriz Transpore.

Tabela 2. Proteção frente à radiação UVB, por meio do cálculo do fator de proteção solar estimado (FPS), e à radiação UVA avaliada por meio da determinação do comprimento de onda crítico (λ_c) e Coeficiente de variação (razão UVA/UVB).

Produto teste	VitroSkin			PMMA			Transpore®		
	FPS estimado	λ_c	Razão UVA/UVB	FPS estimado	λ_c	Razão UVA/UVB	FPS estimado	λ_c	Razão UVA/UVB
Ácido Clorogênico 1% (28 μ M)	11,25 $\pm$ 0,1 ^s	355,0	0,228 $\pm$ 0,053*	2,00 $\pm$ 0,0	337,6	0,174 $\pm$ 0,042**	4,33 $\pm$ 2,0	357,3	0,195 $\pm$ 0,027**
Ácido Rosmarínico 1% (28 μ M)	12,00 $\pm$ 3,9 ^s	356,6	0,211 $\pm$ 0,091*	2,00 $\pm$ 0,0	343,6	0,131 $\pm$ 0,026*	3,67 $\pm$ 0,6	361,6	0,116 $\pm$ 0,064
Ácido Cafeico 1% (56 μ M)	29,00 $\pm$ 5,6 ^{sss}	344,0	0,349 $\pm$ 0,028***	2,00 $\pm$ 0,0	336,0	0,305 $\pm$ 0,025***	2,70 $\pm$ 0,6	365,7	0,561 $\pm$ 0,005***
Base ^a	1,00 $\pm$ 0,0	386,0	0,022 $\pm$ 0,003	1,00 $\pm$ 0,0	390,0	0,011 $\pm$ 0,001	1,00 $\pm$ 0,0	383,0	0,024 $\pm$ 0,015
Sundown® FPS 15	11,33 $\pm$ 4,7 ^s	378,3	0,198 $\pm$ 0,124	13,67 $\pm$ 1,5 ^s	370,3	0,220 $\pm$ 0,061***	100,67 $\pm$ 13,9 ^{sss}	373,6	0,201 $\pm$ 0,026***
Sundown® FPS 30	21,67 $\pm$ 5,0 ^{sss}	349,0	0,192 $\pm$ 0,017	62,33 $\pm$ 10,8 ^{sss}	378,0	0,232 $\pm$ 0,027***	218,25 $\pm$ 39,2 ^{sss}	378,5	0,237 $\pm$ 0,048***

^a Composição da base: água, óleo mineral, lanolina, álcool cetílico, cetearato-20, vaselina, propileno glicol, ciclometicona, ciclopentasiloxano, dimeticona, henoxietanol, metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, imidazolidinil ureia, goma xantana, EDTA, BHT.

Os compostos testes foram incorporados a 1% em Base comercial para fotoprotetores (Botica Biofármacos® – farmácia de manipulação, São Paulo, SP). Os valores de FPS diferem em ^sp<0.05 e ^{sss}p<0.001 quando comparado a base e os valores de razão UVA/UVB em *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 quando comparados a base. Teste estatístico ANOVA seguido do teste de Tukey. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Em conclusão, a eficácia fotoprotetora *in vitro* dos compostos não foi evidenciada quando analisada com as matrizes poliméricas Transpore e PMMA por espectrofotometria de refletância. Contudo os compostos apresentaram efeito fotoprotetor na matriz VitroSkin, superando os valores encontrados no controle de referência FPS 15.

5. DISCUSSÃO

A radiação UV leva a uma série de ações coordenadas e hierárquica de genes e proteínas, conduzidas de modo a reparar os danos ocasionados pelo estresse físico.

Modelos *in vitro* com células da pele humana têm sido empregados nas etapas intermediárias ao desenvolvimento e avaliação de moléculas fotoquimioprotetoras. Modelos de pele reconstruída são propostos como alternativa de substituir/refinar a avaliação em voluntários humanos, onde a formação de SBC, danos de DNA como CPD e 8-oxo-dG e o desaparecimento de fibroblastos na derme superior são avaliados (DUVAL e col., 2003; BERNERD e col., 2000; BERNERD e col., 2008). A modulação gênica e protéica de proteínas também pode ser elucidada para cada camada da pele, epiderme e derme (MARIONNET e col., 2011). Esses modelos permitem avaliar formulações contendo tanto filtros físicos e químicos como também compostos antioxidante, devido à presença da camada córnea, permitindo avaliar a resposta de células da pele expostas à radiação UV (BERNERD e col., 2000).

Modelos *in vitro* com cultura de células da pele em monocamada permitem avaliar a contribuição individual de cada uma das radiações UV sobre cada tipo celular. A limitação deste modelo é que não oferece condições fisiológicas relacionados à arquitetura do tecido, não permitindo avaliar a capacidade de penetração da radiação UV sobre a pele (BERNERD e col., 2008). Entretanto, embora os modelos tridimensionais tenham a vantagem em mimetizar a pele/epiderme humana, estes nem sempre estão disponíveis para estudo. Além disso, culturas de células em monocamada são mais simples de execução e permitem avaliar individualmente os fenômenos desejados e compreender os mecanismos envolvidos na ação preventiva/terapêutica dos compostos.

Queratinócitos quando expostos à radiação UVA e UVB são conduzidos à morte por apoptose, podendo ser ativada tanto por via intrínseca quando extrínseca (ASSEFA e cols., 2005; RYU e cols., 2010; MURPHY e cols., 2001). Além disso, o aumento na expressão de diversos genes em queratinócitos como os que induzem a formação de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, prostaglandinas (COX-2 e citocromo CYP4F8), de AQP-1, 3 e 9, e MMP-3 e 10 ocorre de maneira tempo e dose-dependente (PISARCHIK e col., 2004). Outro fenômeno associado à exposição de queratinócitos à radiação UV é a formação de danos no DNA diretos (como a formação de CPD, 6-4PD, isômeros de Dewar), e indiretos, levando à formação de produtos de oxidação de bases purínicas (p.e. 8-oxo-dG).

Queratinócito humano imortalizado (HaCaT) é amplamente empregado em estudos de atividade de compostos pois preservam a maioria das características funcionais de queratinócitos basais. HaCaT apresenta uma mutação entre os códons 178 a 179 e entre 281 a 282 do gene *TP53*, sendo cada mutação em um alelo, sugerindo assim que sua imortalização pode estar relacionada à uma ausência da proteína p53 selvagem (LAHMAN e col., 1993). Quando expostas à radiação UVA ou UVB, HaCaT responde com produção transiente da proteína p53 (HENSELEIT e col., 1997), resultando em morte por apoptose. Isto sugere que HaCaT apresenta pelo menos uma parte da proteína p53 funcional (HUANG e col., 2005). HaCaT também apresenta uma ativação anormal de NF- κ B, o que faz com que a célula escape do controle à parada de ciclo, promovendo uma maior susceptibilidade de HaCaT a apoptose após a radiação UV (CHATURVERDI e col., 2001). A hipermetilação presente no sítio promotor de p16 (CHATURVEDI e col., 1999) resulta numa baixa ativação de p53 e p21 em HaCaT após exposição a radiação UVB (ELMAGEED e col., 2009). A ativação anormal de NF- κ B e a ausência de p16 em HaCaT pode induzir a falhas no aumento de p21 após radiação UVA e UVB (CHATURVEDI e col., 2001; CHATURVEDI e col., 1999).

Ambas as radiações UVA e UVB promoveram redução na viabilidade de HaCaT nas doses utilizadas no estudo, resultando em aumento de morte por apoptose e necrose/apoptose tardia. A radiação UVA induziu redução na expressão de p53 e de p21 em HaCaT, enquanto que após a radiação UVB apenas a expressão de p53 está aumentada, sem alterar a expressão de p21. Apesar dos resultados diferirem quanto a expressão de p53 e p21, ambas as radiações induzem a morte por apoptose, sendo que a apoptose foi mais proeminente após a radiação UVA do que à UVB. A expressão gênica de p21 (*CDKN1A*) em HaCaT mostrou-se aumentada 12 horas após a radiação UVB (MIN e col., 2008), contudo este efeito aparece após 6 horas em queratinócitos primários (MURAKAMI e col., 2001) em doses superiores às utilizadas no presente estudo. A indução de p21 foi relacionada com a parada de ciclo na fase G1 induzida pela p53, visando à reparação dos danos no DNA (ELMAGEED e col., 2009). Em nosso modelo, ambas as radiações UVA e UVB induzem aumento na expressão gênica de *CDKN1A* em HaCaT após 24 horas, contudo devido à redução na expressão de p21, isto sugere que ou ocorreu redução na tradução desta proteína ou na degradação da proteína transcrita.

A indução de apoptose promovida pela radiação UV é um mecanismo que protege a pele de transformações neoplásicas dos queratinócitos, como a formação de carcinomas de células basais e escamosas (SITAILO e col., 2002). A caspase-9 apresenta um atraso inicial de 6 horas na sua ativação zimogênica, que pode ser devida a uma série de eventos como

transcrição gênica ou formação do complexo apoptossômico (SITAILO e col., 2002). A caspase-3 ativa é considerada a enzima primordial na indução de apoptose, pois ela é a enzima final na cascata proteolítica de caspases, levando a clivagem de proteínas e fragmentação do DNA (CIMINO e col., 2007). Caspases efetoras (Caspase-3 e 7) inativam PARP (116kDa) em fragmentos de 86 e 24 kDa, convertendo a morte celular de necrose para apoptose (CHAITANYA e col., 2010). Compostos que inibem PARP induzem a diminuição do reparo, levando a célula a sobreviver com o DNA danificado, o que pode conduzir ao processo neoplásico (QIN e col., 2012). Nossos resultados mostram que ambas as radiações UVA e UVB promovem redução da pró-caspase-9 (47kDa), das formas clivadas de caspase-9 (35kDa e 17kDa) e de pro-caspase-3 em HaCaT. Contudo, após a exposição a maior dose de radiações UVA e UVB é observado que HaCaT reduz a expressão de PARP, direcionando ao processo de morte por apoptose e não a reparação celular.

O transporte de água através das membranas biológicas é realizado por AQP de membrana, proteína importante para a manutenção adequada da pressão osmótica de barreiras epiteliais e endoteliais. A radiação UVA induz à internalização destas proteínas em células de HaCaT e fibroblastos devido ao aumento de ERO (CAO e col., 2008) e por ativação da via MEK/ERK (JI e col., 2008). A expressão gênica de AQP3 em queratinócitos expostos a radiação UVB apresentam resultados controversos como aumento (PISARCHIK e col., 2004) ou diminuição (SHAN e col., 2012) da expressão gênica desta proteína. A expressão gênica de AQP3 e a atividade do seu promotor podem receber tanto a influência de TNF- α , promovendo uma redução de mRNA de AQP3 (HORIE e col., 2009), ou por PPAR γ (JIANG e col., 2011), resultando no aumento da expressão gênica de AQP3. Nossos resultados demonstram que HaCaT quando exposto à ambas as radiações UVA e UVB apresenta uma diminuição de AQP3 de membrana, enquanto que apenas a radiação UVA induz aumento de AQP3 na forma internalizada, reduzindo a captação de água pela célula, favorecendo a desidratação. Além disso, nossos resultados mostram que a radiação UVA induz aumento da expressão gênica de AQP3 em HaCaT, enquanto que após a radiação UVB a expressão gênica de AQP3 não se mostra alterada.

Queratinócitos humanos normais quando expostos à radiação UVB apresentam aumento na expressão do gene endógeno ACTINA (BALOGH e col., 2008). Em nosso modelo a radiação UVB nas doses empregadas não foi capaz de alterar a expressão dos genes ACTINA ou GAPDH. Entretanto a exposição à radiação UVA levou a um aumento na expressão do gene GAPDH e redução de ACTINA. Apesar dessas alterações nos genes endógenos, a resposta de HaCaT à expressão dos genes AQP3 e CDKN1A não foi diferente

ao efeito encontrado para a radiação UVA, apresentando uma resposta similar quando analisados com os dois genes endógenos.

Fibroblastos apresentam uma maior resistência à radiação UV quando comparados a queratinócitos (MEEWES e col., 2001), e quando expostos à dose similar àquelas empregadas em queratinócitos, apresentam um efeito transiente de parada de ciclo (CHAINIAUX e col., 2002; GENTILE e col., 2003). A exposição de fibroblastos a doses subtóxicas repetida de radiação UVB induzem a senescência (CHAINIAUX e col., 2002). Fibroblastos senescentes são facilmente vistos em culturas *in vitro*, contudo pouco evidenciada na pele *in vivo* humana irradiada (FISHER, 2008). Nossos resultados mostram que FHPD quando exposto às radiações UVA e UVB apresenta redução na viabilidade celular, contudo apenas após a radiação UVA resulta em parada de ciclo em fase G2. A proteína p21 é o principal indutor da parada de ciclo em resposta a danos no DNA, e induz à parada do ciclo em fase G1, com a formação de complexos ciclina-CDK, e também em fase G2 (CAZZALINI e col., 2010). A parada de ciclo em fase G2 está relacionada à inibição de CDK1 pela p21, redução do complexo ciclina B-CDK1 (SMITS e col., 2000), retenção e inativação do complexo ciclina B- CDK1 no núcleo (CHARRIER-SAVOURNIN e col., 2004) e a degradação de ciclina B (GILLIS e col., 2009). Nossos resultados mostram que a radiação UVA promove redução na expressão da proteína p53 e aumento de p21 em FHPD, induzindo à parada de ciclo em fase G2. A radiação UVB promove redução da viabilidade de FHPD, com aumento na expressão das proteínas p21 e p53, sugerindo assim um possível efeito que antecede a senescência.

A formação de rugas profundas, despigmentação e telangectasia são características do fotoenvelhecimento cutâneo devido à exposição crônica da pele a radiação UV (CHUNG e col., 2001). Bioquimicamente o fotoenvelhecimento é caracterizado pelo aumento de fibras elásticas anormais na derme e uma drástica redução de tipos distintos de colágeno devido à degradação dos mesmos pelas MMP (BRENNEISEN e col., 2002; WLASCHEK e col., 2001). No modelo utilizado em nosso estudo, HaCaT respondeu a exposição à radiação UVA com aumento da liberação de MMP-1 e redução de MMP-2 e 9 após a exposição à ambas as radiações. FHPD exposto à ambas as radiações não mostraram alterações nos perfis de liberação de MMP-2, porém quando FHPD foram cultivados com sobrenadante de HaCaT previamente exposto à radiação UVA, uma redução de MMP-1 foi observada. FHPD expostos à radiação UV apresentam redução da expressão de pró-colágeno em até 80% e aumento na produção de MMP-1 em centenas de vezes (FISHER e col., 1996; FISHER e col., 1997; FISHER e col., 2000). Nossos resultados mostram que ambas as radiações UVA e

UVB induzem a liberação de MMP-1 tanto por HaCaT exposto à radiação UVA quanto por FHPD sob efeito parácrino de HaCaT exposto à radiação UVB, indicando a importância da interação entre as células da pele no processo de fotoenvelhecimento.

