

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

LAURA MARIA GROSSI CARVALHO

EFEITO DA RIBOFLAVINA SOBRE A PELE DE RATOS IRRADIADOS COM UV-A

RIBEIRÃO PRETO (SP)

2021

LAURA MARIA GROSSI CARVALHO

EFEITO DA RIBOFLAVINA SOBRE A PELE DE RATOS IRRADIADOS COM UV-A

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Leandra Náira Zambelli Ramalho

RIBEIRÃO PRETO (SP)

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Central do Campus da USP – Ribeirão Preto

Carvalho, Laura Maria Grossi

Efeito da riboflavina sobre a pele de ratos irradiados com UV-A. Ribeirão Preto, 2021.

89 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia

Orientadora: Ramalho, Leandra Náira Zambelli

1. Riboflavina. 2. UV-A. 3. Antioxidante 4. Fotoenvelhecimento cutâneo
5. Pele. 6. Estresse Oxidativo.

Nome: Carvalho, Laura Maria Grossi

Título: Efeito da riboflavina sobre a pele de ratos irradiados com UV-A

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, **Marli Grossi Carvalho** e **Luís Cláudio de Oliveira Carvalho**, por terem me incentivado em todas as minhas metas, todas minhas jornadas, sendo perto ou longe de casa. Com o amor e a dedicação de vocês, essa jornada se tornou muito mais divertida e interessante. E a todos que me apoiaram a tornar uma pessoa melhor a cada dia que passava, sempre incentivavam a correr atrás do sucesso, e sempre sorrir.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À **minha família**, por ser simplesmente incrível, na demonstração de amor, de dedicação, de se preocupar com o bem-estar do próximo. Graças a vocês tenho forças para continuar essa jornada chamada vida, tornando-a muito mais alegre, repleta de amor, carinho, e incentivos para conquistar os meus sonhos. Sempre sendo um porto seguro para voltar, independente das minhas escolhas, quedas, erros, e um lugar para comemorar todas as conquistas. Muito obrigada por tudo **Marli Grossi Carvalho** e **Luís Cláudio de Oliveira Carvalho**. Também quero agradecer ao meu irmão **Luís Henrique Grossi Carvalho**, que foi meu maior presente que pedi aos meus pais, cheio de alegria e energia, podendo contar para qualquer aventura nesta vida. E durante essa pandemia foi minha maior companhia, aturando meus surtos e minhas manias.

À **Prof^a. Dr.^a Leandra Naira Zambelli Ramalho**, pela chance de realização deste sonho, respondendo os meus e-mails desde o início, com muita atenção. Agradeço por todo conhecimento profissional oferecido, todas as dúvidas esclarecidas com muita paciência e profissionalismo. Por ter a oportunidade de assistir às suas aulas e palestras, e ficar maravilhada com todo conhecimento oferecido do início ao fim. Ao **Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho**, por auxiliar na parte prática do meu projeto. Juntamente pelo conhecimento recebido durante o PAE (Programa de Aperfeiçoamento de Ensino) e palestras apresentadas, com ótima didática e dedicação para transmitir o conteúdo. A minha coorientadora **Dr^a Sheila Cristina Lima Sanches**, por todo carinho e atenção ao auxiliar na escrita e desenvolvimento do meu trabalho, principalmente durante essa pandemia. Agradeço aos conhecimentos, feedbacks positivos e negativos, pela sua paciência e dedicação comigo e com o trabalho, pela oportunidade de levar estes conhecimentos para os próximos trabalhos e para a vida pessoal.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, principalmente ao **Departamento de Patologia e Medicina Legal**, por todo o suporte oferecido, desde a prova de ingresso até o término do curso. Agradeço por todo apoio oferecido durante o Curso de Inverno de Patologia, a todos os **professores** e **funcionários**, principalmente a **Camila L. Zambonini**. Agradeço as técnicas do Laboratório de Patologia Celular e Molecular de Doenças do Fígado, **Deisy Mara da Silva Longo** e **Marlei Josiele Augusto** por todo o apoio oferecido, sem elas não conseguiria realizar a pesquisa. Agradeço pelas risadas e todo o apoio durante essa jornada, a todo conhecimento transmitido, com paixão e paciência, e aos ótimos momentos

compartilhados no laboratório. Agradeço aos meus colegas de laboratório **Jessica Cristina Leme e Pedro Cesar Pádua Bonifácio**, que me apoiaram em todos os momentos, ajudando durante o experimento, tirando minhas dúvidas mais cabulosas, por todos os momentos bons que vivi com vocês, pelas risadas, idas no bandeirão, e por todo o carinho recebidos por vocês, até mesmo longe devido a pandemia. Espero poder levar para sempre a amizade de vocês, também desejo todo sucesso do mundo, pois vocês merecem.

A toda minha família, em ênfase minhas primas **Camila Carvalho Camargo e Ekaterini Grossi Tzanopoulos**, pois me deram suporte mesmo distantes, e permitiu que essa jornada de pandemia ficasse mais leve. Agradecer aos meus amigos da baixada santista por todo apoio e momentos únicos que passo com vocês, e deixaram essa jornada de pandemia mais leve.

À minha segunda família que encontrei em Ribeirão Preto, a **República Corujão**, foi um grande privilégio morar com vocês, onde compartilhei experiências únicas, conheci pessoas diferentes e únicas com um potencial enorme pela vida, de todos os lugares do Brasil e do mundo, levarei cada pessoa no coração. Muito obrigada por todos os momentos com vocês, sendo na alegria ou na tristeza, mas sempre unidos nas dificuldades. Agradeço pelos aprendizados, pelas conversas jogadas foras, diversão, risadas, e as refeições em família.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo aporte financeiro essencial para minha dedicação exclusiva em todas as atividades que envolvem a realização de uma formação sólida e de qualidade.

Agradeço aos professores que participaram da banca, **Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade** e a **Profª Drª Luísiane de Ávila Santana**, pela disposição para avaliar e auxiliar no aprimoramento do trabalho.

Por fim, agradeço a todos que participaram dessa jornada, que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Epígrafe

[...] Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante

Do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo [...]

Eu quero dizer agora o oposto do que eu disse antes [...]

Sobre o que é o amor

Sobre que eu nem sei quem sou

Se hoje eu sou estrela amanhã já se apagou

Se hoje eu te odeio amanhã lhe tenho amor [...]

É chato chegar a um objetivo num instante

Eu quero viver nessa metamorfose ambulante [...]

Raul Seixas

Resumo

RESUMO

CARVALHO, Laura Maria Grossi. **Efeito da riboflavina sobre a pele de ratos irradiados com UV-A.** 2021. 87f, Dissertação (Programa de Patologia, Mestre em Ciências) – Ribeirão Preto Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Resumo: A radiação ultravioleta do tipo A (UV-A) produz fatores relacionados ao estresse oxidativo cutâneo, com consequências que envolvem desde o fotoenvelhecimento até o carcinoma espinocelular da pele. Diversas substâncias antioxidantes têm sido amplamente estudadas nesse contexto. A riboflavina se apresenta como potente agente antioxidante em várias situações patológicas associadas ao estresse oxidativo. Todavia, o efeito da riboflavina, sobre a pele de animais expostos à radiação UV-A ainda não foi estudado. **Objetivo:** Investigar o papel antioxidante da riboflavina administrada por via tópica e oral em animais expostos à radiação UV-A. **Materiais e métodos:** Ratos machos Wistar (n=42) foram divididos em 6 grupos: 1 e 2 - animais não-irradiados tratados topicamente com veículo ou com riboflavina (5mg/100ml) por 3 dias, respectivamente; 3 e 4 - animais irradiados com UV-A por 8 dias (6,6mW/cm²-8min/dia) e tratados topicamente com veículo ou com riboflavina (5mg/100ml) por 3 dias, respectivamente; animais irradiados e tratados topicamente com riboflavina; 5 e 6 – animais irradiados com UV-A por 8 dias (6,6mW/cm²-8min/dia) e tratados com veículo ou com riboflavina (500µM/ml) via oral por 3 dias, respectivamente. Após o término dos tratamentos, os animais foram sacrificados, sendo colhidas amostras cutâneas. Foram realizadas análises histológicas para se avaliar o grau de lesão histológica (H&E) e os depósitos de colágeno (Sirus Red). A proliferação celular, a formação de vasos sanguíneos, o estresse oxidativo e a resposta inflamatória foram avaliados por meio da expressão imuno-histoquímica para PCNA VEGF, 4-HNE e NFκB. O estresse oxidativo também foi avaliado pela análise dos níveis cutâneos de MDA e GSH e pela análise da expressão proteica do 4-HNE, e a resposta inflamatória por meio da análise da expressão proteica de NFκB, TNF-R (TNF-α), p-38 MAPK (Western-Blotting). **Resultados:** O modelo experimental foi compatível a lesões de fotoenvelhecimento. O tratamento com riboflavina, principalmente por via oral, induziu o reparo da pele irradiada por UV-A, modulou os depósitos de colágeno, estimulou a expressão proliferativa celular e o aumento na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Além disso, reduziu o estresse oxidativo, observado pela diminuição dos níveis de MDA e da expressão de 4-HNE, com consequente diminuição da resposta inflamatória, observada pela diminuição da expressão de NFκB, TNF-R e p-38 MAPK. **Conclusão:** A suplementação com riboflavina por via oral, mais do que sua aplicação tópica, foi capaz de atuar como agente antioxidante e reparador sobre lesões causadas por radiação UV-A.

Palavras-chave: Fotoenvelhecimento cutâneo. UV-A. Estresse Oxidativo. Riboflavina. Antioxidante.

ABSTRACT

CARVALHO, Laura Maria Grossi. **Effect of riboflavine on the skin of rats irradiated with UV-A.** 2021. 87f, Thesis (Pathology Graduate Program, Master of Sciences) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Abstract: Type A ultraviolet irradiation (UV-A) produces factors related to cutaneous oxidative stress, with consequences ranging from photoaging to skin squamous cell carcinoma, being a worldwide problem. Several antioxidant substances have been widely studied in this context. Riboflavin has been shown to be a potent antioxidant in various pathological situations associated with oxidative stress. However, the effect of riboflavin in its antioxidant form on the skin of animals exposed to UV-A irradiation has not been studied.

Objective: To investigate the antioxidant role of riboflavin administered topically and orally on the skin of animals exposed to UV-A irradiation. **Materials and methods:** Male Wistar rats (n=42) were divided into 6 groups: 1 and 2 - non-irradiated animals treated topically with vehicle or riboflavin (5mg/100ml) for 3 days, respectively; 3 and 4 - animals irradiated with UV-A for 8 days (6.6mW/cm²-8min/day) and treated topically with vehicle or riboflavin (5mg/100ml) for 3 days, respectively; irradiated animals and topically treated with riboflavin; 5 and 6 - irradiated with UV-A for 8 days (6.6mW/cm²-8min/day) and treated with vehicle or riboflavin (500µM/ml) orally for 3 days, respectively. After the end of the treatments, the animals were sacrificed, and skin samples were collected. Histological analyzes were performed to assess the degree of histological damage (H&E) and collagen deposits (Sirius Red). Cell proliferation, blood vessel formation, oxidative stress and inflammatory response were evaluated by immunohistochemical expression for PCNA VEGF, 4-HNE and NFκB. Oxidative stress was also evaluated by analyzing the cutaneous levels of MDA and GSH and by analyzing the protein expression of 4-HNE, and the inflammatory response by analyzing the protein expression of NFκB, TNF-R (TNF-α), p -38 MAPK (Western-Blotting). **Results:** The experimental model was compatible with photoaging lesions. Treatment with riboflavin, mainly orally, induced repair of UV-A irradiated skin, modulated collagen deposits, stimulated cell proliferative expression and increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF). In addition, it reduced oxidative stress, observed by the decrease in MDA levels and the expression of 4-HNE, with a consequent decrease in the inflammatory response, observed by the decrease in the expression of NFκB, TNF-R and p-38 MAPK. **Conclusion:** Supplementation with riboflavin orally, more than its topical application, was able to act as an antioxidant and repair agent on injuries caused by UV-A radiation.

Keywords: Skin photoaging. UV-A. Oxidative stress. Riboflavin. Antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Descrição das Camadas da Pele.....	26
Figura 2: Efeitos da radiação UV nas biomoléculas celulares da pele.....	29
Figura 3: Mecanismos de dano indireto induzido por UV e formação de EROs.....	30
Figura 4: O desequilíbrio entre a produção de pró-oxidantes e antioxidantes nas células.....	31
Figura 5: Via de sinalização de TNFR1 e a via de NF- κ B e MAPK estimulada por TNF α ...	33
Figura 6: Estrutura da riboflavina evidenciando o grupo flavina e o grupo ribitilo.....	35
Figura 7: Fluxograma do delineamento experimental.....	44
Figura 8: Imagem representativa de coleta e processamento de amostras	45
Figura 9: Fotomicrografias representativas da histologia da pele.....	52
Figura 10: Fotomicrografias representativas da marcação histoquímica de Sirius-Red	54
Figura 11: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica de PCNA na pele	56
Figura 12: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica de VEGF da pele	58
Figura 13: Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de 4-HNE da pele.....	60
Figura 14: Expressão proteica de 4-HNE por meio da técnica de Western Blotting.	62
Figura 15: Expressão proteica de TNFR por meio da técnica de Western Blotting.	65
Figura 16: Fotomicrografias representativas da pele dos grupos SC (A), SR (B), IOC (C), IOR (D), ITC (E), ITR (F) (NF κ B, 20x).	66
Figura 17: Expressão proteica de NF κ B por meio da técnica de Western Blotting.....	68
Figura 18: Expressão proteica de p38 MAPK por meio da técnica de Western Blotting.	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Quantificação da deposição de colágeno na pele	55
Gráfico 2. Quantificação da marcação imuno-histoquímica de PCNA.....	57
Gráfico 3. Quantificação da marcação imuno-histoquímica de VEGF.	59
Gráfico 4. Quantificação da marcação imuno-histoquímica do 4-HNE.....	61
Gráfico 5. Quantificação da expressão da proteína de 4-HNE por Western Blotting	62
Gráfico 6. Quantificação tecidual do MDA.....	63
Gráfico 7. Quantificação tecidual da GSH na pele de animais.....	64
Gráfico 8. Quantificação da expressão proteica de TNFR por Western Blotting	65
Gráfico 9. Representando a quantificação da marcação da proteína NFκB	67
Gráfico 10. Quantificação da expressão proteica de NFκB por Western Blotting.....	68
Gráfico 11. Quantificação da expressão da proteína p38 MAPK por Western Blotting ..	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

μM - micrômetro

$^1\text{O}_2$ - oxigênio singlet

4-HNE - 4-Hidroxinonenal

$^{\circ}\text{C}$ - Grau Celsius

ATP - adenosina trifosfato

BCA - ácido bicinchonínico

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

CAT – catalase

cm – centímetros

cm^2 – centímetros quadrados

DBA - diaminobenzidina

DNA - ácido desoxirribonucleico

DTNB - reagente de Ellman

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERO - espécies reativas de oxigênio

FMN - flavina mononucleotídeo

FAD - flavina-adenina dinucleotídeo

Fig. – Figura

g – gramas

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GSH - glutationa reduzida

GSH-Px - glutationa peroxidase

h – hora

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HRP - horseradish peroxidase

H&E - Hematoxilina e Eosina

IKK - complexo quinásico

IL - Interleucina

INF - Interferon

I/R - lesão por isquemia e reperfusão

IOC – animais que receberam veículo por gavagem e irradiados com UV-A

IOR - animais que receberam veículo contendo riboflavina por gavagem e irradiados com

UV-A

ITC - animais tratados com veículo tópico e irradiados com UV-A

ITR - animais tratados com veículo tópico contendo riboflavina e irradiados com UV-A

J- Joules

Kg – quilogramas

L – litros

M - mol

MAPK - proteínas quinases ativadas por mitogênio

MDA - malondialdeído

mg – miligramas

min – minutos

ml – mililitros

mm – milímetros

mmol - milimol

MW – Megawatt

NaCl – Cloreto de sódio

NB - Narrow-band

N – número

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido

NFκB - factor nuclear kappa B

nm - nanômetro

NO – óxido nítrico

O₂⁻ - superóxido

OH⁻ - hidroxila

PBS - Tampão fosfato-salino

PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular

pH - Potencial Hidrogeniônico

PVDF - Fluoreto de Polivinilideno

rpm – rotação por minuto

SDS-poliacrilamida - gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

SC - animais não irradiados e tratados com veículo tópico

Sen * - fotosensibilizador excitado

Sen - fotosensibilizador

SR - animais não irradiados e tratados com veículo tópico contendo riboflavina

SOD - superóxido dismutase

TMP - 1,1,3,3 – tetrametoxipropano

TNF-α - Factor de necrose tumoral α

TNFR - receptor de fatores de necrose tumoral

Tris-Cl ou TBS - solução salina tamponada com Tris

UV – Radiação Ultravioleta

V - volume

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

X - Vezes

W - watt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 <i>Geral</i>	41
3.2 <i>Específicos</i>	41
4 MATERIAIS E MÉTODO	43
4.1 <i>ANIMAIS</i>	43
4.2 <i>AMBIENTES E GAIOLAS</i>	43
4.3. <i>Delineamento experimental</i>	44
4.4 <i>Determinação da radiação UV-A</i>	45
4.5. <i>Administração da riboflavina</i>	46
4.5.1 <i>Creme Dermatológico com Riboflavina</i>	46
4.5.2 <i>Gavagem com Riboflavina</i>	46
4.6 <i>HISTOLOGIA</i>	46
4.7. <i>Deposição de colágeno</i>	46
4.8 <i>ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO</i>	47
4.9 <i>QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DO NFκB, TNF-R, 4-HNE E P38 MAPK POR WESTERN BLOTTING</i>	47
4.10 <i>ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELA QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO</i>	48
4.11 <i>DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)</i>	48
5 RESULTADOS	51
5.1 <i>A riboflavina induz reparo da pele irradiada com UV-A</i>	51
5.1.1 <i>A riboflavina reestabeleceu a arquitetura usual da pele irradiada com UV-A</i>	51
5.2. <i>A riboflavina remodelou os depósitos de colágeno após radiação UV-A</i>	53
5.3 <i>A riboflavina estimulou a expressão de capacidade proliferativa das células</i>	55
5.4 <i>A riboflavina aumentou a expressão do VEGF</i>	57

5.5 <i>A riboflavina reduz o estresse oxidativo promovido pela irradiação UV-A</i>	59
5.5.1. <i>A riboflavina diminuiu a expressão do 4-HNE</i>	59
5.6. <i>A riboflavina reduziu a quantidade de MDA</i>	62
5.7 <i>A riboflavina aumentou os depósitos de GSH</i>	63
5.8 <i>A RIBOFLAVINA DIMINUIU A INFLAMAÇÃO CUTÂNEA PROVOCADA PELA RADIAÇÃO UV-A</i>	64
5.8.1. <i>A riboflavina reduziu a expressão do receptor de TNFα (TNFR)</i>	64
5.9. <i>A riboflavina inibiu a expressão do fator de transcrição NFκB</i>	65
5.10 <i>A riboflavina reduziu a expressão do p38 MAPK</i>	68
8 DISCUSSÃO	71
9 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	80
ANEXO A	89

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, protegendo o corpo contra traumas físicos, patógenos, alérgenos, produtos químicos, radiação ultravioleta (UV) e perda excessiva de água e eletrólitos, além de exercer papel fundamental na regulação da temperatura e para o tato (WOLK; WITTE; SABAT, 2010). A pele pode ser subdividida morfofuncionalmente em três camadas: epiderme, derme e hipoderme (SPELLBERG, 2000).

A camada mais externa da pele é a epiderme. A epiderme é formada por um epitélio escamoso estratificado queratinizado, que variam em espessuras de 75 a 150mm, sendo composta por proliferação basal e queratinócitos suprabasais, que modificam seus aspectos conforme passam de uma camada celular para outra. Os queratinócitos são as células mais presentes na epiderme, representando 80% das células epidérmicas. Devido a mecanismos fisiológicos de apoptose e proliferação celular, a epiderme é continuamente renovada a partir dos queratinócitos da camada basal (LIPPENS *et al.*, 2009; MURPHREE, 2017). Assim, os queratinócitos são responsáveis pela formação das cinco camadas da epiderme: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (MURPHREE, 2017).

Seguindo a ordem de profundidade, a camada basal é a mais profunda da epiderme, sendo constituída por uma só camada de células cúbicas que se dispõem por cima da junção dérmico-epidérmica. A camada espinhosa, ou camada de Malpighi, é constituída por múltiplas fileiras de queratinócitos diferenciados unidos devido à presença de projeções citoplasmáticas (citoplasma eosinófilo), de grande quantidade de desmossomos e de feixes de filamentos de queratina entre as células (tonofilamentos), formados por glicoproteínas e lipoproteínas, atuando na manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito. A camada granulosa é constituída por uma ou várias fileiras de células que constituem os grânulos de queratina. Acima da camada granulosa se encontra a camada córnea, onde os queratinócitos perdem o núcleo e se diferenciam em corneócitos (ALMEIDA, 2020; MURPHREE, 2017).

Os corneócitos são células originadas queratinócitos modificados, anucleadas, sem organelas e com citoplasma contendo ampla quantidade de queratina e estão envolvidas por um envelope lipídico e unidas por corneodesmossomos, destacando-se como a principal barreira de proteção da pele, permitindo evitar os possíveis danos que podem ser causados por mudanças na temperatura e umidade, pela ação dos raios ultravioleta, fatores mecânicos e agentes patogênicos (ALMEIDA, 2020; BARONI *et al.*, 2012; BROHEM *et al.*, 2011; MURPHREE, 2017).

As queratinas são um complexo de proteínas que conferem resistência, elasticidade e impermeabilidade ao tecido, protegendo os queratinócitos subjacentes. Morfologicamente, as queratinas podem estar presentes de duas formas: a queratina líquida, que constitui a maior parte de queratina que cobre a superfície cutânea, e a queratina dura, que forma os pelos e as unhas. Em certas localizações, existe uma capa visível, amorfa, entre a camada granulosa e a camada córnea que se denomina estrato lúcido. Acima dos corneócitos se deposita a matriz fosfolipídica, também com função impermeabilizante (LIPPENS *et al.*, 2009).

As células do tecido epitelial unem-se através de especializações da membrana, chamadas de junções celulares. Entre as principais junções celulares encontram-se as ligações desmossômicas. Ao manter as células unidas entre si, o desmossomo oferece força mecânica e estabilidade ao tecido, configurando o aumento da resistência da epiderme (LIPPENS *et al.*, 2009).