A exposição à radiação UV induz a um redirecionamento da resposta imune de efetiva para suprimida (KRIPKE, 1994). A IL-6 é uma citocina multifuncional que apresenta diversas atividades biológicas em diferentes alvos celulares. A liberação de IL-6 por queratinócitos após a exposição à UVB ocorre devido à formação de CPD e é induzida de forma indireta, com a liberação inicial de IL-1 α (CHUNG e col., 1996). Sua atividade, descrita como promotora da proliferação de queratinócitos, também está correlacionada à reação inflamatória aguda, como p.e. aquela consequente à geração de calor (URBANSKI e col., 1990). A IL-8 faz parte de uma superfamília de citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas, consideradas quimiocinas, com papel no direcionamento da migração de células do sistema imune ao local da inflamação. A IL-8 pode ser induzida por TNF- α , IL-1 α ou ERO e se liga aos receptores do tipo CXCR1 presente em neutrófilos, resultando no processo de degranulação de zimógenos. A expressão gênica de ambas citocinas IL-6 e IL-8 são reguladas por NF- κ B (HAYDEN e col., 2006; MATSUSAKA e col., 1993). O sítio promotor de IL-6 utiliza 4 fatores de crescimento, NF- κ B, CREB, C/EBP e AP-1, sendo que a ausência de um destes fatores não inibe a expressão de IL-6 (XIAO e cols. 2004). A indução de IL-8 em queratinócitos após a radiação UV é via Fator VII(a) (*Tissue factor - Factor VIIa*), cujo sítio promotor é dependente de participação de AP-1 e NF- κ B em conjunto (WANG e col., 2002; BACHELOR e col., 2004). No modelo empregado, HaCaT e FHPD responderam à irradiação UVA com uma pequena redução na liberação de IL-8 e aumento de IL-6, sugerindo um efeito supressor da imunovigilância e de proliferação celular. Quando expostos a radiação UVB, esta induziu aumento de IL-6 apenas em HaCaT, sem alterar a liberação de IL-8 por ambas as células. Sendo assim, a ausência de indução de IL-8 em HaCaT detectada em nossos estudos após a radiação UV pode ser devida a uma falha na expressão gênica do mesmo, uma vez que o sítio promotor de IL-8 necessita da participação de NF- κ B e HaCaT apresenta ativação anormal deste fator de transcrição (CHATURVERDI e col., 2001).

A indução de TNF- α após exposição da epiderme à radiação UV está relacionada com a formação de SBC e a imunossupressão local, resultando na diminuição da migração de células de Langerhans, redução da capacidade de apresentação de antígenos e perda da imunovigilância (BECHETOILLE e col., 2007; CLYDESDALE e col., 2001). Na derme, o TNF- α é liberado por monócitos, fibroblastos e macrófagos, dependendo da dose e tipo de

radiação UV (WERTH e col. 2003). No presente estudo, nenhuma dose de UVA ou UVB induziu a liberação de TNF- α por FHPD, demonstrando que este modelo não permitiu à indução de TNF- α em níveis detectáveis. Por outro lado, HaCaT quando exposto a radiação UVA apresentou aumento na expressão gênica e proteica de TNF- α (AN e col., 2010), o que foi confirmado nos nossos resultados quando HaCaT é exposto à radiação UVA. Assim o modelo responde tanto aos efeitos da radiação UVA quanto para a radiação UVB, embora em menor intensidade.

O estado redox da célula é controlado pelo sistema antioxidante endógeno e a geração de ERO pela radiação UV pode levar ao comprometimento da homeostase celular (TRAUTINGER e col., 2001). A radiação UVA gera estresse oxidativo nas células da pele com a formação inicial do oxigênio singlete (TYRELL e col., 2012) sendo esta produção de ERO de maior intensidade após a exposição à radiação UVA quando comparada a UVB (SWALWELL e col., 2012). Nossos resultados demonstram que HaCaT quando exposto a radiação UVA apresenta aumento na formação de ERO. A expressão de fatores de transcrição (AP-1, NF- κ B, Nrf2), responsivos à resposta inflamatória (interleucinas, HO-1, ICAM-1, enzimas antioxidantes, COX-2) e proteases (MMP e catepsinas) é modificada em presença de ERO (TYRRELL, 2012), contribuindo substancialmente aos efeitos de longo prazo induzidos na pele pela radiação UV. A oxidação de componentes de membrana está relacionada tanto a formação de eritema após exposição à radiação UVB (ISOHERRANEN e col., 1999), como também após a radiação UVA (KVAM e col., 1997). A COX-2 é induzida na epiderme em resposta à injúria, inflamação e/ou ativação celular por citocinas e fatores de crescimento (ATHAR e col., 2001; CHEN e col., 2001). Queratinócitos apresentam aumento na produção de COX-2 e de PG após radiação UVA, protegendo a célula da morte e assim favorecendo a formação de hiperplasia epidermal (TRIPP e col., 2003). Nossos estudos mostraram que ambas as radiações UVA e UVB aumentam a produção de COX-2 em HaCaT, mostrando um aumento do processo inflamatório.

Ambas as radiações UVA e UVB ocasionam danos no DNA de células da pele como formação de CPD e 8-oxo-dG, contudo a quantidade de dano induzido pela radiação UVB é mais intensa quando comparada à radiação UVA (MOURET e col., 2006). A radiação UVB induz mais frequentemente a formação de fotoprodutos do tipo CPD e (6-4) PD (PFEIFER e col., 2005). A lesão de DNA do tipo 8-oxo-dG é a lesão mais comumente descrita para a radiação UVA (DESSINIOTI e col., 2010). A oxidação de DNA pode ser ocasionada tanto por radical hidroxila ($\cdot$ OH), oxigênio singlete (1 O₂) quanto por peróxido (H₂O₂) (CADET e col., 2008), sendo que o oxigênio singlete é responsável por 80% da 8-oxo-dG formada

(CADET e col., 2011). Nossos ensaios de detecção de danos de DNA mostram que HaCaT responde a exposição à radiação UVB com formação de CPD e que a queda nos níveis deste fotoproduto após 6 horas da radiação sugere a capacidade de remoção deste dano pela célula. A radiação UVA promove a formação de lesões do tipo 8-oxo-dG em FHPD apenas na maior dose de radiação estudada.

Produtos fotoprotetores possuem em sua formulação associação de filtros físicos e químicos, que em sua combinação determina o FPS e FP-UVA. Contudo, a maioria dos produtos não é desenvolvida com capacidade de bloquear 100% da radiação UV, permitindo que uma parcela pequena de radiação seja absorvida pela pele. Ainda, o uso inadequado dos produtos fotoprotetores por consumidores compromete a eficácia fotoprotetora do produto, permitindo a exposição da pele aos efeitos nocivos da radiação UV.

Metodologias *in vitro* têm sido desenvolvidas para determinar o potencial fotoprotetor de substâncias e formulações, contudo não existe nenhuma metodologia amplamente aceita (ROHR et al., 2010). Alguns parâmetros conhecidos e outros não conhecidos podem influenciar no resultado quando essas metodologias são utilizadas, como p.e. a composição da formulação, o substrato utilizado para a realização da leitura e a homogeneidade da aplicação do produto sobre o substrato. Apesar da completa definição sobre o equipamento mais adequado para a determinação do FPS *in vitro* ainda não há uma definição sobre qual substrato deve ser empregado no teste pelas agências reguladoras (GAROLI e col., 2009). Existem 5 tipos de substratos que são empregados atualmente, a saber, VitroSkin™ (IMS.inc, EUA), Transpore® (3M Company, EUA), PMMA (com diferentes rugosidades), Placas de quartzo (com diferentes rugosidades) e Teflon (PTFE). De acordo com Springsteen et al. (1999) o substrato ideal para os testes de FPS *in vitro* deve ser transparente à radiação UV e apresentar similaridade a porosidade e textura da pele humana. O VitroSkin™ é amplamente utilizado pelas vantagens que apresenta como similaridade com a epiderme humana quanto à interação entre o produto e a pele e devido a excelente correlação com os testes *in vivo* (IMS.inc, 2012). Contudo, uma das desvantagens, além do seu alto custo, seria a baixa capacidade de transmitância de UV, principalmente nos comprimentos de onda menores (SPRINGSTEEN et al., 1999). A COLIPA (*The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association*,) recomenda o uso do PMMA como substrato padrão enquanto que a Norma Australiana (AS/NZS 2604:1998) sugere o uso de placas de quartzo com certa rugosidade. Diffey & Robson (1989) introduziram o Transpore®(3M) como forma de simplificar o substrato de utilização para essa análise. Na maioria dos casos, os resultados de FPS apresentados pelo Transpore® apresentam boa correlação com os valores publicados para

cada formulação e com os testes *in vivo* (SPRINGSTEEN e col., 1999). Contudo as desvantagens no uso do Transpore® são: diferenças nos tamanhos do poro ao longo da fita, incapacidade de absorver formulações contendo álcool ou óleo e a baixa correlação dos valores de FPS para formulações contendo extratos complexos com ingredientes orgânicos. Para nossas análises, foram escolhidos 3 substratos distintos, VitroSkin™, PMMA e Transpore®, com características que diferem entre si para avaliar o potencial efeito fotoprotetor dos compostos fenólicos do estudo como filtro solar. A diferença de rugosidade nas 3 matrizes poliméricas pode interferir nos valores de FPS apresentado pelos compostos do estudo. Garoli et al. (2009) apresenta valores de rugosidade da superfície de diversas matrizes e fica evidente que o VitroSkin™ ($16.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$) possui uma rugosidade mais próxima do molde de silicone da pele humana ($16.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$), seguido do Transpore® ($7.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$) e do PMMA ($2.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$). Essa rugosidade interfere na transmissão difusa do range espectral total do conjunto substrato + produto, não permitindo obter a recuperação total da transmissão difusa apenas do produto. Sendo assim, quanto maior é a rugosidade do substrato, maior é a interferência (GAROLI e col., 2009).

As formulações contendo 1% de AR ou de ACG apresentaram valores de FPS semelhantes ao Sundown® 15 quando testados sobre a matriz polimérica VitroSkin™, permitindo sugerir que os compostos em questão reduzem a transmitância de UVB pela matriz polimérica, conferindo uma proteção UVB *in vitro*. Quando 1% de AC é incorporado na formulação, nota-se que o valor de FPS e a razão UVA/UVB apresentam-se maiores na matriz VitroSkin™, superando os valores encontrados para o Sundown® 30. Contudo o mesmo não foi observado com as outras matrizes poliméricas, PMMA e Transpore®. Nenhum dos compostos testes bem como os produtos usados como referência apresentaram valores altos de coeficiente de variação em nenhuma das três plataformas poliméricas, com exceção do AC quando testado na matriz Transpore®. Resultados similares foram evidenciados por Velasco e col. (2008a) e Velasco e col. (2008b), onde as formulações contendo 0.1% de rutina associadas a filtros químicos apresentaram valores de coeficiente de variação iguais ou inferiores a 0,52. Os valores discrepantes obtidos para as diferentes matrizes podem ser afetados pela quantidade de produto aplicado sobre as matrizes. Quando são feitos testes *in vivo* de FPS, os protocolos padrões sugerem o uso de $2\text{mg}/\text{cm}^2$, enquanto que nas análises *in vitro* essa quantidade varia de acordo com a agência reguladora em questão. A COLIPA sugere a aplicação de $1.3 \text{ mg}/\text{cm}^2$ para testes *in vitro* (COLIPA, 2011). Rohr e col. (2010) mostrou que a variação de $0.5\text{mg}/\text{cm}^2$ na quantidade de produto aplicado sobre a matriz

polimérica PMMA pode comprometer em até 3 vezes o valor final de FPS, quando utilizado o equipamento Labsphere UV1000S.

Queratinócitos e fibroblastos foram pré-tratados com AR, ACG e AC, compostos com conhecida atividade antioxidante, e expostos à radiação UVA e UVB separadamente para avaliar a capacidade fotoprotetora destes compostos. Estes ensaios foram realizados com concentrações não citotóxicas dos compostos estabelecidas no estudo de viabilidade por NRU (Anexo 1).

Antioxidantes funcionam por mecanismos diferentes dos filtros solares, oferecendo proteção à pele através da modulação da resposta celular. Assim os antioxidantes podem proporcionar uma estratégia efetiva para reduzir estes efeitos danosos da radiação UV e auxiliar na prevenção do fotoenvelhecimento.

O uso de sequestradores de radicais livres para reduzir os danos ocasionados pela radiação UV torna-se uma abordagem promissora para fotoproteção e prevenção do câncer de pele. Potapovich e col. (2013) comparou a ação de polifenóis de plantas em tratamentos pré- e pós-irradiação UV em queratinócitos humanos primários e concluiu que o tratamento após radiação UV permite uma melhor avaliação do efeito fotoprotetor dos polifenóis quando analisado a expressão gênica de mediadores inflamatórios. Contudo a avaliação de polifenóis em tratamentos pré-irradiação UV em células da pele permite elucidar a capacidade de evitar os danos oxidativos da radiação UV antes mesmo da indução de resposta inflamatória. Antioxidantes apresentam um papel fundamental na prevenção da formação de danos oxidativos no DNA, principalmente na capacidade de reduzir a formação de 8-oxo-dG (WAGENER et al, 2012). Assim, o estudo com tratamentos antes da irradiação permite elucidar não só a capacidade moduladora do antioxidante frente à cascata inflamatória induzida pela radiação UV, mas também a capacidade de evitar a transmissão fotoquímica de moléculas cromóforas a alvos celulares.

O AR em concentração de 25µM reverte parcialmente a citotoxicidade da radiação UVB para HaCaT e de ambas as radiações para FHPD. Resultados apresentados por Psotová e col., (2006) e Vostálová e col., (2010) mostram que o AR apresenta eficácia fotoprotetora em HaCaT exposto tanto à radiação UVA quanto a UVB na mesma concentração utilizada em nosso trabalho. A capacidade moduladora do AR sobre a liberação de MMP foi demonstrada sobre a liberação de pró-MMP-9, MMP-2 e MMP-1 total após radiação UVA, de pró-MMP-2 e MMP-2 ativa após a radiação UVB em HaCaT e de MMP-1 por FHPD com meio condicionado de HaCaT exposto a radiação UVB. Apesar da capacidade moduladora de AR sobre a liberação de MMP, o pré-tratamento com AR demonstra um efeito dual com

redução da produção de COX-2 após a radiação UVA ao mesmo tempo que uma ação pró-inflamatória, aumentando a liberação de IL-6, 8 e TNF- α em HaCaT. Lembo e col. (2014) demonstraram que o AR apresenta capacidade anti-inflamatória em tratamento por 6h após a radiação UVB em HaCaT com redução da expressão gênica de IL-6 e 8 e aumento de IL-10, demonstrando que diferenças entre os tipos de tratamento pré e pós-irradiação estão relacionadas ao efeito anti-inflamatório do AR. A medida de ERO indica que o AR apresenta efeito pró-oxidante frente à radiação UVA. A ação preventiva de alguns compostos antioxidantes é descrita por atuarem como indutores do estresse oxidativo (LAMBERT e col., 2010). Efeitos pró-oxidantes podem induzir o sistema antioxidante endógeno de células normais e assim conferir proteção a agentes carcinogênicos (KHAN e col., 2009).

O aumento da expressão proteica de PARP íntegro e da clivagem de caspase-9 em HaCaT após a radiação UVA demonstra que o pré-tratamento com AR conduz a normalidade destas proteínas aos níveis basais em HaCaT. Em FHPD, o aumento de p53 juntamente com a redução de 8-oxo-dG demonstra um controle de p53 em FHPD, auxiliando no mecanismo de reparação de danos após a radiação UVA. O aumento de AQP3 de membrana e da expressão gênica de AQP3 demonstra que o pré-tratamento com AR evita a perda desta proteína de membrana na célula e estimula a expressão proteica de AQP3 em HaCaT, melhorando a capacidade de hídrica da célula após a radiação UVA.

O ACG apresentou efeito fotoprotetor sobre ambas as células irradiadas com maior número de respostas benéficas após exposição às radiações UVA e UVB. ACG na concentração de 100 μ M foi capaz de reverter a morte celular observada após a irradiação tanto de HaCaT quanto de FHPD quando comparada ao controle irradiado. Contudo, ACG na maior concentração estudada (200 μ M) induziu redução de 60% na viabilidade de HaCaT exposto à radiação UVA. Estudos mostram que diversos compostos antioxidantes podem demonstrar efeitos pró-oxidantes sob certas condições (DECKER, 1997). Além dos comumente descritos como altas concentrações de oxigênio nas culturas e deficiência de antioxidantes naturais, altas concentrações de compostos fenólicos podem promover a depleção e esgotamento de glutathione celular, resultando na instabilidade destes compostos em meios de culturas como o DMEM (HALLIWELL, 2008). Assim, a concentração de 200 μ M de ACG definida em ensaios anteriores como não citotóxica, quando associada à radiação UVA leva ao agravamento da resposta citotóxica à radiação.