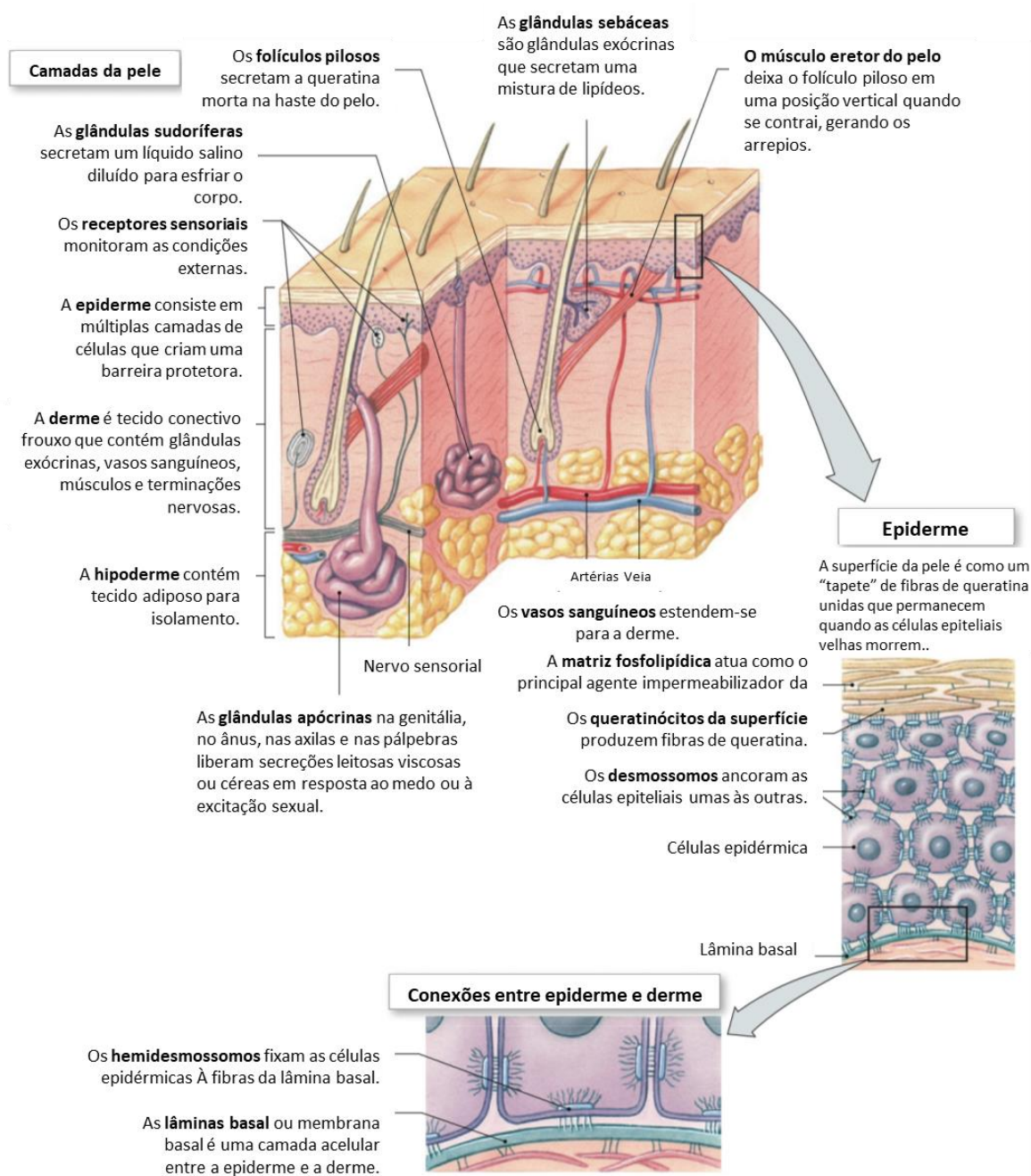
Na epiderme e nos folículos pilosos ocorre também a presença dos melanócitos (COSTIN; HEARING, 2007). A principal característica dos melanócitos é a produção de melanina, um polímero derivado do aminoácido L-tirosina, sendo uma substância crucial de defesa cutânea à radiação solar. Assim, a queratina, a renovação celular e a melanina podem ser consideradas como os principais fatores protetores da epiderme (CICHOREK *et al.*, 2013).

A camada intermediária da pele é a derme. Na derme, existem macrófagos e mastócitos que atuam de forma protetora, protegendo a pele dos agentes infecciosos. Também são encontrados os fibroblastos, responsáveis pela promoção da síntese e degradação da matriz extracelular. A matriz extracelular da derme é composta principalmente por colágeno e elastina, necessários para a manutenção da elasticidade e reparação da pele (COSTIN; HEARING, 2007). Ainda são observados folículos pilosos, glândulas exócrinas, vasos sanguíneos, músculos e terminações nervosas (SILVERTHORN E JOHNSON, 2010).

A hipoderme ou tecido subcutâneo localiza-se abaixo da derme, portanto, é uma profunda camada de tegumento, sendo formada por tecido conjuntivo, representando entre 15% a 30% do peso corporal. A ligação entre a derme e a hipoderme é garantida por fibras de elastina e colágeno. A espessura da hipoderme varia de acordo com a região do corpo e sexo do indivíduo. Os tipos celulares que ocorrem com maior frequência na hipoderme são os adipócitos, onde se dispõem entre vasos mais calibrosos, músculos mais profundos e os ossos. As principais funções da hipoderme são reserva de energia, amortecimento a impactos ou traumas, regulação da temperatura corporal e conexão da derme aos músculos e ossos, fixando assim a pele a estruturas adjacentes. (FORSLIND, 1995; SPELLBERG, 2000).

Em adição, observa-se que a epiderme, a derme e a hipoderme são essenciais para a reserva de nutrientes, e para a realização de funções metabólicas, como por exemplo, a produção de vitamina D, e na realização de funções sensitivas, por meio das terminações nervosas, além da proteção dos tecidos subjacentes contra agressões biológicas por microrganismos patogênicos e contra ameaças físicas como altas temperaturas e radiação proveniente da luz solar (Fig. 1) (WOLPOWITZ; GILCHREST, 2006).

Figura 1: Descrição das camadas da pele



Fonte: Silverthorn e Johnson (2010).

Entretanto, quando há uma exposição exacerbada à radiação proveniente da luz solar, os raios UV-A e UV-B produzem agentes oxidantes em grandes quantidades. Neste cenário, os queratinócitos não conseguem superar as lesões causadas pelos mesmos, levando ao fotoenvelhecimento e a maioria das afecções da pele, referidas como afecções pré-neoplásicas, como a queratose actínica, e afecções neoplásicas, como o carcinoma epidermóide e o melanoma (BAKOS, 2006).

Desta forma, os principais fatores de risco para o câncer de pele são a exposição prolongada ao sol, principalmente na infância e adolescência, exposição a câmara de bronzeamento artificial e histórico familiar de câncer de pele (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2019).

Os principais tipos de câncer de pele não-melanoma são o carcinoma de células escamosas e o carcinoma basocelular, considerado o mais frequente, sendo que se desenvolvem a partir dos queratinócitos; e o câncer de pele do tipo melanoma que se forma nos melanócitos, que cresce e se espalha mais rapidamente, apesar de ser menos comum. O câncer de pele melanoma acomete principalmente pessoas de pele clara acima dos 40, exceto em indivíduos portadores de doenças cutâneas. Entretanto, este perfil de idade vem se modificando com a constante exposição dos jovens sem proteção aos raios solares (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; BANDARCHI *et al.*, 2010; INCA, 2019)

No Brasil, em 2017, ocorreram, 1 301 óbitos de câncer de pele do tipo não melanoma em homens, e 949 óbitos em mulheres. Estes valores correspondem ao risco de 0,92/100 mil em ambos os sexos, sendo que de todas as neoplasias malignas diagnosticadas no mundo, é o tipo mais frequente em ambos os sexos. Para o câncer de pele do tipo melanoma, foram 1 031 óbitos em homens e de 804 óbitos em mulheres, com risco de 1,02/100 mil e 0,78/100 mil respectivamente. Além disso, projeções estimam que provavelmente devam ocorrer aproximadamente 83 770 e 93 160 novos casos de câncer de pele não-melanocítico, entre homens e mulheres, respectivamente, para cada ano do biênio 2020-2022. Em relação ao melanoma, cuja taxa de mortalidade é mais elevada, estima-se que ocorrerão cerca de 4 200 e 4 250 novos casos entre homens e mulheres, respectivamente, durante esse mesmo período (INCA, 2019).

As neoplasias não-melanocíticas da pele são curáveis na maioria dos casos, mas o melanoma tem o prognóstico mais reservado, podendo ser passível de terapia efetiva apenas quando diagnosticado e tratado na fase inicial. Embora haja crescente conscientização da população sobre os perigos da exposição inadequada à radiação solar e a necessidade da utilização de filtros solares, o câncer de pele ainda é um problema de saúde pública nacional e

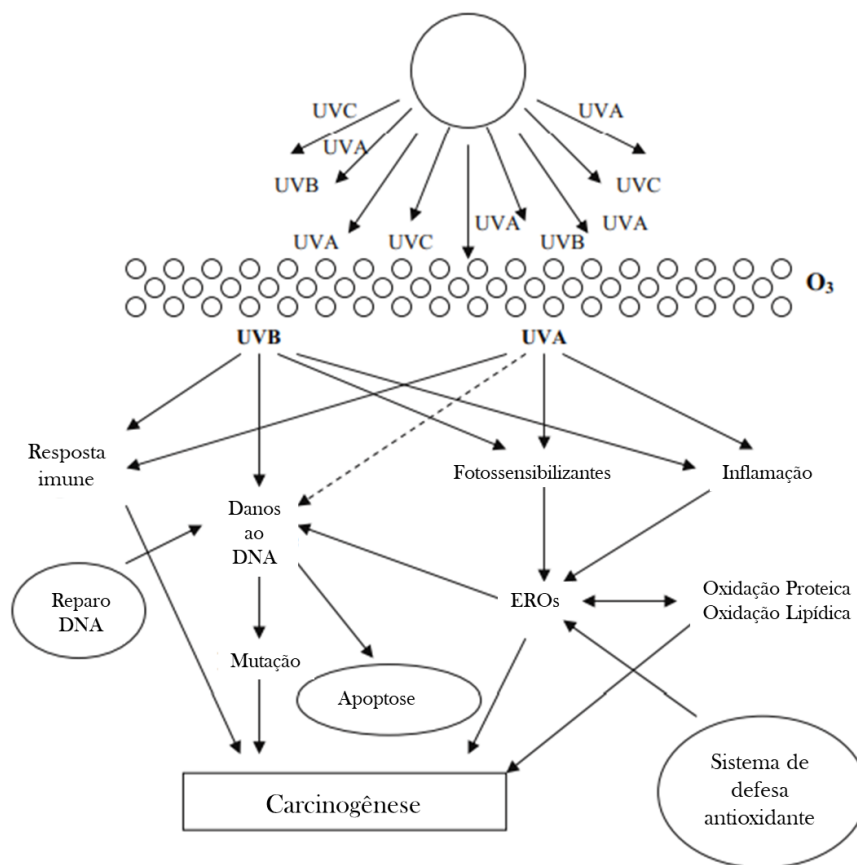
mundial, motivando uma maior compreensão dos efeitos da radiação solar sobre a pele (SCHALKA *et al.*, 2014).

A radiação solar é constituída por um espectro contínuo de radiação eletromagnética, dividido em radiação ultravioleta (UV) (100 a 400 nm), visível (400 a 700 nm) e infravermelho (700 a 900 nm). A radiação UV é subdividida em três faixas: UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) e UV-C (100-290 nm), sendo que cada um dos tipos de UV interage com a pele de forma dependente das propriedades fotofísicas e fotoquímicas dos seus respectivos compostos absorvedores (DUTHIE; KIMBER; NORVAL, 1999; HUSSEIN, 2005).

Os raios UV-C são mais energéticos e promovem a formação de estados de excitação mais reativos em uma gama maior de biomoléculas, pois quase todas as moléculas orgânicas absorvem o UV-C e reagem sem especificidade definida. Entretanto, apesar de serem potencialmente mais nocivos, os raios UV-C não estão relacionados a lesões cutâneas, visto que sua energia é absorvida pela estratosfera e não atinge a superfície da terra (LIN; FISHER, 2007).

Os raios UV-A e UV-B são responsáveis pela oxidação de lipídios, proteínas e DNA. Este intenso processo oxidativo pode resultar em danos cutâneos, envelhecimento acelerado e desenvolvimento de neoplasias da pele (Fig. 2) (BANDYOPADHYAY; MEDRANO, 2006; DUV-AL *et al.*, 2002; JENKINS; GROSSMAN, 2013; MEDRANO *et al.*, 1994). A maioria das afecções da pele, pré-neoplásicas (ex. a queratose actínica) e as neoplásicas (ex. o carcinoma epidermóide e o melanoma), possuem relação com o excesso de exposição tanto à radiação UV-A quanto UV-B (BAKOS, 2006). Assim, a morte celular evidente e transformações neoplásicas são alterações compatíveis ao fotoenvelhecimento crônico, sendo frequentemente encontradas em pessoas idosas com exposição regular ao sol durante anos, podendo levar ao desenvolvimento de lesões malignas cutâneas (JENKINS; GROSSMAN, 2013).

Figura 2: Efeitos da radiação UV nas biomoléculas celulares da pele.



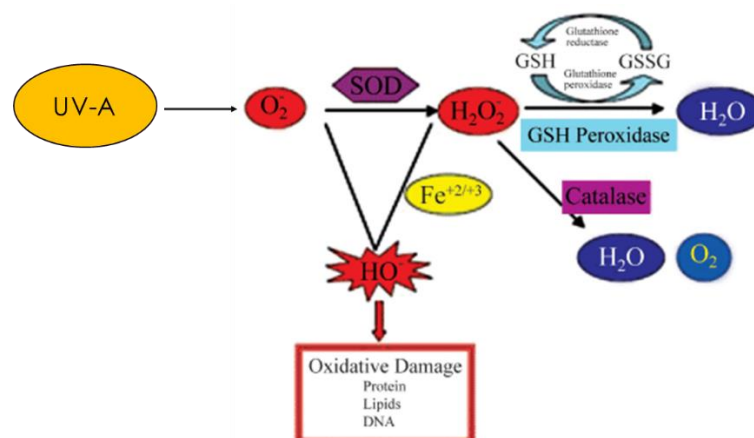
Fonte: Modificada de Svobodova, Walterova e Vostalova (2006).

A radiação UV-A tem um impacto maior no estresse oxidativo do que o UV-B, porque além da formação de espécies reativas de oxigênio que danificam o DNA, proteínas e lipídios, também promove o comprometimento da produção de energia pelas células da pele (HALLIDAY, 2005). A agressão cutânea provocada pela radiação UV-A envolve fundamentalmente mecanismos de fotossensibilização, com indução da produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006).

A fotossensibilização é um processo pelo qual as moléculas transformam energia luminosa em energia e reatividade química. O princípio básico da fotossensibilização é a excitação dos elétrons de uma molécula em que, no seu estado excitado, seja capaz de transferir sua energia para outras moléculas, induzindo assim a formação de outras espécies elétron-reativas (SEKAR *et al.*, 2014). Este processo pode ocorrer por dois mecanismos principais, conhecidos como tipo I e tipo II. No tipo I, ocorre uma transferência de elétrons por meio de uma interação direta entre um fotossensibilizador excitado e a biomolécula-alvo,

(UV), sendo considerado uma resposta fotoprotetora adaptativa dos melanócitos para evitar mais danos ao DNA (MAHMOUD *et al.*, 2010; TAKAHASHI; NAKAMURA, 2005).

Figura 4: O desequilíbrio entre a produção de pró-oxidantes e antioxidantes nas células pode levar a um aumento da produção de radicais livres, como oxigênio ativado (O_2) e espécies reativas de oxigênio, causando sérios danos celulares.



Fonte: Modificada de Wakamatsu, Dogru e Tsubota (2008).

Entretanto, quando ocorre excesso de formação de EROs, eles sobrecarregam os mecanismos de defesa antioxidantes, resultando no desequilíbrio entre formação de EROs e produção de antioxidantes, conduzindo ao estresse oxidativo (AFAQ; MUKHTAR, 2002; HECK *et al.*, 2004). Assim, quando o UV-A induz a produção exacerbada de EROs e ERNs, a ponto de superar a capacidade antioxidante das células-alvo (como os queratinócitos), ocorrem alterações moleculares em ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, podendo levar à morte celular ou outras transformações fenotípicas e genotípicas, além da liberação de citocinas pró-inflamatórias (CHIARELLI NETO, 2014). Consequentemente, a radiação UV-A atua como a principal responsável pelo fotoenvelhecimento e câncer da pele (AGAR *et al.*, 2004; CHIARELLI NETO, 2014; NIIDA; NAKANISHI, 2005).

No fotoenvelhecimento a taxa de proliferação celular está reduzida, e os demais mecanismos de reparo tecidual aparecem comprometidos (FORE, 2006). A renovação celular pode ser estimada através da expressão do PCNA, um marcador de proliferação celular que é reativado progressivamente durante o reparo tecidual. Neste caso, o PCNA aparece expresso na camada basal da epiderme, mas a migração do PCNA para as camadas superiores da epiderme indica proliferação anômala e, possivelmente, um aumento do potencial maligno subsequente. No caso da exposição cutânea à radiação UV, a expressão do PCNA é dependente do tempo, dose e tipo de radiação (MOORE *et al.*, 2004). Além de servir como

um marcador de proliferação celular para queratinócitos expostos à radiação UV, onde cronicamente poderia denotar risco de desenvolvimento de neoplasia, a abundância do PCNA é fundamental para o processo de reparo do DNA.

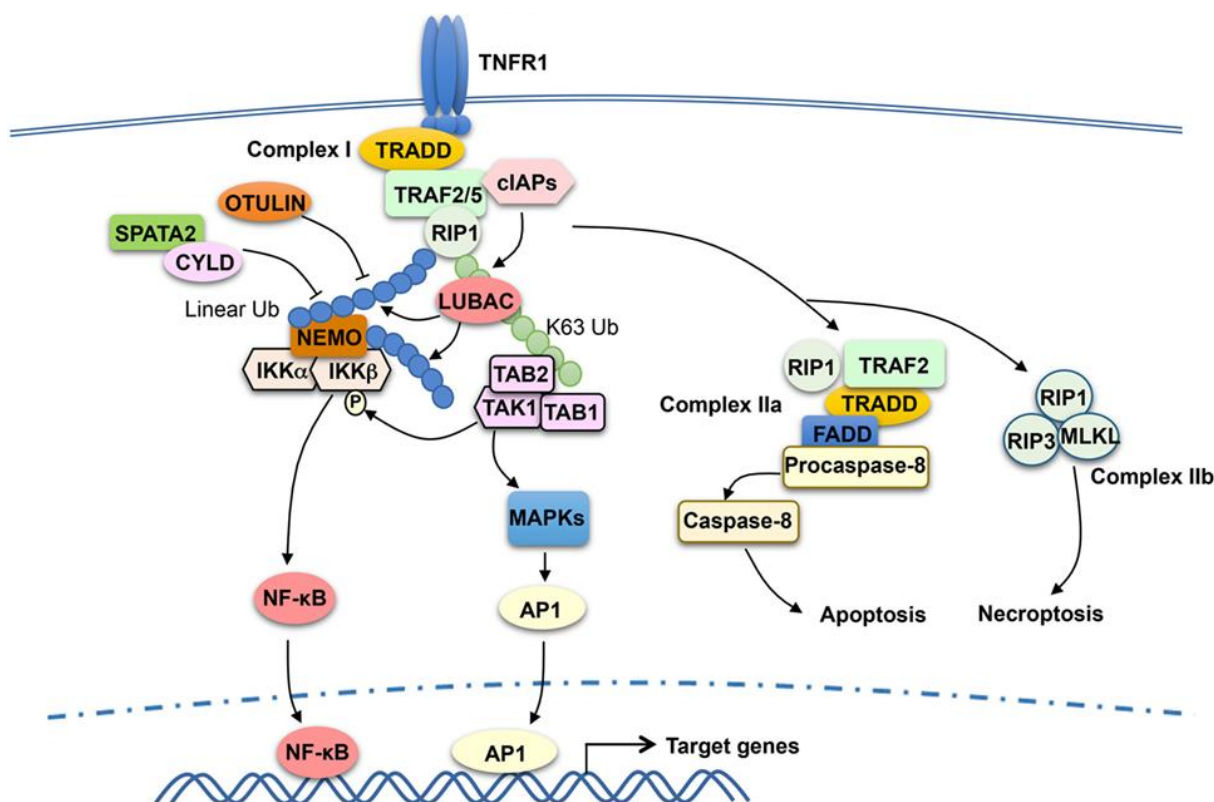
Para que ocorra a renovação celular é necessário a formação de novos vasos (angiogênese), para que estes novos vasos possam levar nutrientes às áreas cutâneas mais sensíveis, reestabelecendo a capacidade de reparo. O VEGF é produzido por células endoteliais, queratinócitos, células de músculo liso, fibroblastos, plaquetas, neutrófilos e macrófagos. Através de sua interação com diferentes receptores de superfície é capaz de estimular a proliferação do endotélio vascular, secreção de matriz extracelular pelos fibroblastos e indução de proteínas anti-apoptóticas nas células epiteliais. Devido a esses efeitos, o VEGF pode ser considerado como o principal fator pró-angiogênico envolvido no reparo tecidual (BARRIENTOS *et al.*, 2008).

Além da dificuldade de renovação celular, colaborando para o aumento da lesão no tecido, durante o estresse oxidativo intenso acontece sobrecarga da capacidade antioxidante das células-alvo, ocasionando a peroxidação lipídica. Entre os produtos, o 4-HNE, é considerado mediador de danos celulares importantes associados ao estresse oxidativo provocado pelo UV-A, que reagem com grupos nucleofílicos de moléculas biológicas (DNA, aminofosfolipídeos e proteínas). A formação de adutos de aldeído (4-HNE) nas proteínas gera disfunção celular e tissular progressiva, além de danos irreversíveis. A ação patogênica do 4-HNE ocorre, sobretudo, sobre a elastina, sendo diretamente relacionada à elastose actínica em humanos. A elastina modificada pelo 4-HNE torna-se resistente à elastase, contribuindo para seu acúmulo na pele de camundongos expostos a UV-A, que juntamente ao colágeno danificado, configuram o achado histológico da degeneração basofílica do colágeno. Assim, o 4-HNE emitido pela peroxidação lipídica atua como um mecanismo agravante no fotoenvelhecimento (LARROQUE-CARDOSO *et al.*, 2015). Outro produto da peroxidação lipídica é o MDA, um aldeído reativo que frequentemente é utilizado como um marcador para medir o estresse oxidativo em diferentes tecidos. Os níveis de MDA podem ser diretamente correlacionados à quantidade e tempo de exposição ao UV-A na pele. Sua ativação é estimulada principalmente devido à formação de oxigênio *singlete* decorrente do estresse oxidativo provocado pelo UV-A (KHAN *et al.*, 2018).