A regulação de fatores de transcrição relacionada aos genes promotores de MMP já foram estudadas em queratinócitos murinos (JB6), mostrando que o pré-tratamento com ACG reduz a expressão de AP-1 e NF- κ B (KANG e col., 2009; FENG et al., 2005). Assim a

redução da liberação de pró-MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2 ativa após ambas as radiações UVA e UVB e de MMP-1 após radiação UVA em HaCaT demonstra que o ACG possui a capacidade moduladora sobre a liberação de MMP sobre HaCaT exposto às radiações UVA e UVB. Após a radiação UVA, o tratamento com ACG induziu aumento na liberação de IL-6 e 8 por ambas as células e induziu aumento na liberação de TNF- α em HaCaT, indicando uma relação pró-inflamatória entre o pré-tratamento das células com ACG e a radiação UVA. A radiação UV, por ser um agente exógeno oxidante, induz a super-expressão de fatores responsivos ao estresse oxidativo, como o NF- κ B, e a indução de AP-1 atua como um efeito compensatório a reduzir o estresse oxidativo celular (GIUS e col., 1999). Assim, o aumento na liberação de IL-6 promovida pelo ACG em HaCaT pode ser resultado de um desequilíbrio oxidativo juntamente com a ativação do sítio promotor de IL-6, já que este composto possui capacidade em induzir a expressão de AP-1 em HaCaT (KANG e col., 2009; FENG et al., 2005), ao mesmo tempo que esta célula apresenta falhas na ativação de NF- κ B (CHATURVERDI e col., 2001). Após a irradiação com UVB nenhum efeito foi observado sobre a liberação de IL-6 e 8 em ambas as células, contudo uma redução na produção de COX-2 em HaCaT foi observado, mostrando que o ACG modula a produção de COX-2 frente a radiação UVB. Kang e col. (2009) já observou que o pré-tratamento com ACG reduz a produção de COX-2 e de PG2 tanto em culturas de queratinócitos murinos quanto em animais expostos a radiação UVB.

O aumento da expressão gênica e proteica de p21 e o aumento na expressão de PARP íntegro e de pró-caspase-9 promovida pelo ACG em HaCaT exposto à radiação UVA indica a modulação destas proteínas no reparo celular e redução de morte em HaCaT exposto à radiação UVA. A capacidade hídrica de HaCaT pré-tratado com ACG também foi restaurada após a radiação UVA, com aumento de AQP3 de membrana e na expressão gênica de AQP3. Após a exposição à radiação UVB, os efeitos do ACG em HaCaT como redução de expressão gênica e proteica de p21, redução de p53, aumento das proformas de caspase-3 e 9 sem o comprometimento da remoção de CPD indicam um efeito fotoprotetor do ACG, reduzindo a citotoxicidade. Em FHPD, o aumento de p53, recuperação do ciclo celular e remoção de 8-oxo-dG após a radiação UVA e redução de p21 após a radiação UVB mostram que o pré-tratamento com ACG pode proteger os FHPD dos efeitos nocivos de ambas as radiações.

A eficácia fotoprotetora do AC já foi inicialmente descrita em queratinócitos murinos e em animais após a radiação UVB, diminuindo a fosforilação de proteínas pro-apoptóticas como c-Jun, p38 e MAPK quinase 4 (KANG e col., 2009; FENG e col., 2005). HaCaT

quando tratado com AC (75 μ M) apresenta reversão parcial na viabilidade apenas após a exposição à radiação UVB, enquanto que nenhum efeito foi observado em FHPD. Em estudos *in vivo* o AC preveniu o aumento de IL-10, a transcrição de AP-1 e NF- κ B e expressão de COX-2 após exposição à radiação UVB, prevenindo assim a imunossupressão no local (STANIFORT e col., 2006; KANG e col., 2009). O pré-tratamento com AC reduz a liberação de proMMP-2, 9 e MMP-1 total em HaCaT após a radiação UVA. Pluemsamran e col., (2012) também evidenciaram que o tratamento prévio com AC reduz a liberação de MMP-1 em HaCaT, atribuindo essa redução com a possível manutenção dos níveis do sistema antioxidante celular.

O pré-tratamento de HaCaT com AC reduz a produção de ERO após a exposição à radiação UVA, contudo a produção de COX-2 em HaCaT em ambas as radiações está aumentada. O comprometimento na remoção de CPD após a radiação UVB, bem como a interferência do etanol sobre parâmetros estudados na HaCaT exposto à radiação UVA podem ser as causas do aumento na produção de COX-2 em HaCaT pré-tratado com AC. Outro efeito pró-inflamatório evidenciado com o pré-tratamento com AC é o aumento na liberação de IL-6 e 8 em ambas as células após a radiação UVA e de IL-6 em FHPD após a radiação UVB. Poquet e col. (2008) descreveu que o tratamento com AC após 48h da radiação UVB reduz a produção de IL-8 em HaCaT, mostrando que o AC possui efeito anti-inflamatório quando adicionado nas células após a radiação UV. Esta diferença na indução da resposta inflamatória de HaCaT tratado com AC pode ser explicada com a diferença de tratamento pré e pós a radiação UV, como observado por Potapovich e cols. (2013).

Nos ensaios com AC empregamos o etanol para solubilização do composto. Nossos resultados indicam que os níveis de ERO sofrem interferência do etanol o que foi observado principalmente nas células expostas a UVA. Os danos fototóxicos ocasionados pela radiação UVA são mediados principalmente pela formação de ERO (BRENNER e col., 2005; WONDRAK e col., 2006). Reações do peróxido de hidrogênio com o radical de carbono de álcoois de cadeia simples resultam na abstração do átomo de hidrogênio da hidroxila (POPOV e col., 2010), reduzindo a quantidade de ERO presente nas células. O uso de etanol demonstra que os parâmetros estudados apresentam inversão da resposta celular frente à radiação UV, principalmente àquelas mediadas por ERO, comprometendo os efeitos da radiação UV.

6. CONCLUSÕES FINAIS

A utilização de células HaCaT para estudar os efeitos lesivos da radiação UVA e UVB apresenta vantagens promissoras pois HaCaT preservam a maioria das características funcionais de queratinócitos primários. Contudo, conhecer as suas limitações, como mutação no gene *TP53*, ativação anormal de NF- κ B e a ausência de p16 torna-se necessária para direcionar os estudos a mecanismos apropriados induzidos pela radiação UV. Nossos resultados mostram que ambas as radiações UVA e UVB conduzem HaCaT à morte por apoptose e não à parada de ciclo e reparação celular. Alterações em mediadores inflamatórios também foram observados em HaCaT exposto a radiação UV, como aumento na liberação de IL-6, TNF- α e COX-2. Parâmetros como a perda da regulação hídrica da célula, a formação de ERO e marcação de danos de DNA do tipo CPD também são parâmetros moleculares que se encontram alterados em HaCaT exposto à radiação UV.

Fibroblastos apresentam uma maior resistência à morte promovida pela radiação UV quando comparado aos queratinócitos. Nossos resultados demonstram que FHPD expostos à radiação UVA são conduzidos a parada de ciclo, enquanto que a radiação UVB promove um efeito que possivelmente antecede a senescência. Em cultura, apenas aumento na liberação de IL-6 pode ser detectada após a radiação UVA. A marcação de danos de DNA como 8-oxo-dG também foram detectadas, mostrando que a principal formação de dano ao DNA em FHPD após a radiação UVA é devido à formação de ERO.

O ACG apresentou melhor atividade fotoquimioprotetora perante ambas as radiações UVA e UVB, permitindo recuperar a viabilidade de HaCaT e FHPD. Além disso, o ACG possibilita a reparação da regulação hídrica em HaCaT exposto a ambas radiações, inibindo a liberação de MMP e a produção de COX-2. Em FHPD o ACG inibe a parada de ciclo após a radiação UVA e auxilia na remoção de 8-oxo-dG, apresentando papel na prevenção da formação de danos oxidativos no DNA.

O AR apresentou atividade fotoquimioprotetora após a radiação UVA, modulando a viabilidade de HaCaT e FHPD, reparando a regulação hídrica, reduzindo a liberação de MMP-1, 2 e 9, a produção de COX-2 em HaCaT e redução na formação de 8-oxo-dG em FHPD.

O AC foi o composto que apresentou menor capacidade fotoquimioprotetora nos parâmetros estudados, contudo ainda assim foi capaz de reverter a viabilidade e reduzir a liberação de MMP-2 e 9 em HaCaT após a radiação UVB. Após a radiação UVA o

tratamento com AC foi capaz de reduzir a produção de ERO em HaCaT e reduzir a formação de 8-oxo-dG em FHPD.

O etanol não se mostrou como um bom solvente para os ensaios de fotoproteção visto que induz a inversão da resposta celular aos parâmetros estudados frente à radiação UV, principalmente àquelas mediadas por ERO. Sendo assim, compostos solubilizados em etanol podem ter a avaliação da eficácia fotoprotetora comprometida, podendo esta ser uma das causas da menor atividade fotoprotetora do composto AC visto no estudo.

A avaliação do potencial fotoprotetor *in vitro* por espectrofotometria de reflectância demonstrou que nenhum dos compostos nas concentrações empregadas apresentou FPS igual ou superior a 6, valor mínimo segundo a ANVISA para um produto ser considerado um fotoprotetor solar.

Os resultados indicam que o modelo de cultura celular proposto foi capaz de discriminar a atividade fotoquimioprotetora UVA e UVB. Além disto, foi possível demonstrar que os compostos antioxidantes se comportam de maneira distinta enquanto fotoquimioprotetores sugerindo que misturas destes compostos podem ser promissoras como fotoquimioprotetores visando um amplo espectro de ação.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHANTA, G.; HUANG, P. Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents. **Cancer Res**, 64, 6233–6239, 2004.
- AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Botanical antioxidants for chemoprevention of photoCarcinogenesis. **Front Biosci**, 7, 784–792, 2002.
- AFAQ, F.; SYED, D.N.; MALIK, A.; HADI, N.; SARFARAZ, S.; KWEON, M.H.; KHAN, N.; ZAID, M.A.; MUKHTAR, H. Delphinidin, an Anthocyanidin in Pigmented Fruits and Vegetables, Protects Human HaCaT Keratinocytes and Mouse Skin Against UVB-Mediated Oxidative Stress and Apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, 127, 222–232, 2007.
- AGAR, N.S.; HALLIDAY, G.M.; BARNETSON, R.S.C. Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A role for UVA in human skin Carcinogenesis. **PNAS**, 101, 4954–4959, 2004.
- AGARWAL, R.; KATIYAR, S.K.; KHAN, S.G.; MUKHTAR, H. Protection against ultraviolet B radiation-induced effects in the skin of SKH-1 hairless mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea. **Photochem Photobiol**, 58, 695–700, 1993.
- ALMEIDA, A.A.; FARAH, A.; SILVA, D.A.; NUNAN, E.A.; GLORIA, M.B. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. **J Agric Food Chem**, 54, 8738–43, 2006.
- AL-SEREITI, M.R.; ABU-AMER, K.M.; SENA, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian J Exp Biol**, 37, 124–131, 1999.
- AN, L.; DONG, G.O.; GAO, Q.; ZHANG, Y.; HU, L.W.; LI, J.H.; LIU, Y. Effects of UVA on TNF- α , IL-1 β , and IL-10 expression levels in human keratinocytes and intervention studies with an antioxidant and a JNK inhibitor. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, 26, 28–35, 2010.
- AN, L.; DONG, G.Q.; GAO, Q.; ZHANG, Y.; HU, L.W.; LI, J.H.; LIU, Y. Effects of UVA on TNF- α , IL-1 β , and IL-10 expression levels in human keratinocytes and intervention studies with an antioxidant and a JNK inhibitor. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, 26, 1, 28–35, 2010.
- ANON. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (Text with EEA relevance). **Official Journal of the European Union**, L66, 26–35; 2003.
- ANVISA. Resolução - RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012. (Acessado em 06 de janeiro de 2015) <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e15afe804c58f17fb8f0f8dc39d59d3e/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+N%C2%BA+30,+de+1%C2%BA+de+Junho+de+2012.pdf?MOD=AJPERES>
- ASSEFA, Z.; GARMYN, M.; BOUILLON, R.; MERLEVEDE, W.; VANDENHEEDE, J.R.; AGOSTINIS, P. Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, 108, 886–891, 1997.
- ASSEFA, Z.; LAETHEM, A.V.; GARMYN, M.; AGOSTINIS, P. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: On the role of cytosolic factors. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1755, 90 – 106, 2005.
- ATHAR M, AN KP; MOREL, K.D.; KIM, A.L.; ASZTERBAUM, M.; LONGLEY, J.; EPSTEIN JR, E.H.; BICKERS, D.R. Ultraviolet B (UVB)-induced COX-2 expression in murine skin: An immunohistochemical study. **Biochem Biophys Res Comm**, 280, 1042–1047, 2001.
- BABICH, H.; VISIOLI, F. In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. **II Farmaco**, 58, 403 – 407, 2003.
- BACHELOR, M.A.; BOWDEN, G.T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. **Seminars in Cancer biology**, 14, 2, 131–138; 2004.
- BALOGH, A.; PARAGH, J.R.G.; JUHASZ, A.; KOBLING, T.; TOROCSIK, D.; MIKO, E.; VARGA, V.; EMRI, G.; HORKAY, I.; SCHOLTZ, B.; REMENYIK, E. Reference genes for quantitative real time PCR in UVB irradiated keratinocytes. **J. Photochem. Photobiol. B**, 93, 133–139, 2008.
- BANDYOPADHYAY, G.; BISWAS, T.; ROY, K.C.;MANDAL, S.; MANDAL, C.; PAL, B.C.; BHATTACHARYA, S.; RASCHIT, S.; BHATTACHARYA, D.K.;CHAUDHURI, U.; KONAR, A.; BANDYOPADHYAY, S. Chlorogenic acid inhibits Bcr-Abl tyrosine kinase and triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in chronicmyelogenous leukemic cells. **Blood**, 104, 2514–2522, 2004.
- BARENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Letters**, 24, 119–124, 1985.