Em estudos anteriores, Li *et al.* (2016) e Salama *et al.* (2018) revelam que o estresse oxidativo secundário à exposição ao UV-A induz uma resposta inflamatória importante, com níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , que por sua vez, tem sido implicado na geração de EROs, mantendo um ciclo de inflamação e estresse oxidativo. A

sinalização mediada pelo TNF- α através de seus receptores TNFR1 e TNFR2, é essencial para a proliferação celular, diferenciação, apoptose, modulação das respostas imunes e indução de inflamação durante o reparo cutâneo (BARRIENTOS *et al.*, 2008). A cascata dos efeitos biológicos associados a indução da via do TNF- α pelo estresse oxidativo, ocorre inicialmente com a ligação do TNF- α ao TNFR1 que resulta ativação da quinase 1, a qual leva à agregação de um complexo de quinase a jusante - complexo IKK. Este complexo é composto pelos componentes catalíticos - IKK α e IKK β - e uma proteína reguladora sobre o do fator de transcrição NF κ B. O inibidor κ B (I κ B) regula fortemente o NF κ B (NF κ B p60 e NF κ B p50). A fosforilação de I κ B pelo complexo IKK resulta na liberação do NF κ B. O NF κ B se transloca para o núcleo e ativa os genes envolvidos na proliferação celular e na anti-apoptose. Além da ativação do NF κ B, a interação do TNF- α com seu receptor TNFR1 também está associada à indução da via das MAPKs, ativando MKK3 que então fosforila p38 MAPK. O Phospho-p38 MAPK é então importado para o núcleo, onde fosforila fatores de transcrição específicos que ativam vários genes relacionados ao estresse oxidativo e à proliferação celular (Fig. 5) (SHI e SUN, 2018).

Figura 5 Via de sinalização de TNFR1 e a via de NF- κ B e MAPK estimulada por TNF α



Em outras palavras, as EROs têm sido implicadas na indução de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , onde participa da ativação de uma variedade de fatores de transcrição, como o NF κ B e na via das MAPKs. Assim, o estresse oxidativo desencadeado no processo de lesão tecidual por UV-A elicia o processo de inflamatório mediado pelo TNF- α , conduzindo à ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o NF κ B, responsáveis pelo controle da transcrição gênica da maioria dos agentes inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, conduzindo conseqüentemente ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o próprio TNF- α (SHAH e MAHAJAN, 2013).

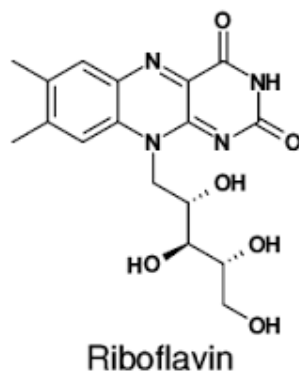
Neste cenário, a produção de EROs e ERNs induzida por radiação UV gera respostas químicas e biológicas sequenciais que podem ser atenuadas através do tratamento com produtos antioxidantes. Desta forma, agentes antioxidantes naturais ou sintéticos, que sejam eficazes na prevenção ou tratamento dos danos oxidativos induzidos pela radiação UV, têm sido amplamente investigados (DUTHIE; KIMBER; NORVAL, 1999; TOBIN, 2011). Assim, o desenvolvimento de agentes preventivos e/ou terapêuticos para lesões cutâneas induzidas pela radiação UV tornou-se um assunto importante na pesquisa dermatológica (AFAQ; MUKHTAR, 2002; AFAQ; MUKHTAR, 2006).

Em adição, quando se considera que o aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) associado ao dano nitrosativo é um evento importante na formação de lesões cutâneas até 24 horas após a radiação UV, principalmente quando se trata de radiação UV-B, e que tal agressão pode ser suprimida pelo uso de agentes antioxidantes, fármacos que possam atuar na via do estresse nitrosativo também devem ser investigados (CARRARA *et al.*, 2019; TERRA *et al.*, 2012a; TERRA *et al.*, 2012b). Neste contexto, um dos principais produtos antioxidantes relacionados à supressão dos danos secundários ao estresse oxidativo e nitrosativo é a riboflavina (SANCHES *et al.*, 2014).

A riboflavina (Fig. 6) (7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina), também conhecida como vitamina B2, é um dos principais agentes antioxidantes naturais atualmente descritos, sendo um composto hidrossolúvel desprovido de efeitos tóxicos e presente numa ampla variedade de alimentos, sobretudo leite e produtos lácteos, em carnes, peixes e vegetais de folhas escuras. Sua importância reside em ser precursora das coenzimas flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), requeridas em grande número de reações de oxirredução, algumas fundamentais para o metabolismo celular aeróbico. Dentre as oxidorreduções que utilizam o FAD como grupo prostético (denominadas flavoproteínas) destacam-se as enzimas succinato desidrogenase (componente do Ciclo de Krebs), acil-CoA-

desidrogenase (integrante da β -oxidação de ácidos graxos), NADH desidrogenase, citocromo P450 redutase, xantina oxidase/ desidrogenase e glutathiona redutase (POWERS, 2003).

Figura 6: Estrutura da riboflavina evidenciando o grupo flavina e o grupo ribitilo.



Fonte: adaptado de Rubert, Aline *et al.* (2017).

A absorção da riboflavina, por via oral, ocorre predominantemente no intestino delgado proximal, por meio de um processo de transporte mediado por carreador, onde podem ser absorvidas até 30 mg de riboflavina. Durante o processo de absorção, inicialmente a riboflavina livre é retomada pelos enterócitos e sofre fosforilação ATP-dependente catalisada por flavoquinases citoplasmáticas para formar a FMN. Outra porção da riboflavina é convertida em FAD por meio da enzima FAD-sintetase. Portanto, a riboflavina pode entrar no plasma na forma livre ou como FMN. A riboflavina livre pode ser transportada no plasma ligada à albumina ou a certas imunoglobulinas. A excreção urinária da riboflavina é proporcional à sua absorção. (POWERS, 2003; YUASA *et al.*, 2000).

A riboflavina tem demonstrado propriedades antioxidantes, protegendo tecidos contra o dano oxidativo. O potencial antioxidante da riboflavina está parcialmente relacionado à FAD, que atua como coenzima da glutathiona redutase, enzima responsável pela regeneração dos estoques celulares de glutathiona reduzida. Além disso, a atividade antioxidante de outras enzimas redutoras, como o NADPH e citocromo P450 redutase, também é dependente da riboflavina. O comprometimento da atividade dessas enzimas torna o organismo mais vulnerável à ação das EROs (TOYOSAWA *et al.*, 2004). De fato, Manthey *et al.* (2006) reportaram que a deficiência de riboflavina pode resultar em diminuição da atividade da glutathiona redutase e consequente aumento do dano oxidativo às proteínas e ao DNA.

Além do fato da riboflavina dar origem às flavoproteínas (FMN e FAD), diversos estudos têm apontado que o potencial antioxidante da riboflavina está também associado a seu

metabólito ativo, a di-hidrorriboflavina, uma molécula oriunda da redução da riboflavina pela ação da enzima flavina redutase dependente de NADPH. A di-hidrorriboflavina apresenta importante ação antioxidante mediante a redução do íon Fe^{4+} presente no grupo heme de algumas proteínas (BETZ *et al.*, 1994; MACK; HULTQUIST; SHLAFER, 1995). Na presença da enzima flavina redutase dependente de NADPH, a riboflavina é rapidamente convertida em di-hidrorriboflavina. Esta, ao entrar em contato com íons férricos circulantes, promove a redução destes, convertendo-os em íons ferrosos e evitando, dessa forma, a oxidação deliberada de lipídeos e proteínas pelos íons férricos circulantes (MACK; HULTQUIST; SHLAFER, 1995).

Alguns estudos demonstraram a atividade anti-inflamatória da riboflavina, como no trabalho de Toyosawa *et al.* (2004), em que a riboflavina aumentou significativamente as taxas de sobrevivência e reduziu os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- γ e MIP-2, e de NO em modelo experimental de sepse murina induzida por toxina ou por infecção bacteriana, por via endovenosa. Em outros modelos experimentais relacionados à lesão por isquemia e reperfusão (I/R), a administração de riboflavina resultou na diminuição da agressão tecidual em consequência do estresse oxidativo. Em um estudo de Iwanaga *et al.* (2007) que avaliou o potencial antioxidante e anti-inflamatório da riboflavina por meio de transplante cardíaco experimental em camundongos, ficou demonstrado que a riboflavina foi capaz de atenuar os efeitos da lesão miocárdica pela I/R hipotérmica, reduzindo acentuadamente o dano oxidativo, o infiltrado inflamatório neutrofilico e os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α , além de reduzir a resposta imune humoral e da vasculopatia pós-transplante, implicando assim em menor rejeição aguda do enxerto, aumentando a sobrevivência dos animais tratados com riboflavina em comparação ao grupo controle. Em outro estudo ficou demonstrado que a riboflavina protegeu o fígado de camundongos submetidos à lesão por isquemia e reperfusão (I/R normotérmica), em que a riboflavina agiu como protetora nos principais eventos que poderiam culminar em morte hepatocelular, como o intenso estresse oxidativo e a resposta inflamatória aguda, conferindo à riboflavina um possível papel de agente terapêutico contra lesões hepáticas por I/R (SANCHES *et al.*, 2014).

Em relação aos danos cutâneos, um estudo demonstrou que animais deficientes em riboflavina apresentaram dificuldades na cicatrização de feridas (LAKSHMI; LAKSHMI; BAMJI, 1989). O tratamento com riboflavina também foi relacionado a um melhor prognóstico nos casos de úlcera de córnea aguda em coelhos (COLOMBO-BARBOZA *et al.*, 2014).

Todavia, o efeito da aplicação tópica da riboflavina no processo de prevenção de danos secundários à exposição UV e sua capacidade de induzir reparo à pele lesada ainda é desconhecido. Assim, o objetivo do presente estudo é investigar o possível efeito antioxidante da riboflavina por via tópica e oral, na prevenção e recuperação de lesões na pele de animais expostos à radiação UV-A.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

As afecções cutâneas e os cânceres de pele são problemas de saúde mundiais, provocados essencialmente pela exposição exacerbada aos raios UV sem nenhuma proteção. A evolução para o câncer de pele ocorre principalmente pelo fotoenvelhecimento da pele, em decorrência do estresse oxidativo e de processos inflamatórios intensos provocados pela fotossensibilização da mesma, devido à radiação de raios UV. A neoplasia maligna mais diagnosticada mundialmente é o câncer de pele não melanocítico. Enquanto no Brasil, dados epidemiológicos mostram um aumento contínuo na incidência câncer de pele não melanoma e melanoma. Além disso, devido às características geográficas e tendências culturais, a população brasileira encontra-se entre os povos com a maior exposição anual ao sol, necessitando urgentemente de medidas eficazes para a prevenção do desenvolvimento de cânceres de pele provocados pelo fotoenvelhecimento. O processo de fotoenvelhecimento é iniciado, majoritariamente, pelo estresse oxidativo, sendo sequenciado pela resposta inflamatória, acarretando em eventos que podem culminar em lesões em todos os níveis celulares, inclusive ao DNA, levando assim às modificações das estruturas celulares da pele, ou até mesmo à morte celular. Nesta situação, estudos anteriores demonstraram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da riboflavina em diferentes órgãos como fígado, pulmões e coração, que acarretaram na diminuição da morte celular e na preservação destes órgãos, mas sem nenhum estudo que demonstrasse sua ação na pele. Neste cenário, os autores do presente estudo avaliaram se a riboflavina também foi capaz de exercer ação antioxidante, com consequente ação anti-inflamatória na pele. Para melhor esclarecimento das diferentes vias da possível ação terapêutica da riboflavina na pele, este trabalho avaliou a administração da riboflavina pelas vias tópica e oral. Além da relevância dos efeitos terapêuticos da riboflavina, esta vitamina também é capaz de oferecer outros benefícios como ser barata e ser desprovida de efeitos tóxicos. Além disso, por já ter sua utilização aprovada pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela Food and Drug Administration (FDA), a riboflavina pode ser obtida de maneira acessível, facilitando a praticidade de sua aplicação.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o papel antioxidante da riboflavina, comparando as vias de aplicação tópica e oral, sobre a pele de animais expostos à radiação UV-A.

3.2 ESPECÍFICOS

- Analisar se o modelo experimental foi compatível às lesões de fotoenvelhecimento, adaptado do modelo de Andrade *et. al.* 2015;
- Analisar a recuperação cutânea e o remodelamento dos depósitos de colágeno após a utilização da riboflavina em ratos irradiados com UV-A;
- Analisar os efeitos da riboflavina na proliferação celular e na expressão fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na pele de ratos que sofreram radiação UV-A;
- Analisar a ação antioxidante da riboflavina sobre o estresse oxidativo cutâneo, e seus efeitos nas vias de sinalização pró-inflamatórias após a radiação UV-A em ratos.

Materiais e Método

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

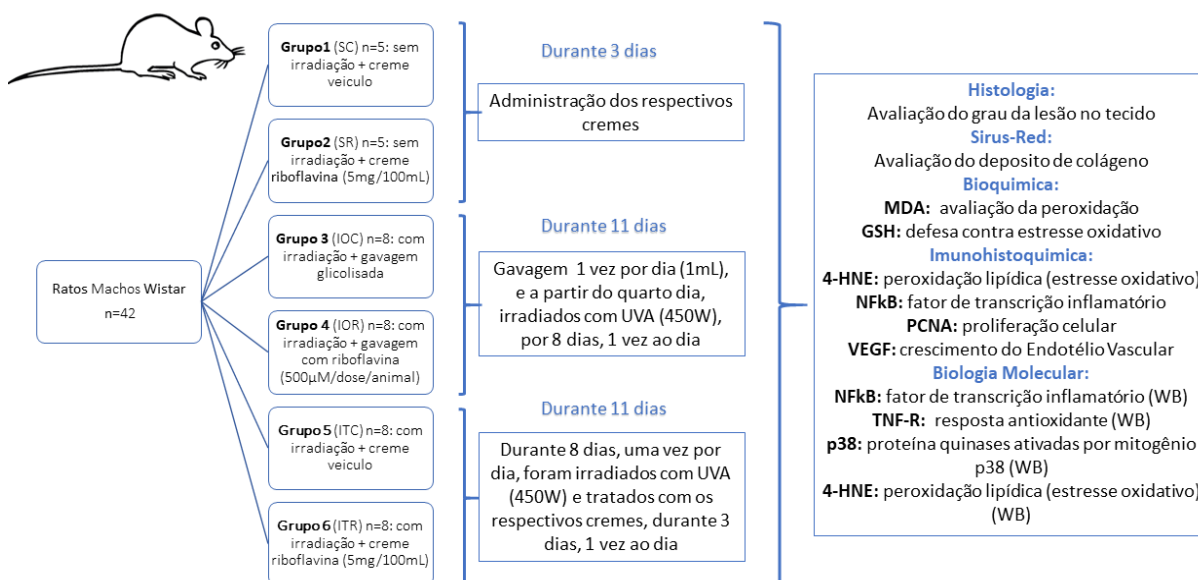
Ratos machos Wistar (n=42), pesando em torno de 200-250g, foram alojados em condições padrão, inclusive para temperatura e um ciclo claro/escuro de 12:12 h, com comida e água fornecidas ad libitum. Os procedimentos de gerenciamento de animais obedeceram aos Princípios Orientadores Internacionais para Pesquisa Biomédica envolvendo Animais. A justificativa, o design e os métodos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética Animal Local (n°110/2019) (Anexo A). Houve um esforço para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados.

4.2 AMBIENTES E GAIOLAS

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclos luz-escuro de 12 horas. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno com tampa de plástico, nas dimensões de 48,3 x 33,7 x 26,5cm, e divididos em 3 e 4 animais por caixa. Todos os animais foram adaptados às condições acima por no mínimo uma semana antes do início dos experimentos.

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 7: Fluxograma do delineamento experimental



Fonte: da autora, 2021.

Os animais tiveram os pelos da região do dorso removidos (4cm×8cm) com creme depilatório da marca Depilsam®, sendo subdivididos nos seguintes grupos:

1 (SC) - animais não irradiados e tratados com veículo tópico (vaselina), 1 vez ao dia por 3 dias (n=5);

2 (SR) - animais não irradiados e tratados com veículo tópico contendo riboflavina (5mg/100ml), 1 vez ao dia por 3 dias (n=5);

3 (IOC) - os animais receberam veículo (1 ml de solução glicofisiológica), por gavagem, 1 vez ao dia, por 11 dias e, a partir do quarto dia, foram irradiados com UV-A (8min/dia), por 8 dias (n=8);

4 (IOR) - os animais receberam veículo contendo riboflavina (500 µM/ml) por gavagem, 1mL, 1 vez ao dia, por 11 dias e, a partir do quarto dia, foram irradiados com UV-A (8min/dia), por 8 dias (n=8);

5 (ITC) - animais expostos à radiação UV-A (8min/dia), por 8 dias e tratados com veículo tópico (vaselina), 1 vez ao dia, por 3 dias (n=8);

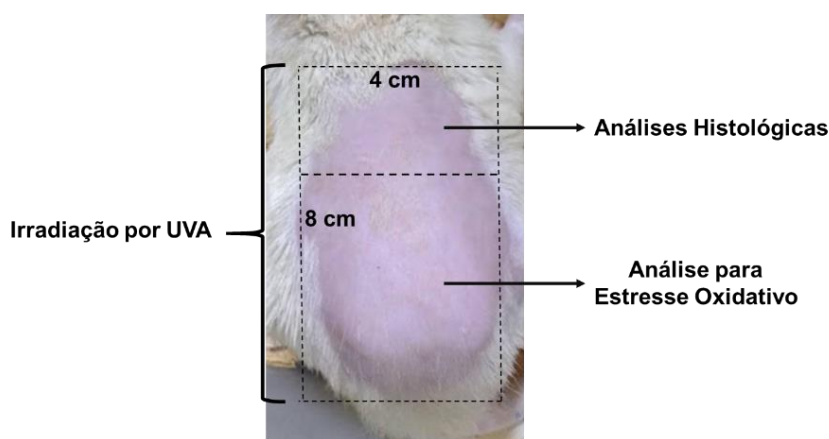
6 (ITR) - animais expostos à radiação UV-A (8min/dia), por 8 dias e tratados com veículo tópico contendo riboflavina (5mg/100ml), 1 vez ao dia por 3 dias (n=8).

Todos os procedimentos ocorreram sob anestesia com quetamina e xilasina

intramuscular com respectiva dose de 100 mg/kg de peso e 10 mg/kg de peso, com analgesia pós-irradiação com tramadol 20mg/Kg intraperitoneal.

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados sob anestesia com dose excessiva de quetamina e xilasina intramuscular. A pele do dorso dos animais foi dividida de modo sagital em 2 partes: uma área de 5 mm² de pele dorsal superior foi removida de animais irradiados com 2mm de adjacência, sendo fixada em formol tamponado a 10% por 24 horas e incluída em blocos de parafina para posteriores análises histológicas e imuno-histoquímicas; outra área de pele dorsal inferior foi resfriada imediatamente em nitrogênio líquido e estocada a -80°C, para análises gênicas e proteômicas; O mesmo procedimento foi realizado no grupo controle, no qual não sofreram radiação.

Figura 8: Imagem representativa de coleta e processamento de amostras. Uma área de 5 mm² de pele dorsal superior foi removida de animais irradiados com 2mm de adjacência para posterior análise histopatológica e imuno-histoquímica. Amostras de pele dorsal inferior foram removidas e armazenadas a -80°C para análise de estresse oxidativo local. O mesmo procedimento foi realizado no grupo controle, no qual não sofreram radiação.



Fonte: da autora, 2021.

4.4 DETERMINAÇÃO DA RADIAÇÃO UV-A

O modelo experimental de lesão cutânea por raios UV foi adaptado de Andrade *et al.* (2015), a radiação foi realizada através do equipamento para Fototerapia (Prolumina Equipamentos, São Paulo, Brasil), no qual foi equipado com lâmpadas UVA NB (PUV-A, com comprimento de onda de 100 a 315nm). A região dorsal total dos animais foi exposta a 450W de UV-A durante 8 min, 1 vez ao dia, durante 8 dias de 6,6mW/cm², sendo a dose acumulada de 25,34J/cm².

4.5. ADMINISTRAÇÃO DA RIBOFLAVINA

As doses de riboflavina utilizadas foram adaptadas do trabalho de SANCHES *et al.* (2014), utilizando concentrações de 500 µM/dose/animal.

4.5.1 Creme Dermatológico com Riboflavina

Os grupos ITC e ITR foram irradiados por UV-A (450W) por 8 dias (ANDRADE *et al.*, 2015). Após esse período o grupo ITC durante 3 dias receberam 20g de veículo (vaselina), uma vez ao dia. E o grupo ITR durante 3 dias receberam 20g de creme de Riboflavina (5mg/100mL; 500 µM/dose/animal).

4.5.2 Gavagem com Riboflavina

Os grupos IOC e IOR irradiados por UV-A (450W) por 8 dias. O grupo IOC durante 3 dias antes da irradiação, recebeu via oral, por meio de gavagem, 1,0mL de solução glicosalina (0,9%) e durante os 8 dias de irradiação. O grupo IOR durante 3 dias antes da irradiação, recebeu via oral, por meio de gavagem, 1,0mL de solução de Riboflavina (500 µM/dose/animal) diluída em solução glicosalina (0,9%) (n=8) (Sanches *et al.*, 2014), e durante os 8 dias de irradiação.

4.6 HISTOLOGIA

A partir do material parafinado foram realizadas preparações histológicas, coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E), nas quais foi estabelecida uma avaliação histológica qualitativa sobre os efeitos da radiação UV-A na pele, como: atrofia/hipertrofia da derme e anexos, morte celular, inflamação, ceratose, degeneração do colágeno, entre outros.

4.7. DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO

A deposição de colágeno foi avaliada através da coloração pelo Sirius red, estimando-se a porcentagem de área marcada em 30 campos microscópicos (400x), utilizando o software Image J (CAETANO *et al.*, 2016).

4.8 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Preparações da pele dos animais foram submetidas ao estudo imuno-histoquímico para avaliação do grau de marcação para o *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), 4-Hidroxinonenal (4-HNE), *Nuclear fator Kappa B* (NFκB) e *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). Lâminas contendo secções teciduais de 4 µm de espessura foram desparafinizadas, reidratadas, imersas em tampão citrato (10 mmol/L, pH 6.0) e submetidas a recuperação antigênica com vapor (Steamer) por 40 min. As lâminas foram lavadas com PBS e imersas em peróxido de hidrogênio 3% por 15 min para bloqueio da peroxidase endógena, e Bloqueio de proteína (Kit Reveal) por 10 min. As secções foram, então, incubadas com anticorpos primários específicos anti-PCNA (diluição 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), NFκB (diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), VEGF (diluição 1:100, Abnova, CA, USA) e 4-HNE (Ab31163, diluição 1:200, Abcam Plc, Cambridge, Reino Unido), durante 1 hora à temperatura ambiente e em câmara úmida. Após sucessivas lavagens em tampão fosfato (PBS), foi aplicado Bloqueador do Complemento por 10 min e Bloqueio do HRP por 10 min lavando com PBS e colocando o DAB (1:50) por 5 min. Na sequência, as amostras foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas com Permount (Fischer Scientific, PA, E.U.A.). O percentual de imunomarcação foi avaliado pela porcentagem de área marcada, utilizando o software Image J (CAETANO *et al.*, 2016).