- BASHIR, M.M.; SHARMA, M.R.; WERTH, V.P. UVB and Proinflammatory Cytokines Synergistically Activate TNF- α Production in Keratinocytes through Enhanced Gene Transcription. **Journal of Investigative Dermatology**, 129, 994–1001, 2009.
- BASSIL, D.; MAKRI, D.P.; KEFALAS, P. Oxidation of caffeic acid in the presence of l-cysteine: isolation of 2-S-cysteinylcaffeic acid and evaluation of its antioxidant properties. **Food Res Int**, 38, 395–402, 2005.
- BECHETOILLE N¹, DEZUTTER-DAMBUYANT C, DAMOUR O, ANDRÉ V, ORLY I, PERRIER E. Effects of solar ultraviolet radiation on engineered human skin equivalent containing both Langerhans cells and dermal dendritic cells. **Tissue Eng**, 13, 11, 2667–2679, 2007.
- BELKAID, A.; CURRIE, J.C.; DESGAGNÉS, J.; ANNABI, B. The chemopreventive proprieties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. **Cancer Cell Int**, 27, 6, 7, doi:10.1186/1475-2867-6-7, 2006.
- BERNERD, F.; ASSELINEAU, D. An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection in vitro. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 58, 5, 2, S155–S159, 2008.
- BERNERD, F.; ASSELINEAU, D. UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. **Cell death and Differentiation**, 5, 9, 792–802, 1998.
- BERNERD, F.; VIOUX, C.; ASSELINEAU, D. Evaluation of the Protective Effect of Sunscreens on In Vitro Reconstructed Human Skin Exposed to UVB or UVA Irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, 71, 3, 314–320, 2000.
- BERNERD, F.; VIOUX, C.; LEJEUNE, F.; ASSELINEAU, D. The sun protection factor (SPF) inadequately defines broad spectrum photoprotection: demonstration using skin reconstructed in vitro exposed to UVA, UVB or UV-solar simulated radiation. **Eur J Dermatol**, 13, 3, 242–249, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal Biochem**, 72, 248–254, 1976.
- BRENNEISEN, P.; SIES, H.; SCHARFETTER-KOCHANKE, K. Ultraviolet-B Irradiation and Matrix Metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. **Ann NY Acad Sci**, 973, 31–43, 2002.
- BRENNER, M.; DEGITZ, K.; BESCH, R.; BERKING, C. Differential expression of melanoma-associated growth factors in keratinocytes and fibroblasts by ultraviolet A and ultraviolet B radiation. **Br J Dermatol**, 153, 733–9, 2005.
- BUCKMAN, S.Y.; GRESHAM, A.; HALE, P.; HRUZA, G.; ANAST, J.; MASFERRER, J.; PENTLAND, A.P. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. **Carcinogenesis**, 19, 723 – 729, 1998.
- CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. **Acc. Chem. Res**, 41, 1075–1083, 2008.
- CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.L.; Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 711, 1–2, 3–12, 2011.
- CAO, C.; SUN, Y.; HEALEY, S.; BI, Z.; HU, G.; WANS, KOUTTAB, N.; CHU, W.; WAN, Y. EGFR-mediated expression of aquaporin-3 is involved in human skin fibroblast migration. **Biochem J**, 400, 225–234, 2006.
- CAO, C.; WAN, S.; JIANG, O.; AMARAL, A.; LU, S.; HU, G.; BI, Z.; KOUTTAB, N.; CHU, W.; WAN, Y. All-Trans Retinoic Acid Attenuates Ultraviolet Radiation-Induced Down- Regulation of Aquaporin-3 and Water Permeability in Human Keratinocytes. **J Cell Physiol**, 215, 506–16, 2008.
- CATALFO, A.; SCIFO, C.; STELLA, S.; BELVEDERE, A.; RENIS, M.; DE GUIDI, G. Rifloxacin induced photosensitization in bio-models of increasing complexity. **Photochem Photobiol Sci**, 4, 304–314, 2005.
- CAZZALINI, O.; SCOVASSI, A.I.; SAVIO, M.; STIVALA, L.A.; PROSPERI, E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. **Mutation Research/Review in Mutation Research**, 704, 12–20, 2010.
- CHAINIAUX, F.; MAGALHÃES, J.P.; ALIAERS, F.; REMACLE, J.; TOUSSAINT, O. UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. **Int J Biochem Cell Biol**, 34, 11, 1331–1339, 2002.
- CHAITANYA, G.V.; ALEXANDER, J.S.; BABU, P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Communication and Signaling**, 8, 31, doi: 10.1186/1478-811X-8-31, 2010.
- CHANG, H.Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol Mol Biol Rev**, 64, 821–46, 2000.
- CHARRIER-SAVOURNIN, F.B.; CHÂTEAU, M.T.; GIRE, V.; SEDIVY, J.; PIETTE, J.; DULIC, V. p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. **Mol. Biol. Cell**, 15, 3965–3976, 2004.

- CHATURVEDI, V.; QIN, J.Z.; DENNING, M.F.; CHOUBEY, D.; DIAZ, M.O.; NICKOLOFF, B.J. Abnormal NF- κ B signaling pathway with enhanced susceptibility to apoptosis in immortalized keratinocytes **Journal of Dermatological Science**, 26, 67–78, 2001.
- CHATURVEDI, V.; QUIN, J.Z.; DENNING, M.F.; CHOUBEY, D.; DIAZ, M.O.; NICKOLOFF, B.J. Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. **J Biol Chem**, 274, 33, 23358–67; 1999.
- CHEN, J.H.; HO, C.T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. **J Agric Food Chem**, 45, 2374–2378, 1997.
- CHEN, W.; TANG, Q.; GONZOLEWS, M.S.; BOWDEN, G.T. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. **Oncogene**, 20, 3921–3926, 2001.
- CHOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M. Interest of ferulic acid ethyl ester in photoprotective creams: Measure of efficacy by in vitro method. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, 22, 16, 1467–1471, 2008.
- CHUNG, H.J.; YOUN, S.H.; KOH, W.S.; EUN, H.C.; CHO, K.H.; PARK, K.C.; YOUN, J.I. Ultraviolet B Irradiation-enhanced interleukin (IL)-6 production and mRNA expression are mediated by IL-1 α in cultured human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, 106, 715–720, 1996.
- CHUNG, J.H.; SEO, J.Y.; CHOI, H.R.; LEE, M.K.; YOUN, C.S.; RHIE, G.; CHO, K.H.; KIM, K.H.; PARK, K.C.; EUN, H.C. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, 117, 1218–1224; 2001.
- CIMINO, F.; CRISTANI, M.; SAIJA, A.; BONINA, F.P.; VIRGILI, F. Protective effects of a red orange extract on UVB-induced damage in human keratinocytes. **BioFactors**, 30, 129–138, 2007.
- CLYDESDALE, G.J.; DANDIE, G.W.; MULLER, H.K. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. **Immunol Cell Biol**, 79, 547–568, 2001.
- COLIPA. In Vitro Method For The Determination Of The Uva Protection Factor And “Critical Wavelength” Values Of Sunscreen Products. Guideline March, 2011; <http://www.colipa.com>.
- COOPER, K.D.; OBERHELMAN, L.; HAMILTON, T.A.; BAADSGAARD, O.; TERHUNE, M.; LEVEE, G.; ANDERSON, T.; KOREN, H. UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR_e epidermal macrophage induction, and Langerhans cell depletion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 89: 8497–8501, 1992.
- CORRÊA, M.P.; CEBALLOS, J.C. Solar Ultraviolet Radiation Measurements in One of the Most Populous Cities of the World: Aspects Related to Skin Cancer Cases and Vitamin D Availability. **Photochemistry and Photobiology**, 86, 438–444, 2010.
- CORRÊA, T.C.S.; MASSARO, R.R.; BROHEM, C.A.; TABOGA, S.R.; LAMERS, M.L.; SANTOS, M.F.; MARIA-ENGLER, S.S. RECK-Mediated Inhibition of Glioma Migration and Invasion. **Journal of Cellular Biochemistry**, 110, 52–61, 2010.
- CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, 2, 647–66, 2002.
- DANESHIAN, M.; LEIST, M.; HARTUNG, T. The Center for Alternatives to Animal Testing – Europe (CAAT-EU): a Transatlantic Bridge for the Paradigm Shift in Toxicology. **Altex**, 27, 1, 63–69, 2010.
- DE GRUIJL, F.R. PhotoCarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, 15, 316–320, 2002.
- DECKER, A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, 55, 11, 396–398, 1997.
- DESSINIOTI, C.; ANTONIOU, C.; KATSAMBAS, A.; STRATIGOS, A.J. Basal Cell Carcinoma: What’s New Under the Sun. **Photochemistry and Photobiology**, 86, 481–491, 2010.
- DHANALAKSHMI, S.; MALLIKARJUNA, G.U.; SINGH R.P.; AGARWAL, R. Dual efficacy of silibinin in protecting or enhancing ultraviolet B radiation-caused apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes. **Carcinogenesis** (2004) 25 (1): 99–106.
- DIFFEY, B.L.; ROBSON, J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. **Int J Cosmet Sci**, 40, 127–133, 1989.
- DING, H.Y.; CHOU, T.H.; LIANG, Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*. **Food Chemistry**, 123, 2, 254–262, 2010.
- DOMINGUEZ, M.H.; SALES, O.D. Alternative Methods to Animal Testing for Cosmetic Products Evaluation. Capítulo 9, 9.1. Safety Evaluation. [Título] **Analysis of Cosmetic Products**. Salvador A, Chisvert A. Elsevier, Amsterdã, Holanda; pp 447 e 448, 2011.
- DOUKI, T.; REYNAUD-ANGELIN, A.; CADET, J.; SAGE, E. Bipyrimidine Photoproducts Rather than Oxidative Lesions Are the Main Type of DNA Damage Involved in the Genotoxic Effect of Solar UVA Radiation. **Biochemistry**, 42, 9221–9226, 2003.

- DUVAL, C.; SCHMIDT, R.; REGNIER, M.; FACY, V.; ASSELINEAU, D.; BERNERD, F. The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy. **Experimental Dermatology**, 12, 2, 64-70, 2003.
- ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods [3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity assay] ; http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/public_view_doc2.cfm?id=736F27E9E9F7A9D869FB48087878D2497180BB0BC12CB10496CDA74B54630A05A3291B895581F634 (acessado dia 03 de julho de 2010)
- EDREVA, A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 106, 135–146, 2005.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, 2, 3, 161-174, 2002.
- ELMAGEED, Z.Y.A.; GAUR, R.L.; WILLIAMS, M.; ABDRABOH, M.E.; RAO, P.N.; RAJ, M.H.G.; ISMAIL, F.M.; OUHTIT, A. Characterization of Coordinated Immediate Responses by p16^{INK4A} and p53 Pathways in UVB-Irradiated Human Skin Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, 129, 175–183, 2009.
- European Commission—Timetables for the phasing of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive. http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/sec_2004_1210_en.pdf. Accessed 09 Jan 2011
- FACINO, R.M.; CARINI, M.; ALDINI, G.; SAIBENE, L.; PIETTA, P.; MANN, P. Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: A potential use of echinacea extracts in the prevention of skin photodamage. **Planta Med**, 61, 510-514, 1995.
- FAGOT, D.; ASSELINEAU, D.; BERNERD, F. Matrix metalloproteinase-1 production observed after solar-simulated radiation exposure is assumed by dermal fibroblasts but involves a paracrine activation through epidermal keratinocytes. **Photochem Photobiol**, 79, 499–505, 2004.
- FENG, R.; LU, Y.; BOWMAN, L.L.; QIAN, Y.; CASTRANOVA, V.; DING, M. Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. **J Biol Chem**, 280, 27888–27895, 2005.
- FISHER, G.J.; DATTA, S.; TALWAR, H.S.; WANG, Z.Q.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. **Nature**, 379, 335–339, 1996.
- FISHER, G.J.; VARANI, J.; VOORHEES, J.J. Looking Older - Fibroblast Collapse and Therapeutic Implications. **Arch Dermatol**, 144, 666-672, 2008.
- FISHER, G.J.; WANG, Z.Q.; DATTA, S.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **New England Journal of Medicine**, 337, 1419–1428, 1997.
- FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; AESCHBACH, R.; PRIOR, E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. **J Agric Food Chem**, 44, 131-135, 1996.
- FREEMAN, S.E.; GANGE, R.W.; SUTHERLAND, J.C.; MATZINGER, E.A.; SUTHERLAND, B.M. Production of pyrimidine dimers in DNA of human skin exposed in situ to UVA radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, 88, 430–433, 1987.
- FUCHS, J. Potential and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radicals Biology & Medicine**, 25:848-73; 1998.
- FUJIMOTO, A.; SAKANASHI, Y.; MATSUI, H.; OYAMA, T.; NISHIMURA, Y.; MASUDA, T.; OYAMA, Y. Cytometric analysis of cytotoxicity of polyphenols and related phenolics to rat thymocytes: potent cytotoxicity of resveratrol to normal cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 104, 455–462, 2009.
- GAROLI, D.; PELIZZO, M.G.; NICOLOSI, P.; PESERICO, A.; TONIN, E.; ALAIBAC, M. Effectiveness of different substrate materials for in vitro sunscreen tests. **Journal of Dermatological Science**, 56: 89–98, 2009.
- GASPAR, L.R.; THARMANN, J.; CAMPOS, P.M.B.G.M.; LIEBSCH, M. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. **Toxicology in Vitro**, 27, 1, 418–425, 2013.
- GENTILE, M.; LATONEN, L.; LAIHO, M. Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses. **Nucl. Acids Res**, 31, 16, 4779-4790, 2003.
- GIBSON, B.A.; KRAUS, W.L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 13, 411-424, 2012.

- GILLIS, L.D.; LEIDAL, A.M.; HILL, R.; LEE, P.W.K. p21waf1/cip1 mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage. **Cell Cycle**, 8, 253–256, 2009.
- GIUS, D.; BOTERO, A.; SHAH, S.; CURRY, H.A. Intracellular oxidation:reduction status in the regulation of transcription factors NF-kB and AP-1. **Toxicology Letters**, 106, 93–106, 1999.
- GRANADO-SERRANO, A.B.; MARTIÁN, M.A.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; GOYA, L.; BRAVO, L.; RAMOS, S. Molecular Mechanisms of (-)-Epicatechin and Chlorogenic Acid on the Regulation of the Apoptotic and Survival/Proliferation Pathways in a Human Hepatoma Cell Line. **J. Agric. Food Chem**, 55, 2020–2027, 2007.
- GREINERT, R.; BOGUHN, O.; HARDER, D.; BREITBART, E.W.; MITCHELL, D.L.; VOLKMER, B. The Dose Dependence of Cyclobutane Dimer Induction and Repair inUVB-irradiated Human Keratinocytes. **Photochemistry and Photobiology**, 72, 5, 701–708, 2000.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicol**, 217, 213–220, 2006.
- HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 476, 107–112, 2008.
- HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, 16, 6, 845–850, 1994.
- HARA, M.; MA, T.; VERKMAN, A.S. Selectively Reduced Glycerol in Skin of Aquaporin-3-deficient Mice May Account for Impaired Skin Hydration, Elasticity, and Barrier Recovery. **J Biol Chem**, 277, 46616–46621, 2002.
- HARA, M.; VERKMAN, A.S. Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity and barrier function in aquaporin-3-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100, 7360–7365, 2003.
- HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A.S. Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. **Biol Cell**, 97, 479–86, 2005.
- HARTUNG, T., BREMER S, CASATI S, COECKE S, CORVI R, FORTANER S, GRIBALDO L, HALDER M, ROI AJ, PRIETO P, SABBIONI E, WORTH A, ZUANG V. ECVAM's Response to the Changing Political Environment for Alternatives: Consequences of the European Union Chemicals and Cosmetics Policies. **ATLA** 31, 473–481, 2003.
- HAYDEN, M.S.; WEST, A.P.; GHOSH, S. NF-kappaB and the immune response. **Oncogene**, 25, 6758–80, 2006.
- HEENEN, M.; GIACOMONI, P.U.; GOLSTEIN, P. Individual variations in the correlation between erythral threshold, UV-induced DNA damage and sun-burn cell formation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 63, 84–87, 2001.
- HENSELEIT, U.; ZHANG, J.; WANNER, R.; HAASE, I.; KOLDE, G.; ROSENBACH, T. Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, 109, 722–727, 1997.
- HEO, M.Y.; KIM, S.H.; YANG, H.E.; LEE, S.H.; JO, B.K.; KIM, H.P. Protection against ultraviolet B- and C-induced DNA damage and skin Carcinogenesis by the flowers of *Prunus persica* extract. **Mutation Research**, 496, 47–59, 2001.
- HORIE, I.; MAEDA, M.; YOKOYAMA, S.; HISATSUNE, A.; KATSUKI, H.; MIYATA, T.; ISOHAMA, Y. Tumor necrosis factor- α decreases aquaporin-3 expression in DJM-1 keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, 387, 3, 564–568, 2009.
- HSIEH, C.L.; YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activities of phenolic acids on Ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. **J Agric Food Chem**, 53, 6151–6155, 2005.
- HUANG, C.C.; FANG, J.Y.; CHIANG, W.B.W.H.; WEI, J.Y.; HUNG, C.F. Protective effects of (-)-epicatechin-3-gallate on UVA-induced damage in HaCaT keratinocytes. **Arch Dermatol Res**, 296, 473–481, 2005.
- HUANG, M.T.; SMART, R.C.; WONG, C.Q.; CONNEY, A.H. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Res**, 48, 5941–6, 1988.
- IMS.inc (EUA) <http://www.ims-usa.com/> Acessado em Dezembro de 2012
- INOMATA, S.; MATSUNAGA, Y.; AMANO, S.; TAKADA, K.; KOBAYASHI, K.; TSUNENAGA, M.; NISHIYAMA, T.; KOHNO, Y.; FUKUDA, M. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, 120, 128–134, 2003.
- IODANOV, M.S.; PRIBNOW, D.; MAGUN, J.L.; DINH, T.H.; PEARSON, J.A.; MAGUN, B.E. Ultraviolet radiation triggers the ribotoxic stress response in mammalian cells. **J Biol Chem**, 273, 15794–803, 1998.
- IRNIA, F.; SCHNEIDER, E.; BETTICHER, D.C.; BORNER, M.M. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. **Cell Death Differ** 9, 905–914, 2002.