4.9 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DO NFκB, TNF-R, 4-HNE E P38 MAPK POR WESTERN BLOTTING

Para quantificação da expressão proteica, fragmentos de pele (100 mg) foram homogeneizados, em 1 mL de tampão de lise (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,6, 0,1% Triton contendo inibidores de protease e fosfatases), com triturador de tecidos (Polytron, NJ, EUA). Os homogenatos foram incubados em gelo por 15 min e posteriormente centrifugados a 13.000 rpm à 4°C por 20 min. O sobrenadante contendo a solução de proteína foi coletado e aliquoteado. A concentração de proteína foi mensurada pelo método colorimétrico BCA (Thermo Fisher, Illinois, USA). 50 µg de proteína foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida à 12% e transferidas para membrana de PVDF. Após bloqueio com solução TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 e 5% de leite desnatado por 2 horas à temperatura ambiente, a membrana foi incubada “overnight” à 4°C com anticorpos primários

contra as seguintes proteínas: 1. subunidade p65 NF κ B (sc-8008, clone C-20, diluição 1:200, Santa Cruz, CA, USA), 2. TNF-R (sc-7895, diluição 1:200, Santa Cruz, CA, USA), 3. 4-HNE (ab46545, diluição 1:1000, Abcam), 4. p38 *mitogen-activated protein kinases* (p38-MAPK) (Clone P3-TY, diluição 1:500, Sigma), e como controle endógeno para normalização foi usado o gene GAPDH (ab181602, diluição 1:1000, Abcam). O anticorpo secundário foi utilizado na proporção 1:10.000 em TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 e 5% de leite desnatado, com incubação por 1 hora. Foram realizados 3 ciclos de lavagem com TBS contendo 0,05% Tween 20 entre as incubações das membranas. ECL primer (Amersham Biosciences) foi o reagente utilizado para revelar o sinal quimioluminescente. As imagens foram fotografadas no equipamento ChemiDocTM XRS (BioRad). Utilizamos o software Image Lab (BioRad) para quantificar a intensidade das bandas. A normalização foi medida pela expressão do gene endógeno GAPDH.

4.10 ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELA QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO

A análise da peroxidação lipídica foi feita seguindo a metodologia proposta por Gererd-Monnier *et al* (1998). Amostras de peles (100mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M e centrifugadas por 4.000 rpm a 4°C por 5min. A seguir, 200 uL do sobrenadante foram adicionados à 650 uL de uma solução de 10 mM de 1-metil-2-fenilindol em acetonitrila diluída em metanol (proporção 2:1 v/v) (Sigma-Aldrich), em seguida 150 ml de ácido hidrocloreídrico à 37% foram adicionados à reação. Após breve agitação, os tubos foram incubados por 40 min a 45°C. Em seguida os tubos foram resfriados e centrifugados 4000 rpm 4°C 10 min. Para a curva padrão de malondialdeído (MDA), foi utilizado o produto de uma reação de hidrólise de 1,1,3-3 – tetrametoxipropano (TMP) em ácido sulfúrico a 1%. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 586 nm, em espectrofotômetro (BioMate, Thermo Scientific). Os resultados foram expressos em nanomoles de MDA pelo peso da amostra em gramas (nmol/g amostra).

4.11 DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A quantificação da GSH foi realizada por método colorimétrico baseado na reação do grupo sulfidril com 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) DTNB e leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 412 nm. 100 mg de pele foram

homogeneizados, no Homomix, em solução de EDTA 0,02M, sob gelo. Desta suspensão homogênea foi retirada uma alíquota para determinação da concentração proteica (método Bradford) e posterior normalização da quantificação. Foi adicionado 1 mL de água miliQ e 0,25 mL de ácido tricloroacético 50% (Sigma-Aldrich) em 1,25 mL do homogenato. A solução permaneceu em repouso por 15 min e posteriormente foi centrifugada a 4.000 rpm por 15 min em temperatura ambiente. 1 mL deste sobrenadante foi transferido para um tubo onde foram adicionados 2 mL de solução Tris-HCL 0,4M, pH 8,9 e 50 µL de DTNB (ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzóico) (Sigma-Aldrich). Após 5 min de repouso, a leitura da absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmoles por miligrama de proteína (nmol/mg proteína). A concentração foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02M).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 A RIBOFLAVINA INDUZ REPARO DA PELE IRRADIADA COM UV-A

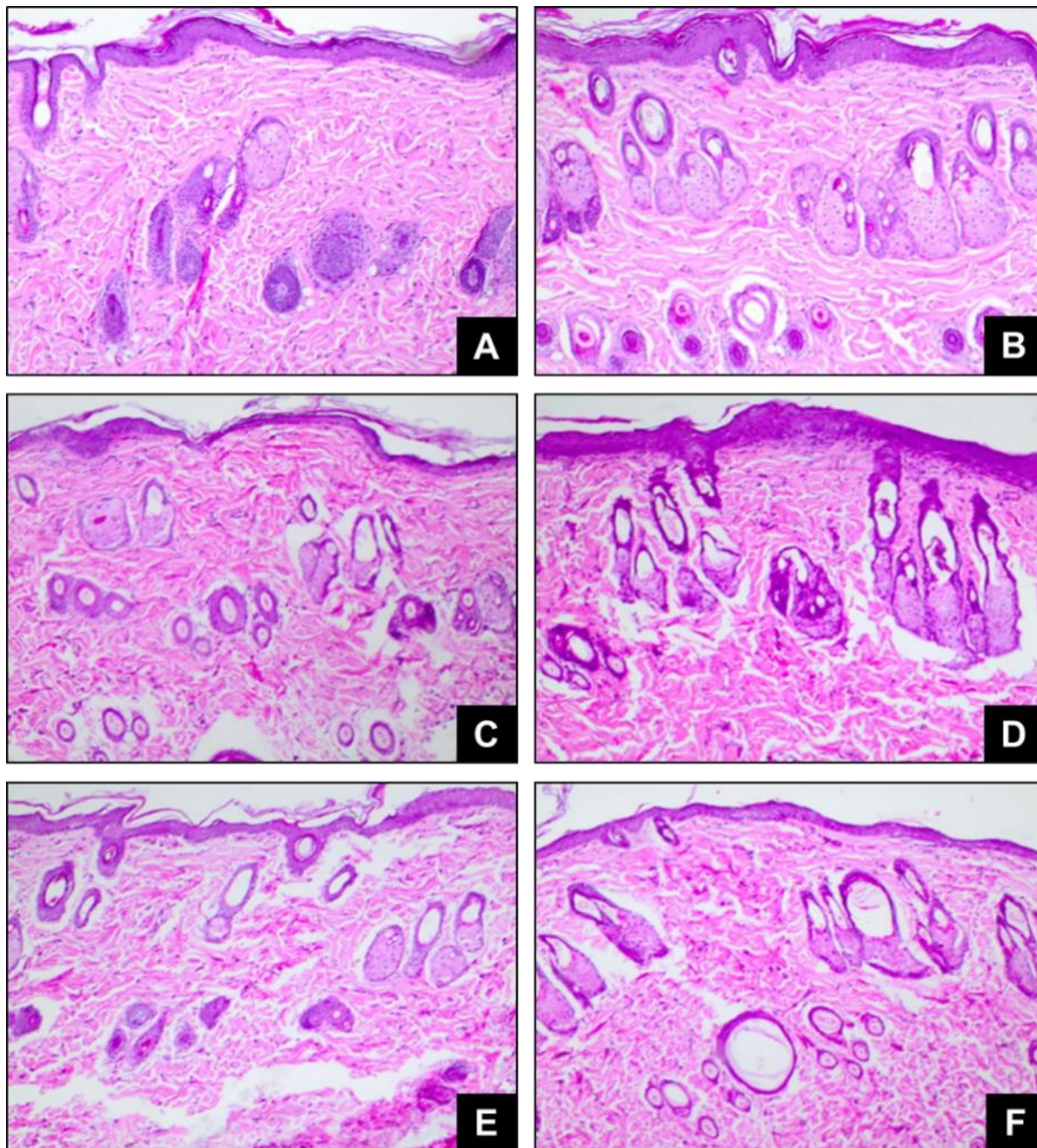
5.1.1A riboflavina reestabeleceu a arquitetura usual da pele irradiada com UV-A

Os animais dos grupos não irradiados tratados com veículo (SC) ou veículo com riboflavina (SR) apresentaram epiderme com espessura adequada, respeitando a arquitetura usual entre células maduras e basais, mantendo a produção normal de queratina. As fibras colágenas estavam alongadas e bem estruturadas na derme, sem degeneração basofílica. Abundantes glândulas e anexos puderam ser observados (Fig. 9A e 9B, respectivamente).

A avaliação histológica demonstrou também que os animais do grupo irradiado com UV-A e tratado com veículo sem riboflavina por via oral (IOC) apresentaram lesões cutâneas características de radiação, como epiderme delgada, eventual presença de bolhas epidérmicas, discreto espessamento da camada córnea, desorganização do colágeno com ocasional degeneração basofílica e diminuição de glândulas e anexos (Fig. 9C). Por outro lado, os animais do grupo irradiado com UV-A e tratado com veículo contendo riboflavina por via oral (IOR) apresentaram epiderme mais espessa, raras bolhas epidérmicas, sendo que as mesmas se encontraram de tamanho reduzido, camada córnea com espessura usual, além de colágeno mais organizado e maior número de glândulas e anexos (Fig. 9D).

Similarmente, os animais irradiados com UV-A e tratados com veículo sem riboflavina, por via tópica, (ITC) também apresentaram epiderme delgada, eventual presença de bolhas epidérmicas, aumento focal da camada córnea, desorganização do colágeno com ocasional degeneração basofílica e diminuição de glândulas e anexos (Fig. 9E). Todavia, os animais irradiados com UV-A e tratados com riboflavina, via tópica, (ITR) apresentaram discreta melhora em relação aos tratados apenas com veículo, como a epiderme levemente mais espessa, menor quantidade de bolhas epidérmicas e fibras colágenas menos desorganizadas ou degeneradas. No entanto, estes efeitos foram mais insipientes quando comparados ao grupo tratado por via oral (IOR) (Fig. 9F).

Figura 9: Fotomicrografias representativas da histologia da pele de animais dos grupos SC (A), SR (B), IOC (C), IOR (D), ITC (E), ITR (F) (H&E, 20×).