- ISOHERRANEN, K.; PUNNONEN, K.; JANSEN, C.; UOTILA, P. Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *British Journal of Dermatology*, 140, 6, 1017-1022, 1999.
- Ji, C.; CAO, C.; LU, S.; KIVLIN, R.; AMARAL, A.; KOUTTAB, N.; YANG, H.; CHU, W.; BI, Z.; DI, W.; WAN, Y. Curcumin attenuates EGF-induced AQP3 up-regulation and cell migration in human ovarian cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62, 857-865, 2008.
- JIANG, Y.J.; KIM, P.; LU, Y.F.; FEINGOLD, K.R. PPARgamma activators stimulate aquaporin 3 expression in keratinocytes/epidermis. *Exp Dermatol*, 20, 7, 595-599, 2011.
- JIN, U.H.; LEE, J.Y.; KANG, S.K.; KIM, J.K.; PARK, W.H.; KIM, J.G.; MOON, S.K.; KIM, C.H. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci*, 77, 2760-2769, 2005.
- KANG, N.J.; LEE, K.W.; SHIN, B.J.; JUNG, S.K.; HWANG, M.K.; BODE, A.M.; HEO, Y.S.; LEE, H.J.; DONG, Z. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*, 30, 321-330, 2009.
- KAPPEL, U.P.; LUO, D.; POTTER, M.; SCHULMEISTER, K.; RÜNGER, T.M. Short- and Long-Wave UV Light (UVB and UVA) Induce Similar Mutations in Human Skin Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 667-675, 2006.
- KATYAR, S.K.; ELMETS, C.A. Green tea antioxidants and skin photoprotection. *Int J Oncol*, 18, 1307-13, 2001.
- KATO, Y.; YAMASHITA, T.; ISHIKAWA, M. Relationship between expression of matrix-metalloproteinase-2 and matrix-metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. *Oncology Reports*, 9, 3, 565-569, 2002.
- KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; BENDOÁ, H.; KANDÁROVÁ, H.; WEIDENHOFFER, Z.; KOLÁŘOVÁ, H.; LIEBSCH, M. Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Toxicology in Vitro*, 21, 1298-1303, 2007.
- KERKELA, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol*, 12, 109-125, 2003.
- KHAN, S.A.; PRIYAMVADA, S.; KHAN, W.; KHAN, S.; FAROOQ, N.; YUSUFI, A.N.K. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacological Research*, 60, 382-391, 2009.
- KIELBASSA, C.; ROZA, L.; EPE, B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 18, 811-816, 1997.
- KOMAROVA, E.A.; KRIVOKRYSENKO, V.; WANG, K.; NEZNANOV, N.; CHERNOV, M.V.; KOMAROV, P.G.; BRENNAN, M.L.; GOLOVKINA, T.V.; ROKHLIN, O.W.; KUPRASH, D.V.; NEDOSPASOV, S.A.; HAZEN, S.L.; FEINSTEIN, E.; GUDKOV, A.V. p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *FASEB Journal*, 19, 1030-1032, 2005.
- KONDO, S. The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium proceedings*, 4, 2, 177-83, 1999.
- KONDO, S.; KONO, T.; SAUDER, D.N.; MCKENZIE, R.C. IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *Journal of Investigative Dermatology*, 101, 690-694, 1993.
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. Antioxidant activity of polyphenolics in diets rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1335, 335-42, 1997.
- KONO, Y.; KASHINE, S.; YONEYAMA, T.; SAKAMOTO, Y.; MATSUI, Y.; SHIBATA, H. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62, 22-7, 1998.
- KRIPKE, M.L. Ultraviolet radiation and immunology: something new under the sun--presidential address. *Cancer Res.*, 54, 23, 6102-6105, 1994.
- KVAM, E.; TYRRELL, R.M. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation, *Carcinogenesis*, 18, 2379-2384, 1997.
- LAMBERT, J.D.; ELIAS, R.J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 1, 65-72, 2010.
- LANE, D.P. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-16, 1992.
- LARROSA, M.; LODOVICI, M.; MORBIDELLI, L.; DOLARA, P. Hydrocaffeic and p-coumaric acids, natural phenolic compounds, inhibit UV-B damage in WKD human conjunctival cells in vitro and rabbit eye in vivo. *Free Rad Res*, 42, 10, 903-910, 2008.

- LEE, B.C.; LEE, S.Y.; LEE, H.J.; SIM, G.S.; KIM, J.H.; KIM, J.H.; CHO, Y.H.; LEE, D.H.; PYO, H.B.; CHOE, T.B.; MOON, D.C.; YUN, Y.P.; HONG, J.T. Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*. **Arch Pharm Res**, 30, 1293-301, 2007.
- LEE, C.H.; WU, S.B.; HONG, C.H.; YU, H.S.; WEI, Y.H. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. **Int. J. Mol. Sci.** 14, 6414-6435, 2013.
- LEE, J.; KIM, Y.S.; PARK, D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. **Biochem Pharmacol**, 74, 960-968, 2007.
- LEE, P.L.; VAN WEELDEN, H.; BRUIJNZEED, P.L.B. Neutrophil Infiltration in Normal Human Skin After Exposure to Different Ultraviolet Radiation Sources. **Photochemistry and Photobiology**, 84, 1528–1534, 2008.
- LEHMAN, T.A.; MODALLI, R.; BOUKAMP, P.; STANEK, J.; BENNETT, W.P.; WELSH, J.A.; METCALF, R.A.; STAMPFER, M.R.; FUSENING, N.; ROGAN, E.M.; HARRIS, C.C. P53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. **Carcinogenesis**, 14, 833-839, 1993.
- LEMBO, S.; BALATO, A.; DI CAPRIO, R.; CIRILLO, T.; GIANNINI, V.; GASPARRI, F.; MONFRECOLA, G. The Modulatory Effect of Ellagic Acid and Rosmarinic Acid on Ultraviolet-B-Induced Cytokine/Chemokine Gene Expression in Skin Keratinocyte (HaCaT) Cells. **BioMed Research International**, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/346793>; 2014.
- LEUNG, W.K.; TO, K.F.; NG, Y.P.; LEE, T.L.; LAU, J.Y.W.; CHAN, F.K.L.; NG, E.K.W.; CHUNG, S.C.S.; SUNG, J.J.Y. Association between ciclooxigenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. **Br J Cancer**, 84, 3, 335-339, 2001.
- LEY, R.D.; FOURTANIER, A. UVA1-induced edema and pyrimidine dimers in murine skin. **Photochem Photobiol** 72, 485–487, 2000.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. **Methods**, 25, 4, 402-408, 2001.
- LOPEZ-TORRES, M.; THIELE, J.J.; SHINDO, Y.; HAN, D.; PACKER, L. Topical application of α -tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin. **Br J Dermatol**, 138, 207-215, 1998.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.F.; RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J Biol Chem**, 193, 265-275, 1951.
- LU, Z.; NIE, G.; BELTON, P.S.; TANG, H.; ZHAO, B. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochem Int**, 48, 263–274, 2006.
- MA, Q.Y.; WILLIAMSON, K.E.; ROWLANDS, B.J. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with dimethylhydrazine induced Carcinogenesis. **World J Gastroenterol**, 8, 847–52, 2002.
- MARINOVA, E.M.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. **Food Chem**, 114, 1498–1502, 2009.
- MARIONNET, C.; GREYER-BECK, S.; SEITÉ, S.; MARINI, A.; JAENICKE, T.; LEJEUNE, F.; BASTIEN, F.; ROUGIER, A.; BERNERD, F.; KRUTMANN, J. A broad-spectrum sunscreen prevents UVA radiation-induced gene expression in reconstructed skin in vitro and in human skin in vivo. **Experimental Dermatology**, 20, 477–482, 2011.
- MARROT, L.; BELAÏDI, J.P.; JONES, C.; PEREZ, P.; RIOU, L.; SARASIN, A.; MEUNIER, J.R. Molecular Responses to Photogenotoxic Stress Induced by the Antibiotic Lomefoxacin in Human Skin Cells: From DNA Damage to Apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, 121, 596-606, 2003.
- MARTI-MESTRES, G.; MESTRES, J.P.; BRES, J.; MARTIN, S.; RAMOS, J.; VIAN, L. The “in vitro” percutaneous penetration of three antioxidant compounds (Note). **International Journal of Pharmaceutics**, 331, 139–144, 2007.
- MATSUNAGA, T.; HIEDA, K.; NIKAIDO, O. Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6–4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm. **Photochem Photobiol**, 54, 403–10, 1991.
- MATSUSAKA, T.; FUGIKAWA, K.; NISHIO, Y.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. Transcription factors NF-IL6 and NF-KB synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90, 10193-10197, 1993.
- MEERAN, S.M.; KATIYAR, S.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Silymarin inhibits UV radiation-induced immunosuppression through augmentation of interleukin-12 in mice. **Mol Cancer Ther**, 5, 7, 1660–8, 2006.
- MEEWES, C.; BRENNEISEN, P.; WENK, J.; KUHR, L.; MA, W.; ALIKOSKI, J.; POSWIG, A.; KRIEG, T.; SCHARFFETER-KOCHANNEK, K. Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, 30, 3, 238–247, 2001.

- MÉPLAN, C.; RICHARD, M.J.; HAINAUT, P. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. **Biochem Pharmacol**, 59, 25–33, 2000.
- MILHAS, D.; CUVILLIER, O.; THERVILLE, N.; CLAVE, P.; THOMSEN, M.; LEVADE, T.; BENOIST, H.; SÉQUI, B. Caspase-10 triggers bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. **J Biol Chem**, 280, 19836–19842, 2005.
- MIN, W.; LIN, X.F.; MIAO, X.; WANG, B.T.; YANG, Z.L.; LUO, D. Inhibitory Effects of Baicalin on Ultraviolet B-Induced Photo-Damage in Keratinocyte Cell Line. **The American Journal of Chinese Medicine**, 36, 4, 745–760, 2008.
- MORTON, L.W.; CACCETTA, R.A.A.; PUDDEY, I.B.; CROFT, K.D. Chemistry and biological effect of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 27, 152–9, 2000.
- MOURET, S.; BAUDOUIN, C.; CHARVERON, M.; FAVIER, A.; CADET, J.; DOUKI, T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. **PNAS**, 103, 13765–13770, 2006.
- MURAKAMI, T.; FUJIMOTO, M.; OHTSUKI, M.; NAKAGAWA, H. Expression profiling of cancer-related genes in human keratinocytes following non-lethal ultraviolet B irradiation. **Journal of Dermatological Science**, 27, 2, 121–129, 2001.
- MURPHY, G.; YOUNG, A.R.; WULF, H.C.; KULMS, D.; SCHWARZ, T. The molecular determinants of sunburn cell Formation. **Exp Dermatol**, 10, 155–160, 2001.
- MURRAY, J.C.; BURCH, J.Á.; STREILEIN, R.D.; IANNACCHIONE, M.A.; HALL, R.P.; PINNELL, S.R. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. **J Am Acad Dermatol**, 59, 3, 418–425, 2008.
- NAKAKOSHI, M.; MORISHITA, Y.; USUI, K.; OHTSUKI, M.; ISHIBASHI, K. Identification of a keratinocarcinoma cell line expressing AQP3. **Biol Cell**, 98, 95–100, 2006.
- NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. **J Agric Food Chem**, 50, 5735–5741, 2002.
- NAYLOR, E.C.; WATSON, R.E.B.; SHERRATT, M.J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, 69, 3, 249–256, 2011.
- NICHOLS, J. A.; KATTIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Arch Dermatol Res**, 302, 71–83, 2010.
- Nishigori, C. Cellular aspects of photoCarcinogenesis. **Photochem Photobiol Sci**, 5, 208–214, 2006.
- ONOUE, S.; KOBAYAXHI, T.; TAKEMOTO, Y.; SASAKI, I.; SHINKAI, H. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B radiation. **J Dermatol Sci**, 33, 105–111, 2003.
- OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P.E.; DUBOIS, B.; NELISSEN, I.; VAN COILLIE, E.; MASURE, S.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. **J Leukoc Biol**, 69, 851–985, 2001.
- OUHTIT, A.; GORNY, A.; MULLER, H.K.; HILL, L.L.; OWEN-SCHAUB, L.; ANANTHASWAMY, H.N. Loss of Fas-ligand expression in mouse keratinocytes during UV Carcinogenesis. **Am J Pathol**, 156, 201–207, 2000.
- PALMER, D.M.; KITCHIN, J.S. Oxidative damage, skin ageing, antioxidants and a novel antioxidant rating system. **J Drug Dermatol**, 9, 1, 11–15, 2010.
- PARRISH, J.A.; ANDERSON, R.R.; URBACH, F.; PITTS, D. UV-A: Biological effects of Ultraviolet radiation with emphasis on human responses to long wave ultraviolet. **Journal of the Royal Society of Medicine**, 72, 8, 630, 1978.
- PATRIDGE, J.J.; MADSEN, M.A.; ARDI, V.C.; PAPAGIANNAKOPOULOS, T.; KUPRIYANOVA, T.A.; QUIGLEY, J.P.; DERYUGINA, E.I. Functional analysis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases differentially expressed by variant of human HT1080 fibrosarcoma exhibiting high and low levels of intravasation and metastasis. **J Biol Chem**, 282, 49, 35964–35977, 2007.
- PETIT-FRERE, C.; CLINGEN, P.H.; GREWE, M.; KRUTMANN, J.; ROZA, L.; ARLETT, C.F.; GREEN, M.H. Induction of interleukin-6 production by ultraviolet radiation in normal human keratinocytes and in a human keratinocyte cell line is mediated by DNA damage. **Journal of Investigative Dermatology**, 111, pp. 354–359, 1998.
- PFEIFER, G.P.; YOU, Y.H.; BESARATINIA, A. Mutations induced by ultraviolet light. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 571, 1–2, 19–31, 2005.
- PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. **Int J Cosmetic Sci**, 27, 17–34, 2005.

- PISARCHIK, A.; WORTSMAN, J.; SLOMINSKI, A. A novel microarray to evaluate stress-related genes in skin: effect of ultraviolet light radiation. **Gene**, 27, 341, 199-207, 2004.
- PLUEMSAMRAN, T.; ONKOKSOONG, T.; PANICH, U. Caffeic acid and ferulic acid inhibit UVA-induced matrix metalloproteinase-1 through regulation of antioxidant defense system in keratinocyte HaCaT cells. **Photochem Photobiol**, 88, 961–968, 2012.
- PONTEN, F.; BERNE, B.; REN, Z.P.; NISTER, M.; PONTEN, J. Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. **Journal of Investigative Dermatology**, 105, 402-6, 1995.
- POPOV, E.; MAMETKULIYEV, M.; SANTORO, D.; LIBERTI, L.; RANTA, J. Kinetics of UV-H2O2 Advanced Alcohols: The Role of Carbon Centered Radicals. **Environ. Sci. Technol**, 44, 7827–7832, 2010.
- POQUET, L.; CLIFFORD, M.N.; WILLIAMSON, G. Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. **Arch Biochem Biophys**, 476, 2, 196-204, 2008.
- PORTER, A.G.; JÄNICKE, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death Differ**, 6, 99-104, 1999.
- POTAPOVICH, A.I.; KOSTYUK, V.A.; KOSTYUK, T.V.; DE LUCA, C.; KORKINA, L.G. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. **Inflamm. Res.** 62, 773–780, 2013.
- PRASAD, N.R.; JEYANTHIMALA, K.; RAMACHANDRAN, S. Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. **J Photochem Photobiol B: Biology**, 95, 196–203, 2009.
- PSOTOVA, J.; SVOBODOVA, A.; KOLAROVA, H.; WALTEROVA, D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. **J Photochem Photobiol B: Biology** 84, 167–174, 2006.
- QIN, X.J.; LIU, W.; LI, Y.N.; SUN, X.; HAI, C.X.; HUDSON, L.G.; LIU, K.J. Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibition by Arsenite Promotes the Survival of Cells With Unrepaired DNA Lesions Induced by UV Exposure. **Toxicological Sciences**, 127, 1, 120–129, 2012.
- RAMOS, S.; ALIÄA, M.; BRAVO, L.; GOYA, L. Comparative Effects of Food-Derived Polyphenols on the Viability and Apoptosis of a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). **J Agric Food Chem**, 53, 1271-1280, 2005.
- RANI, J.; WARNER, R.L.; GHARAEI-KERMANI, M.; PHAN, S.H.; KANG, S.; CHUNG, J.H.; WANG, Z.Q.; DATTA, S.C.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Vitamin A Antagonizes Decreased Cell Growth and Elevated Collagen-Degrading Matrix Metalloproteinases and Stimulates Collagen Accumulation in Naturally Aged Human Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, 114, 480–486, 2000.
- RICE-EVANS, C.; SPENCER, J.P.; SCHROETER, H.; RECHNER, A.R. Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, 17, 1-4, 291-310, 2000.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci**, 2, 152-159, 1997.
- RITTIÉ, L.; FISHER, G.J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, 1, 705–720, 2002.
- ROHR, M.; KLETTE, E.; RUPPERT, S.; BIMZCOK, R.; KLEBON, B.; HEINRICH, U.; TRONNIER, H.; JOHNCOCK, W.; PETERS, S.; PFLÜCKER, F.; RUDOLPH, T.; FLÖSSER-MÜLLER, H.; JENNI, K.; KOCKOTT, D.; LADEMAN, J.; HERZOG, B.; BIELFELDT, S.; MENDROK-EDINGER, C.; HANAY, C.; ZASTROW, L. In vitro Sun Protection Factor: Still a Challenge with No Final Answer. **Skin Pharmacol Physiol**, 23, 201–212, 2010.
- ROPKE, C.D.; SILVA, V.V.; KERA, C.Z.; MIRANDA, D.V.; ALMEIDA, R.L.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M. In Vitro and In Vivo Inhibition of Skin Matrix Metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* Root Extract. **Photochemistry and Photobiology**, 82, 439–442, 2006.
- ROSARIO, H.S.; WALDO, S.W.; BECKER, S.A.; SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Pancreatic trypsin increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemiareperfusion in the rat. **Am J Pathol**, 164, 1707–1716, 2004..
- ROUPE G. Skin of the aging human being. *Lakartidningen*, 98:1091–1095; 2001.
- RYU, H.C.; KIM, C.; KIM, J.Y.; CHUNG, J.H.; KIM, J.H. UVB Radiation Induces Apoptosis in Keratinocytes by Activating a Pathway Linked to “BLT2-Reactive Oxygen Species”. **Journal of Investigative Dermatology**, 130, 1095–1106, 2010.
- SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; DE PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *Int J Pharm*, 175:85-94; 1998.
- SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; DE PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **Int J Pharm**, 199, 39–47, 2000.

- SAKURAI, H.; YASUI, H.; YAMADA, Y.; NISHIMURA, H.; SHIGEMOTO, M. Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light: a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection. **Photochem Photobiol Sci**, 4, 715–720, 2005.
- SÁNCHEZ-CAMPILLO, M.; GABALDON, J.A.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL BAÑO, M.J.; ALCARAZ, M.; VICENTE, V.; ALVAREZ, N.; LOZANO, J.A. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. **Food Chem Toxicol**, 47, 386–392, 2009.
- SANDER, C.S.; CHANG, H.; SALZMANN, S.; MULLER, C.S.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S.; ELSNER, P.; THIELE, J.J. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, 118, 618–625, 2002.
- SANDHU, S.K.; SCHELMAN, W.R.; WILDING, G.; MORENO, V.; BAIRD, R.D.; MIRANDA, S.; HYLANDS, L.; RIISNAES, R.; FORSTER, M.; OMLIN, A.; KREISCHER, N.; THWAY, K.; GEVENLEBEN, H.; SUN, L.; LOUGHNEY, J.; CHATTERJEE, M.; TONIATTI, C.; CARPENTER, C.L.; IANNONE, R.; KAYE, S.B.; DE BONO, J.S.; WENHAM, R.M. The poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor niraparib (MK4827) in BRCA mutation carriers and patients with sporadic cancer: a phase 1 dose-escalation trial. **The Lancet Oncology**, 14, 3, 882–892, 2013.
- SCHARFETTER-KOCHANKE, K.; WENK, J.; BRENNEISEN, B.; BLAUDSCHRUN, R.; WLASCHEK, M. Molecular role of reactive oxygen species in photoaging and tumor progression. In: Skin cancer and radiation (Altmeyer, P., Hoffman, K., Stücker, M. eds), pp. 115–127. Springer, Heidelberg, 1997.
- SCHARFETTER-KOCHANKE, K.; BRENNEISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L.; MEEWES, C.; WLASCHEK, M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Exp Gerontol**, 35, 307–16, 2000.
- SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, 3, 6, 1101–1108, 2008.
- SCHOMAGEL, I.J.; SIGURDSSON, V.; NIJHUIS, E.H.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A.; KNOL, E.F. Decreased neutrophil skin infiltration after UVB exposure in patients with polymorphous light eruption. **Journal of Investigative Dermatology**, 123, 202–206, 2004.
- SCHUMANN, R. The Seventh Amendment to the Cosmetics Directive: what does DG Enterprise want from ECVAM? **ATLA**, 30, 2, 213–214, 2002.
- SCHWARTZ, E.; CRUICKSHANK, F.A.; CHRISTENSEN, C.C.; PERLISH, J.S.; LEBWOHL, M. Collagen alterations in chronically sun-damaged human skin. **Photochem Photobiol**, 58, 841–844, 1993.
- SCHWARZ, A.; BHARDWAJ, R.; ARAGANE, Y.; MAHNKE, K.; RIEMANN, H.; METZE, D.; LUGER, T.A.; SCHWARZ, T. Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidences of partial involvement of tumor necrosis factor- α in the formation of sunburn cells. **Journal of Investigative Dermatology**, 104, 922–927, 1995.
- SHAN, S.J.; XIAO, T.; CHEN, J.; GENG, S.L.; LI, C.P.; XU, X.; HONG, Y.; JI, C.; GUO, Y.; WEI, H.; LIU, W.; LI, D.; CHEN, H.D. Kanglaite attenuates UVB-induced down-regulation of aquaporin-3 in cultured human skin keratinocytes. **International Journal Of Molecular Medicine**, 29, 625–629, 2012.
- SHEN, J.; BAO, S.; REEVE, V.E. Modulation of IL-10, IL-12 and INF- γ in the epidermis of Hairless mice by UVA (320–400 nm) and UVB (280–320 nm) radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, 133, 1059–1064, 1999.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia – da planta ao medicamento; Capítulo 23 Flavonóides, p. 522, 6ª edição UFRGS, 1999.
- SITAILO, L.A.; TIBUDAN, S.S.; DENNING, M.F. Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. **J Biol Chem**, 277, 19346–19352, 2002.
- SMITH, M.L.; FORNACE, A.J.Jr. p53-mediated protective responses to UV irradiation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94, 12255–12257, 1997.
- SMITS, V.A.; KLOMPMAKER, R.; VALLENIUS, T.; RIJKSEN, G.; MÄKELA, T.P.; MEDEMA, R.H. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. **J. Biol. Chem.**, 275, 30638–30643, 2000.
- SPRINGSTEEN, A.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K.F. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, 380, 2–3, 155–164, 1999.
- STANFORTH, V.; CHIU, L.T.; YANG, N.S. Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. **Carcinogenesis**, 27, 1803–1811, 2006.
- STEFFENSEN, B.; HAKKINEN, L.; LARJAVA, H. Proteolytic events of wound-healing – coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMP), integrins, and extracellular matrix molecules. **Crit Rev Oral Biol Med**, 12, 373–398, 2001.
- STEINBRENNER, H.; RAMOS, M.C.; STUHLMANN, D.; SIES, H.; BRENNEISEN, P. UVA-mediated downregulation of MMP-2 and MMP-9 in human epidermal keratinocytes. **Biochem Biophys Res Com**, 308, 486–491, 2003.

- SVOBODOVÁ, A.; PSOTOVÁ, J.; WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of uv-induced skin damage: A review. **Biomed Papers**, 147, 2, 137–145, 2003.
- SWALWELL, H.; LATIMER, J.; HAYWOOD, R.M.; BIRCH-MACHIN, M.A. Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 52, 3, 625–634, 2012.
- TALWAR, H.S.; GRIFFITHS, C.E.; FISHER, G.J.; HAMILTON, T.A.; VOORHEES, J.J. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, 105, 285–290, 1995.
- TENNANT, J.R. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. **Transplantation**, 2, 685–694, 1964.
- TERAKI, Y.; SHIOHARA, T. Apoptosis and the skin. **European Journal of Dermatology**, 9, 5, 413–26, 1999.
- TOMAINO, A.; CRISTANI, M.; CIMINO, F.; SPECIALE, A.; TROMBETTA, D.; BONINA, F.; SAIJA, A. In vitro protective effect of a Jacques grapes wine extract on UVB-induced skin damage. **Toxicology in Vitro**, 20, 1395–1402, 2006.
- TRAUTINGER, F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. **Clinical and Experimental Dermatology**, 26, 7, 573–577, 2001.
- TRIPP, C.S.; BLOMME, E.A.; KEVIN, C.S.; HARDY, M.M.; LACELLE, P.; PENTLAND, A.P. Epidermal COX-2 Induction Following Ultraviolet Irradiation: Suggested Mechanism for the Role of COX-2 Inhibition in Photoprotection. **Journal of Investigative Dermatology**, 121, 853–861, 2003.
- TSUJII, M.; DUBOIS, R.N.; Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, 83, 493–501, 1995.
- TSUKAHARA, K.; NAKAGAWA, H.; MORIWAKI, S.; SHINGO, K.; OHUCHI, A.; TAKEMA, Y.; IMOKAWA, G. Ovariectomy is sufficient to accelerate spontaneous skin ageing and to stimulate ultraviolet irradiation-induced photoageing of murine skin. **Br J Dermatol**, 151, 984–994, 2004.
- TYRRELL, R.M. Modulation of gene expression by the oxidative stress generated in human skin cells by UVA radiation and the restoration of redox homeostasis. **Photochem Photobiol Sci**, 11, 1, 135–147, 2012.
- UITTO, J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age related alterations in collagen and elastin. **Dermatol Clin**, 4, 433–446, 1986.
- URBANSKI, A.; SCHWARZ, T.; NEUNER, P.; KRUTMANN, J.; KIRNBAUER, R.; KOCK, A.; LUGER, T.A. Ultraviolet light induces increasing circulating cytokine-6 in human. **Journal of Investigative Dermatology**, 94, 808–811, 1990.
- VALKO, M.; LEIBFRTZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZURA, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39:44–84, 2007.
- VAN KRANEN, H.J.; DE LAAT, A.; VAN DE VEN, J.; WESTER, P.W.; DE VRIES, A.; BERG, R.J.W.; VAN KREIJL, C.F.; DE GRUIJ, F.R. Low Incidence of p53 Mutations in UVA (365-nm)-induced Skin Tumors in Hairless Mice. **Cancer Res**, 57, 1238–1240, 1997.
- VAN LAETHEM, A.; VAN KELST, S.; LIPPENS, S.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P.; JANSSENS, S.; VANDENHEEDE, J.R.; GARMYN, M.; AGOSTINIS, P. Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. **FASEB J**, 18, 1946–1948, 2004.
- VAYALIL, P.K.; MITTAL, A.; HARA, Y.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, 122, 1480–1487, 2004.
- VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rotina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Lat Am J Pharm**, 27, 23–27, 2008a.
- VELASCO, M.V.R.; SARRUF, F.D.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **Int J Pharm**, 363, 50–57, 2008b.
- VERKMAN, A.S. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. **J Cell Sci**, 118, 3225–3232, 2005.
- VERSCHOOTEN, L.; SMAERS, K.; VAN KELST, S.; PROBY, C.; MAES, D.; DECLERCQ, L.; AGOSTINIS, P.; GARMYN, M. The Flavonoid Luteolin Increases the Resistance of Normal, but Not Malignant Keratinocytes, Against UVB-Induced Apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, doi:10.1038/jid.2010.124, 2010.
- VINK, A.A.; ROZA, L. Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. **J Photochem Photobiol Biol**, 65, 101–104, 2001.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, 92, 827–839, 2003.

- VOSTÁLOVÁ, J.; ZDAŘILOVÁ, A.; SVOBODOVÁ, A. Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. **Arch Dermatol Res**, 302, 171–181, 2010.
- WAGENER, S.; VOLKER, T.; DE SPIRT, S.; ERNST, H.; STAHL, W. 3,3'-Dihydroxyisorenieratene and isorenieratene prevent UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts. **Free Radical Biology and Medicine**, 53, 3, 457–463, 2012.
- WALSH, J.G.; CULLEN, S.P.; SHERIDAN, C.; LUTHI, A.U.; GERNER, C.; MARTIN, S.J. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 105, 35, 12815–12819, 2008.
- WANG, F.; YANG, J. A comparative study of caffeic acid and a novel caffeic acid conjugate SMND-309 on antioxidant properties in vitro. **LWT - Food Science and Technology**, 46, 239–244, 2012.
- WANG, H.; JOSEPH, J.A.; Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using a microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, 27, 5–6, 612–616, 1999.
- WANG, H.; PROVAN, G.J.; HELLIWELL, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. **Food Chemistry**, 87, 307–311, 2004.
- WANG, X.; GJERNES, E.; PRYDZ, H. Factor VIIa induces tissue factor-dependent up-regulation of interleukin-8 in a human keratinocyte line. **J. Biol. Chem**, 277, 23620–23626, 2002.
- WARSKULAT, U.; BROOKMANN, S.; FELSNER, I.; BRENDEN, H.; GREITHER-BECK, S.; HÄUSSINGER, D. Ultraviolet A induces transport of compatible organic osmolytes in human dermal fibroblasts. **Exp Dermatol**, 17, 1031–1036, 2008.
- WEISBURG, J.H.; WEISSMAN, D.B.; SEDAGHAT, T.; BABICH, H. In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 95, 191–200, 2004.
- WEISS, J.S.; ELLIS, C.N.; HEADINGTON, J.T.; VOORHEES, J.J. Topical tretinoin in the treatment of aging skin. **J Am Acad Dermatol**, 19, 169–175, 1988.
- WERTH, V.P.; BASHIR, M.M.; ZHANG, W. IL-12 Completely Blocks Ultraviolet-Induced Secretion of Tumor Necrosis Factor α from Cultured Skin Fibroblasts and Keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, 120, 116–122, 2003.
- WIRTH, C.; BUCHHOLZ, H.; CAROLA, C. Cosmetic formulation comprising flavonoids derivatives [US Patent: US 2008/0199414 A1], 2008.
- WLASCHEK, M.; BOLSEN, K.; HERRMANN, G.; SCHWARZ, A.; WILMROTH, F.; HEINRICH, P.C.; GOERZ, G.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. UVA-Induced Autocrine Stimulation of Fibroblast-Derived-Collagenase by IL-6: A Possible Mechanism in Dermal Photodamage? **Journal of Investigative Dermatology**, 101, 164–168, 1993.
- WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POÓR, I.; NADERI, L.; MA, W.; SCHNEIDER, L.A.; RAZI-WOLF, Z.; SCHÜLLER, J.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **J Photochem Photobiol B: Biol**, 63, 41–51, 2001.
- WOLF, P.; MAIER, H.; MULLEGER, R.R.; CHADWICK, C.A.; HOFMANN-WELLENHOF, R.; SOYER, H.P.; HOFER, A.; SMOLLE, J.; HORN, M.; CERRONI, L.; YAROSH, D.; KLEIN, J.; BUCANA, C.; DUNNER, K.; POTTEN, C.S.; HONIGSMANN, H.; KERL, H.; KRIPKE, M.L. Topical treatment with liposomes containing T4 endonuclease V protects human skin in vivo from ultraviolet-induced upregulation of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α . **Journal of Investigative Dermatology**, 114, 149–156, 2000.
- WONDRAK, G.T.; JACOBSON, M.K.; JACOBSON, E.L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochem Photobiol Sci**, 5, 215–237, 2006.
- WU, S.; GAO, J.; DINH, Q.T.; CHEND, C.; FIMMELE, S. IL-8 production and AP-1 transactivation induced by UVA in human keratinocytes: Roles of d- α -tocopherol. **Mol Immunol**, 45, 2288–2296, 2008.
- YEN, G.C.; DUH, P.D.; TSAI, H.L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chem**, 79, 307–13, 2002.
- YOSHIZUMI, M.; NAKAMURA, T.; KATO, M.; ISHIOKA, T.; KOZAWA, K.; WAKAMATSU, K.; KIMURA, H. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. **Cell Biol Int**, 32, 1405–1411, 2008.
- XIAO, W.; HODGE, D.R.; WANG, L.; YANG, X.; ZHANG, X.; FARRAR, W.L. NF- κ B activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL6-API site, But is independent of its IL6-NF κ B regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells. **Cancer Biology & Therapy**, 3, 10, p.1007–1017, 2004.
- ZANATTA, C.F.; MITJANS, M.; URGATONDO, V.; ROCHA-FILHO, P.A.; VINARDELL M.P. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV

- irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell line. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 1, 70-75, 2010.
- ZANG, L.Y.; COSMA, G.; GARDNER, H.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. **Mol Cell Biochem**, 247:205–10; 2003.
- ZATTRA, E.; COLEMAN, C.; ARAD, S.; HELMS, E.; LEVINE, D.; BORD, E.; GUILLAUME, A.; EL-HAJAHMAD, M.; ZWART, E.; VAN STEEG, H.; GONZALEZ, S.; KISHORE, R.; GOUKASSIAN, D.A. Polypodium leucotomos Extract Decreases UV-Induced Cox-2 Expression and Inflammation, Enhances DNA Repair, and Decreases Mutagenesis in Hairless Mice. **Am J Pathol**, 175, 1952–1961, 2009.
- ZHAO, Z.; SHIN, H.S.; SATSU, H.; TOTSUKA, M.; SHIMIZU, M. 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF- α -induced secretion of Interleukin-8 from Caco-2 Cells. **J Agric Food Chem**, 56, 3863–3868, 2008.
- ZIEGLER, A.; JONASON, A.S.; LEFFEL, D.J.; SIMON, J.A.; SHARMA, H.W.; KIMMELMAN, J.; REMINGTON, L.; JACKS, T.; BRASH, D.E. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. **Nature**, 372, 6508, 773-776, 1994.

ANEXO 1. Avaliação citotóxica dos compostos fenólicos candidatos ao estudo de fotoquimioproteção *in vitro*.

A1.1. Citotoxicidade dos compostos fenólicos sobre HaCaT e FHPD

A citotoxicidade dos compostos sobre a cultura de HaCaT e FHPD foi avaliada com o tratamento por 24 horas pelos métodos de exclusão do azul de tripan (AT) e retenção de vermelho neutro (NRU) (Figura 42). O tratamento com AR por 24 horas reduz a viabilidade de HaCaT a partir de 600 μ M pelo método de AT. O tratamento com ACG não reduziu a viabilidade de HaCaT por AT ou por NRU nas concentrações testadas. As imagens mostram que os compostos ACG e AR reduzem o número total de células vivas (Figura 42, A e B). O tratamento com AC reduz a viabilidade de HaCaT, com aumento de células mortas e alterações morfológicas a partir de 300 μ M (NRU) e 400 μ M (AT) (Figura 22, D).

Figura 42. Avaliação da citotoxicidade do A. ácido Rosmarínico (AR), B. ácido Clorogênico (ACG), C. ácido Cafeico (AC) em células de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) após 24 horas de tratamento avaliadas pelo método de exclusão por azul de Tripan (AT) (*esq.*) e método de retenção celular de vermelho neutro (NRU) (*centro*). As porcentagens representam a relação entre células vivas e células vivas + células mortas $\times 100$ (AT) e a relação entre células vivas tratadas e células vivas não tratadas com os compostos $\times 200$ (NRU). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos. Imagem do ensaio de citotoxicidade dos compostos testes sobre HaCaT (*dir.*). As porcentagens representam a viabilidade celular obtidas no ensaio de azul de tripan (objetiva aumento de 100x).

Todos os tratamentos com AR, ACG e AC apresentaram efeitos citotóxicos sobre FHPD a partir das concentrações de 150 μ M, 400 μ M e 150 μ M, respectivamente. Os valores

de IC₅₀ dos compostos testes pelo método de AT foi de 193.7 μ M para o AR, 498.1 μ M para o ACG e 235.6 μ M para o AC, enquanto que pelo método de NRU o IC₅₀ foi de 133.9 μ M para o AR, 440.6 μ M para ACG e 187.6 μ M para o AC. As imagens mostram a redução de células viáveis, alterações na morfologia e redução no tamanho das células (Figura 43 *esq.*) quando tratada com os compostos.

Figura 43. Avaliação da citotoxicidade do A. ácido Rosmarínico (AR), B. ácido Clorogênico (ACG), C. ácido Cafeico (AC) em fibroblasto humano primário dermal (FHPD) após 24 horas de tratamento avaliadas pelo método de exclusão por azul de Tripan (AT) (*esq.*) e método de retenção celular de vermelho neutro (NRU) (*centro*). As porcentagens representam a relação entre células vivas e células vivas + células mortas x 100 (AT) e a relação entre células vivas tratadas e células vivas não tratadas com os compostos x 200 (NRU). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos. Imagem do ensaio de citotoxicidade dos compostos testes sobre células de FHPD (*dir.*). As porcentagens representam a viabilidade celular obtidas no ensaio de azul de tripan (objetiva aumento de 100x).

Sendo assim, os resultados mostram que o AR e o ACG não apresentaram efeito citotóxico em HaCaT até as concentrações de 600 μ M e 1600 μ M, respectivamente, porém uma redução de células vivas foi observada. Quando FHPD é tratado com os compostos, todos os compostos induzem morte, mostrando que FHPD apresenta maior sensibilidade aos compostos quando comparado com HaCaT.

A1.2. Avaliação do ciclo celular em HaCaT

A avaliação do ciclo celular em HaCaT tratado com os compostos AR e ACG foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 44). Ambos os tratamentos induzem parada de ciclo

em HaCaT a partir das concentrações de 200 e 700 μM , respectivamente, aumentando a população em fase G1 e reduzindo em fase S e G2. Nota-se que a partir das concentrações de 400 μM de AR e 1000 μM de ACG ocorre aumento de células em fase Sub-G1, correspondendo a morte celular. Assim, conclui-se que os compostos testes AR e ACG induzem à parada de ciclo nas concentrações de 200 μM de AR e 700 μM de ACG em HaCaT e morte nas maiores concentrações testadas.

A partir dos resultados observados, a concentração dos compostos escolhida para os ensaios de fotoproteção em ambas as células foram as concentrações seguras ao FHPD, devido a sua maior sensibilidade. Portanto, as concentrações escolhidas foram de 25 μM de AR, 100 μM de ACG e 75 μM de AC.

A1.3. Liberação e atividade de MMP-2 e -9 por HaCaT

O efeito do pré-tratamento com os compostos AR, ACG e AC por 1 hora sobre a liberação de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa foi avaliado apenas em HaCaT, visto que apenas a HaCaT apresenta redução na liberação de MMP após as radiações UVA e UVB (Figura 45). Os compostos ACG e AC aumentam a liberação de proMMP-9 quando comparado ao controle, enquanto que apenas o AC possui aumento de MMP-2 ativa no

sobrenadante de HaCaT. O tratamento com AR reduz a liberação de MMP-2 ativa no sobrenadante de HaCaT 24 horas após o tratamento (Figura 45).

Figura 45. Liberação de proMMP-2, 9 e MMP-2 ativa por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) tratado por 1 hora com os compostos AR (ácido rosmarínico), ACG (ácido clorogênico) e AC (ácido cafeico). (A) Imagens do gel de zimografia mostrando a liberação de proMMP-2 e 9 por HaCaT após 24 horas do tratamento. (B) Os valores representados indicam média $\pm$ E.P.M. de unidades arbitrárias, em pixels, da quantidade de proMMP-9, proMMP-2 e MMP-2 ativa no sobrenadante de HaCaT 24 horas após o tratamento com os compostos. Os valores diferem do controle não-tratado (NT) em * $p < 0.05$ ou em ** $p < 0.01$. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

A1.4. Perfil de liberação de Citocinas IL-6 e IL-8

A liberação de citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 foram quantificadas 24 horas após o pré-tratamento com os compostos por 1 hora. Nenhum dos tratamentos interferiu na liberação de IL-6 e IL-8 em HaCaT e FHPD (Figura 46).

Figura 46. Liberação de citocinas IL-6 e IL-8 por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD). As células foram tratadas com os compostos testes, ácido Rosmarínico (AR), ácido Clorogênico (ACG) e ácido Cafeico (AC), por 1 hora e a liberação de citocinas foi realizada 24 horas após, por ELISA (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, EUA). As barras em amarelo correspondem a liberação de IL-6 e as em verde a liberação de IL-8. As abreviações NT e NTE correspondem a controle não-tratado e controle não-tratado + 0.12% de etanol, respectivamente. Os valores estão expressos em média $\pm$ E.P.M. das leituras em pg/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A1.5. Perfil das proteínas p53 e p21

As proteínas relacionadas à integridade do genoma (p53) e parada de ciclo (p21) foram quantificadas para ambas as células HaCaT e FHPD após o tratamento com os compostos AR, ACG e AC (Figura 47).

Após 24 horas, nenhum dos tratamentos alterou a expressão de p21 em HaCaT, contudo os tratamentos com ACG e AC e a presença de etanol (NTE) reduziram a expressão de p53 (Figura 47, A e B). Para FHPD, nenhum dos tratamentos alteraram a expressão de p21 e de p53, contudo a presença de etanol (NTE) aumentou a expressão de p53 (Figura 47, C e D).

Figura 47. Avaliação da expressão proteica de p53 e p21 em queratinócito humano imortalizado (HaCaT) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD) quando tratado com os compostos ácido Rosmarínico (AR), ácido Clorogênico (ACG) e ácido Cafeico (AC), por 1 hora. A quantificação da expressão proteica foi realizada 24 horas após os tratamentos. A proteína β-actina (43 kDa) foi utilizada como controle. Os valores diferem em * $p < 0.05$ e em ** $p < 0.01$ do controle sem tratamento (NT). Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A1.6. Perfil da proteína AQP3 em HaCaT

A internalização de proteína de membrana AQP3 foi avaliada em cultura de HaCaT pré-tratada com os compostos AR, ACG e AC (Figura 48, A e B). Nenhum dos tratamentos alteraram a quantidade de AQP3 de membrana (forma não-glicosilada; 30kDa) ou de AQP3

internalizada (forma glicosilada; 40kDa). Assim a razão entre as proteínas de 30kDa/40kDa também não alterou após o tratamento com os compostos (Figura 48, C).

Figura 48. Expressão proteica de aquaporina-3 (AQP3) por queratinócito humano imortalizado (HaCaT) após o tratamento com os compostos ácido Rosmarínico (AR), ácido Clorogênico (ACG) e ácido Cafeico (AC), por 1 hora. (A) Imagem do gel de *Western Blotting* após o tratamento com os compostos mostrando nenhuma alteração de AQP3 de membrana (forma não-glicosilada; 30kDa) ou na AQP3 internalizada (forma glicosilada; 35kDa). Abaixo, os valores no gráfico representam a média $\pm$ E.P.M. da (B) quantidade de AQP3 glicosilada (40kDa) e de membrana (30kDa) e da razão entre as quantidades de AQP3 de 30kDa/40kDa. Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

A1.7. Quantificação de ERO em HaCaT

A produção de ERO em HaCaT pré-tratado com os compostos foi avaliado por citometria de fluxo. A adição de H_2O_2 induz aumento de 363% na produção de ERO, enquanto que a presença de etanol (NTE) aumenta em 84% (Figura 49). Apenas o pré-tratamento com AR (25μM e 50 μM) induz aumento de ERO em HaCaT e após a adição de H_2O_2 exacerba essa produção de ERO em 68-69%, indicando um possível efeito pró-oxidante do composto (Figura 49). O tratamento com ACG não altera a quantidade de ERO em HaCaT e após a adição de H_2O_2 é observado uma redução de ERO apenas em 200μM de ACG. Outras concentrações de ACG (50 e 100μM) ou o tratamento com AC (50 e 75μM) não alteram a quantidade de ERO quando adicionado H_2O_2 .

Figura 49. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em HaCaT tratado com os compostos e exposto ao peróxido de hidrogênio. As células foram incubadas com a sonda DCFH-Da (30 μM) por 40 minutos, tratadas com os compostos fenólicos AR (A. 25 e 50 μM), ACG (B. 50, 100 e 200 μM) e AC (C. 50 e 75 μM) por 1 hora, seguidas de tratamento com H₂O₂ (250 μM) por 30 minutos. A leitura foi feita em citômetro de fluxo (canal FITC) após o tratamento com H₂O₂ e (D) os valores então representados em média de intensidade de fluorescência (MFI) ± E.P.M. e porcentagem em relação ao controle. Os valores diferem do controle sem H₂O₂ em *p<0.05 e **p<0.01 e do controle com H₂O₂ em #p<0.05 ##p<0.01. Os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico ANOVA por composto seguido de teste de Dunnett.

A1.8. Expressão gênica de AQP3 e CDKN1A em HaCaT

A expressão relativa dos genes endógenos GAPDH e ACTINA foi avaliada em HaCaT tratado com os compostos. Os tratamentos com ACG e AC diminuíram a expressão do gene endógeno GAPDH, enquanto que o AR aumenta a expressão deste mesmo gene. Apenas o ACG reduziu a expressão do gene endógeno ACTINA (Figura 50).

Figura 50. Expressão relativa dos genes endógenos GAPDH e ACTINA em HaCaT tratado com os compostos por 1 hora, seguidas de 24 horas de cultivo. A leitura foi feita em equipamento *Fast-RT-PCR System* com auxílio do software 7500 V2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. e diferem do controle sem tratamento (NT ou NTE) em $**p<0.01$ (Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A expressão relativa dos genes de interesse AQP3 e CDKN1A também foi avaliada em HaCaT tratado com os compostos (Figura 51). A presença de etanol (NTE) reduz a expressão de AQP3 quando comparado ao controle não tratado (NT). Os tratamentos com AR e ACG reduziram a expressão de AQP3, enquanto que o AC aumenta a expressão de AQP3 (Figura 51). Apenas o tratamento com AC aumentou a expressão do gene CDKN1A, quando relativo ao gene GAPDH (Figura 51, B). Assim, os resultados indicam que o gene AQP3 apresenta modulação pelos compostos devido ao caráter antioxidante, enquanto que o mesmo não é observado para a expressão de CDKN1A.

Figura 51. Expressão relativa dos genes AQP3 e CDKN1A em HaCaT tratado com os compostos por 1 hora, seguidas de 24 horas de cultivo. A leitura foi feita em equipamento *Fast-RT-PCR System* com auxílio do software 7500 V2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os valores então representados em média $\pm$ E.P.M. e diferem em $*p<0.05$ e $**p<0.01$ do controle sem tratamento (NT ou NTE) e em $$$p<0.01$ do controle NT (Teste estatístico ANOVA seguido de teste de *Dunnet*). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A1. Conclusões Parciais:

Os resultados descritos permitem concluir que:

- ✓ A cultura de HaCaT apresentou maior resistência ao tratamento com os compostos AR, ACG e AG por 24 horas do que em relação ao FHPD;
- ✓ A concentração dos compostos escolhida para os ensaios de fotoproteção em ambas as células foi a concentração segura encontrada ao FHPD, devido a sua maior sensibilidade. Portanto, as concentrações foram de 25µM de AR, 100µM de ACG e 75µM de AC
- ✓ O AC aumenta a liberação de pró-MMP-9, 2 e MMP-2 ativa em HaCaT, enquanto que o AR reduz a liberação de MMP-2 ativa e o ACG aumenta a liberação de pró-MMP-9;
- ✓ Nenhum dos compostos alteram a liberação de IL-8 ou IL-6 em HaCaT e FHPD
- ✓ Os compostos ACG e AC e o controle NTE reduzem a quantidade de p53 em HaCaT enquanto que em FHPD apenas o controle NTE aumenta a quantidade de p53;
- ✓ Nenhum dos compostos alteraram a quantidade de AQP3 em HaCaT;
- ✓ O AR aumentou a quantidade de ERO em HaCaT na presença ou ausência de H₂O₂, enquanto que o ACG em 200µM reduz a quantidade de ERO na presença de H₂O₂.
- ✓ Os compostos AR e AC alteram a expressão do gene endógeno GAPDH, enquanto que o ACG altera a expressão dos genes endógenos ACTINA e GAPDH; Todos os compostos e assim como a presença de etanol (NTE) reduziram a expressão do gene AQP3 em HaCaT, sem alterar a expressão do gene CDKN1A.

São Paulo, 5 de fevereiro de 2010.

Ilmo. Sr(a)

Dra. Silvy Stuchi Maria Engler

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: Projeto de Pesquisa "Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos" - **Pesquisador(a) Responsável:** Dra. Silvy Stuchi Maria Engler - **Co-Investigador(es):** Camila Eduardo Marinho, Carla Abdo Brohem, Manoela Tiago dos Santos - **Registro CEP-HU/USP:** 943/09 - **SISNEP CAAE:** 0062.0.198.000-09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 5 de fevereiro de 2010, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra "c".

O primeiro relatório está previsto para 5 de fevereiro de 2011.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

São Paulo, 15 de julho de 2013.

Ilmo(a). S(a).

Profa. Dra. Silvea Stuchi Maria Engler

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: Projeto de Pesquisa "Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos" - **Pesquisador(a) Responsável:** Profa. Dra. Silvea Stuchi Maria Engler - **Equipe de Pesquisa:** Camila Eduardo Marinho, Carla Abdo Brohem, Manoela Tiago dos Santos, Paula Comune Pennacchi, Paula Anastácia Ferreira, Fernanda Branco Filippin, Guilherme Galvão dos Santos, Renato Ramos Massaro, Bianca Ferruccio - **CEP-HU/USP:** 943/09 - **Registro CAAE:** 0062.0.198.000-09

Prezada Professora

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 05 de julho de 2013, APROVOU o Adendo encaminhado por V.Sa., referente à **inclusão das alunas de pós-graduação: Silvana Sandri, Tatiana do Nascimento Pedrosa, Carolina Motter Catarino, Andréa Costa Fruct e Fernanda Faião Flores**, na equipe de pesquisa.

Aproveitamos também para informar a APROVAÇÃO do Relatório Parcial do referido estudo (período: fevereiro de 2011 a junho de 2013), datado de 27 de junho de 2013.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler

**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da Universidade de São Paulo**

Andra Costa Fruet

Endereo para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1907909664600261>
ltima atualizao do currculo em 27/01/2015

Formada em Biologia pela Universidade Estadual Paulista "Jlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Botucatu e Mestre em Farmacologia pela mesma Instituio. Atualmente doutoranda do Programa de Ps-graduao em Frmacos e Medicamentos - Insumos Farmaceuticos - pelas FCF/USP. Possui conhecimento nos seguintes temas: Plantas Medicinais do Cerrado, Atividades Antitirozinase/Antioxidante, Experimentao animal de Colite ulcerativa e Alimentos funcionais, anlises Microbiolgicas e Bioqumicas, Cultura celular, radiao UV, compostos fenlicos e mtodos de Biologia Molecular. Possui ingls fluente. **(Texto informado pelo autor)**

Identificao

Nome Andra Costa Fruet
Nome em citaes bibliogrficas FRUET, A. C.;FRUET, ANDRA C.;FRUET, ANDREA C.;FRUET, ANDRA

Endereo

Formao acadmica/titulao

- 2011** Doutorado em andamento em Frmacos e Medicamentos.
Faculdade de Cincias Farmacuticas.
Ttulo: Avaliao do Efeito Fotoprotetor de Compostos Fenlicos sobre culturas de clulas da pele irradiadas por UVA e UVB., Ano de obteno: 2015.
Orientador: Prof. Dr. Slvia Berlanga de Moraes Barros.
Co-orientador: Prof. Dr. Slvya Stuchi Maria-Engler.
Bolsista do(a): Fundao de Amparo Pesquisa do Estado de So Paulo.
Grande rea: Cincias da Sade / rea: Farmcia / Subrea: Anlise e Controle de Medicamentos / Especialidade: FRMACOS E MEDICAMENTOS - INSUMOS FARMACUTICOS.
- 2008 - 2010** Mestrado em farmacologia.
Universidade Estadual Paulista Jlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Ttulo: Avaliao da atividade preventiva da fibra alimentar de *Typha angustifolia* L. e de seus efeitos sinrgicos com a prednisolona no modelo de colite ulcerativa induzida por cido trinitrobenzenosulfnico em ratos, Ano de Obteno: 2010.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi.
Bolsista do(a): Coordenao de Aperfeioamento de Pessoal de Nvel Superior.
Palavras-chave: Colite Ulcerativa; Modelo experimental; Rizoma de *Typha angustifolia* L..
Grande rea: Cincias Biolgicas / rea: Farmacologia / Subrea: Etnofarmacologia.
- 2004 - 2007** Graduao em Cincias biolgicas.
Instituto de Biocincias, IBB/UNESP, Brasil.
Ttulo: Triagem farmacolgica de espcies nativas do Cerrado e da Mata Atlntica com atividade antitirozintica e antioxidante.
Orientador: Prof. Dr. Luis Claudio Di Stasi.

Formação Complementar

2012	MBA em MBA Tecnologia Cosmética. (Carga Horária: 960h). Instituto Maurício Pupo.
2011 - 2011	Metodol. de Avaliação In Vitro da citotox de Nanop. (Carga horária: 24h). Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.
2011 - 2011	Módulo 1 - Quality & Documentation. (Carga horária: 8h). Instituto Nacional da Ciência e Tecnologia para Inovação Farmaceutica.
2005 - 2005	estágio Técnico na área de Morfologia. (Carga horária: 144h). Instituto de Biociências, IBB/UNESP, Brasil.
2005 - 2005	Biologia Marinha. (Carga horária: 40h). Instituto de Biociências, IBB/UNESP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2007 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Iniciação Científica em Laboratório de Fitomedicamentos sob orientação do Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi com trabalho intitulado Atividade Antitrombótica e Antioxidante de Plantas do Cerrado e Mata Atlântica.

Áreas de atuação

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por:

Ordem Cronológica ▼

1. SCARMINIO, VIVIANE ; **FRUET, ANDREA C.** ; WITAICENIS, ALINE ; RALL, VERA L.M. ; DI STASI, LUIZ C. . Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp AAA*) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Nutrition Research (New York, N.Y.) JCR*, v. 32, p. 202-209, 2012.

Citações: WEB OF SCIENCE™ 6 | SCOPUS 7

2. **FRUET, ANDRÉA** ; SEITO, LEONARDO ; RALL, VERA LÚCIA ; DI STASI, LUIZ . Dietary intervention with narrow-leaved cattail rhizome flour (*Typha angustifolia L.*) prevents intestinal inflammation in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *BMC Complementary and Alternative Medicine (Online) JCR*, v. 12, p. 62, 2012.

Citações: WEB OF SCIENCE™ 1 | SCOPUS 6

3. WITAICENIS, ALINE ; **FRUET, ANDRÉA C.** ; SALEM, LETÍCIA ; DI STASI, LUIZ C. . Dietary Polydextrose Prevents Inflammatory Bowel Disease in Trinitrobenzenesulfonic Acid Model of Rat Colitis. *Journal of Medicinal Food JCR*, v. 13, p. 1391-1396, 2010.

Citações: WEB OF SCIENCE™ 3

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. **FRUET, A. C.**; RIVELLI, D. P.; MARIA-ENGLER, S. S.; BARROS, S. B. M. . Phenolic Compounds Attenuates UVB Radiation Effects On Cultured Keratinocytes. In: 22th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2013; Rio de Janeiro. 22th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2013.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **FRUET, A. C.**; KNEBEL, F. H.; MARIA-ENGLER, S. S.; BARROS, S. B. M. . Paracrine activation of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 by skin cells exposed to UVB radiation. In: 15th Congress of the European Society for Photobiology, 2013, Liège, Bélgica. 15th Congress of the European Society for Photobiology - Book of Abstracts, 2013.
2. **FRUET, A. C.**; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. . Cytotoxicity of Phenolic Compounds on Human Skin Cell Lines. In: 10th International Congress on Cell Biology and XVI Meeting of Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro, RJ. 10th International Congress on Cell Biology, 2012.
3. **FRUET, A. C.**; Yamashita T. N.; Seito, L. N.; Di Stasi, L. C. . Antitirozinase and antioxidant activity medicinal plants from Cerrado and Tropical Atlantic Forest. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congresso f Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. anais de XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congresso f Ethnopharmacology, 2008.
4. **FRUET, A. C.**; Di Stasi, L. C. . ATIVIDADE DE CUMARINAS EM MODELOS IN VITRO DE ATIVIDADE ANTITIROSINÁSICA E ANTIOXIDANTE:. In: XIX Congresso de Iniciação Científica, 2007, Botucatu, à ser emitido final de dezembro, 2007.

Apresentações de Trabalho

1. TAMACHIRO, N.; BARROS, S. B. M.; **FRUET, A. C.**; RIVELLI, D. P. . Cytotoxicity of hydroethanolic extract of *Dioscorea paraguariensis* on immortalized human keratinocytes (HaCaT) cultures. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Demais tipos de produção técnica

1. **FRUET, A. C.**; WITAICENIS, A.; LUCHINI, A. C.; Orsi, P. R.; Cestari, S. H. . Importância do Estudo de Plantas Medicinais. 2008. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 15th Congress of the European Society for Photobiology. Paracrine activation of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 by skin cells exposed to UVB radiation. 2013. (Congresso).
2. 22th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress. Phenolic Compounds Attenuates UVB Radiation Effects On Cultured Keratinocytes. 2013. (Congresso).
3. 10th International Congress on Cell Biology and XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology. Cytotoxicity of Phenolic Compounds on Human Skin Cell Lines. 2012. (Congresso).
4. Workshop Internacional em Métodos Alternativos ao Uso de Animais com Ênfase em Alergenicidade. 2012. (Seminário).

5. INCT-if International Workshop on Pharmaceutical R&D - Módulo 1: Quality & Documentation. 2011. (Simpósio).
6. III Workshop: Skin Lesions Inuced by Solar Radiation and Melanoma: Pathophysiology, Prevention and Therapeutics. . 2011. (Outra).
7. IX Jornada Paulista de Plantas Medicinais. 2009. (Simpósio).
8. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, Antitirosinase and antioxidant activity medicinal plants from Cerrado and Tropical Atlantic Forest. 2008. (Congresso).
9. 40o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 2008. (Congresso).
10. VIII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu. 2008. (Simpósio).
11. II Semana Acadêmica de Farmácia da Unicamp. 2007. (Encontro).
12. VI Workshop da Pós-Graduação em Ciências Biológicas: "Ciência com Consciência". 2007. (Outra).
13. I Encontro Regional de Recursos Hídricos. 2006. (Encontro).
14. II Simpósio de Imunobiologia dos Tumores. 2005. (Simpósio).
15. IX Semana da Bio. 2005. (Encontro).
16. II Simpósio de Biologia Humana. 2004. (Simpósio).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. ★ **FRUET, A. C.** ; Takitane, I. C. . Festa Imigração Japonesa no Brasil e 30 anos da UNESP. 2006. (Festival).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 27/01/2015 às 16:07:47

[Imprimir currículo](#)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 7493852/1 - Andrea Costa Fruet

Email: afruet@usp.br
Data de Nascimento: 20/05/1985
Cédula de Identidade: RG - 43.574.606-6 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2007
Mestrado: Mestre em Ciências Biológicas (1) - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2010

Curso: Doutorado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 01/02/2011
Início da Contagem de Prazo: 01/02/2011
Data Limite para o Depósito: 02/02/2015
Orientador: Prof(a). Silvia Berlanga de Moraes Barros - 01/02/2011 até o presente. E.Mail: smbarros@usp.br
Coorientador: Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria Engler - 20/03/2012 até o presente. E.Mail: silvy@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 01/02/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 02/04/2013
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 01/02/2011
 Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2014

Impresso em: 27/01/15 16:10:06

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 7493852/1 - Andrea Costa Fruet

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5780-1/3	Estratégias Farmacêuticas de Prevenção do Dano Cutâneo Induzido por Radiação Solar: Antioxidantes Naturais	24/05/2011	20/06/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5753-2/2	Processos de Invasão Celular	30/05/2011	10/07/2011	90	6	100	- A	N	Concluída
FBF5794-1/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	16/08/2011	24/10/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5803-2/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	05/03/2012	18/03/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5734-7/2	Mecanismos de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Betrônico	06/03/2012	18/06/2012	90	6	93	A	N	Concluída
MDT5743-1/2	Imunidade Inata na Pele e Mucosa Oral - Métodos de Investigação (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	09/04/2012	29/04/2012	45	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	20
Estágios:			
Total:	0	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2014

Impresso em: 27/01/15 16:10:07

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 7493852/1 - Andrea Costa Fruet

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
2083397	Sílvia Berlanga de Moraes Barros	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2014

Impresso em: 27/01/15 16:10:07