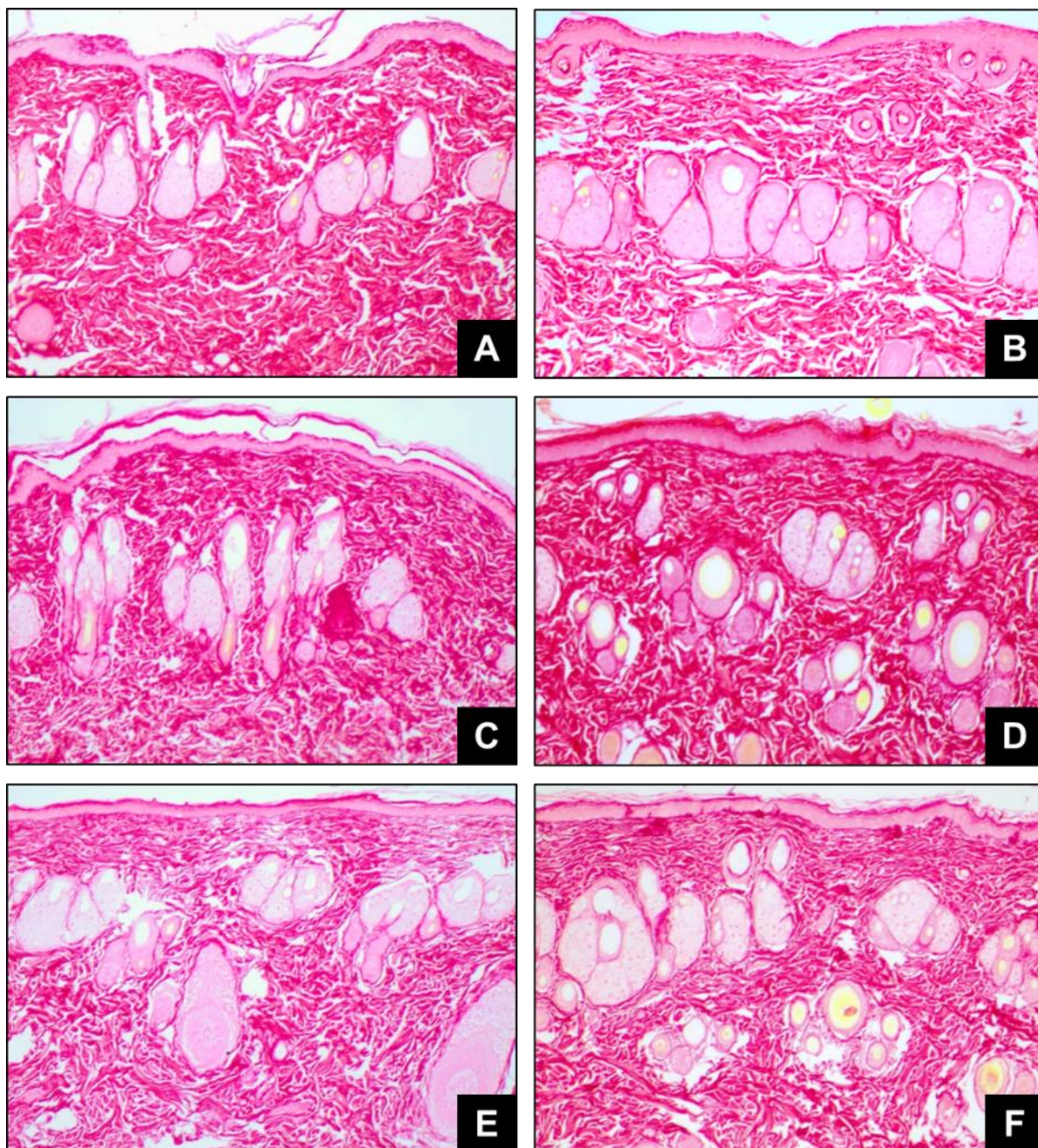


Fonte: da autora, 2021.

5.2. A RIBOFLAVINA REMODELOU OS DEPÓSITOS DE COLÁGENO APÓS RADIAÇÃO UV-A

A avaliação histoquímica pelo Sirius red demonstrou que os animais do grupo não irradiados tratados com veículo com ou sem riboflavina (SR e SC, respectivamente) apresentaram estrutura cutânea adequada, com deposição usual de colágeno, além de fibras colágenas alongadas e bem estruturadas (Fig. 10B e 10A). Os animais irradiados que receberam riboflavina por via oral (IOR) apresentaram fibras colágenas mais organizadas e com recuperação dos depósitos de colágeno (Fig. 10D) em comparação aos animais do grupo IOC, tratados com veículo (Fig. 10C). Os animais irradiados tratados apenas com veículo tópico (ITC) apresentaram diminuição e desorganização das fibras colágenas (Fig. 10E), enquanto que os animais irradiados e tratados com riboflavina tópica (ITR) apresentaram fibras colágenas mais organizadas quando comparados ao grupo ITC, embora isso não tenha se traduzido em aumento da deposição de colágeno (Fig. 10F).

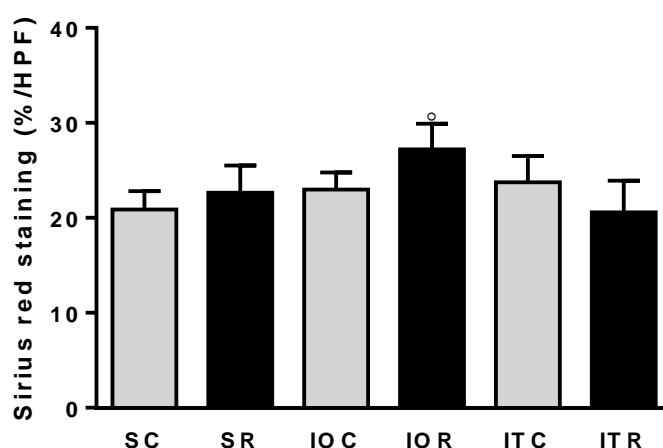
Figura 10: Fotomicrografias representativas da marcação histoquímica de Sirius-Red pele de animais dos grupos SC (A), SR (B), IOC (C), IOR (D), ITC (E), ITR (F) (Sirius Red, 20×).



Fonte: da autora, 2021.

O Gráfico 1 apresenta a quantificação da deposição de colágeno em cada grupo. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre a deposição de colágeno nos animais não irradiados tratados com veículo (20,87±0,88) ou com riboflavina (22,65±1,28) ($P>0,05$). Nos animais irradiados com UV-A podemos notar um aumento significativo na produção de colágeno no grupo que recebeu riboflavina por via oral (27,23±1,90) em relação ao grupo tratado apenas com o veículo (22,98±1,33) ($P=0,01$). Não foi observada diferença estatística entre os depósitos de colágeno nos grupos irradiados com UV-A e tratados topicamente com veículo sem riboflavina (23,74±1,98) ou com riboflavina (20,59±2,68) ($P>0,05$).

Gráfico 1. Quantificação da deposição de colágeno na pele de animais não irradiados topicamente tratados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados e topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P<0,05$, IOC×IOR.

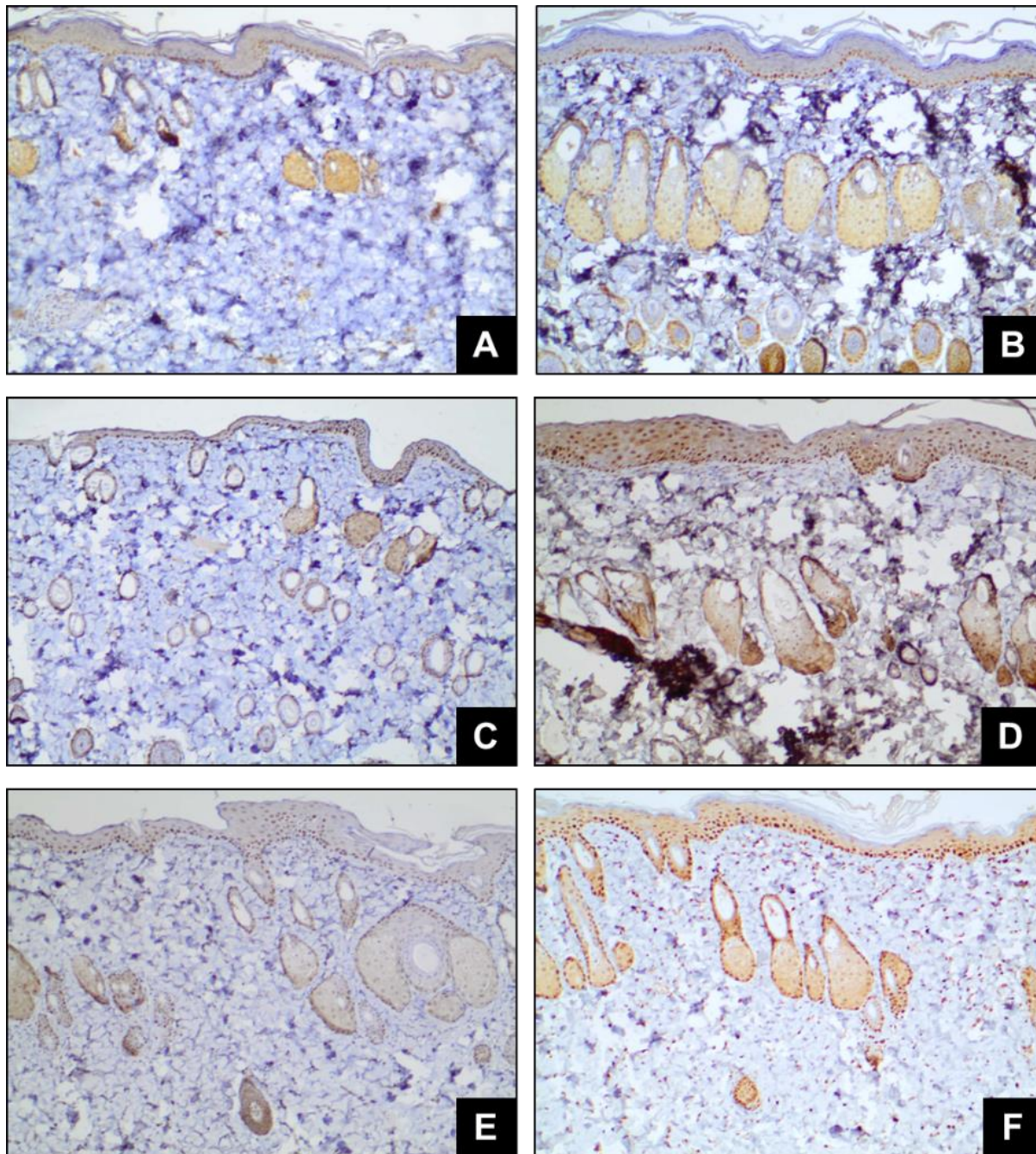


Fonte: da autora, 2021.

5.3 A RIBOFLAVINA ESTIMULOU A EXPRESSÃO DE CAPACIDADE PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS

As fotomicrografias demonstram a marcação imuno-histoquímica pelo PCNA na pele dos animais dos grupos SC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR (Fig. 11 A-F). Nos animais que não sofreram radiação, a utilização ou não de riboflavina não interferiu com a proliferação celular (Fig. 11A e 11B). Já os grupos de animais que sofreram radiação e foram tratados com riboflavina, tanto por via oral (Fig. 11D), quanto por via tópica (Fig. 11F) apresentaram expressiva proliferação celular quando comparadas aos grupos irradiados e não tratados com riboflavina, por via oral (Fig. 11C) e por via tópica (Fig. 11E).

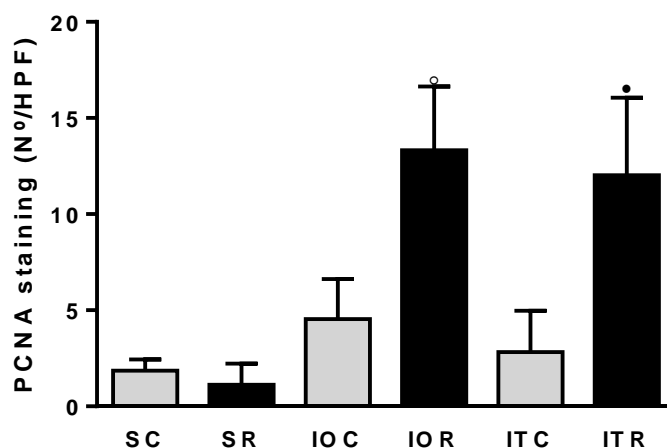
Figura 11: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica de PCNA na pele de animais dos grupos SC (A), SR (B), IOC (C), IOR (D), ITC (E), ITR (F) (PCNA, 20×).



Fonte: da autora, 2021.

A quantificação de PCNA expressa no Gráfico 2, mostra que nos animais não irradiados, a administração tópica de riboflavina ou do veículo, não foi capaz de estimular a proliferação celular ($1,85\pm 0,29$ e $1,13\pm 0,49$, respectivamente) ($P>0,05$). Todavia, os animais que sofreram radiação por UV-A tratados com riboflavina por via oral ($13,33\pm 1,48$) ou tópica ($12,02\pm 1,52$) apresentaram aumento significativo na expressão de capacidade proliferativa das células em relação aos animais que foram tratados apenas com o veículo, tanto por via oral quanto tópica ($4,54\pm 0,93$ e $2,82\pm 1,08$, respectivamente) ($P=0,0079$ e $P=0,0061$, respectivamente).

Gráfico 2. Quantificação da marcação imuno-histoquímica de PCNA na pele de animais não irradiados tratados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P<0,05$, $\text{IOC}\times\text{IOR}$ e $\bullet = P<0,05$, $\text{ITC}\times\text{ITR}$.

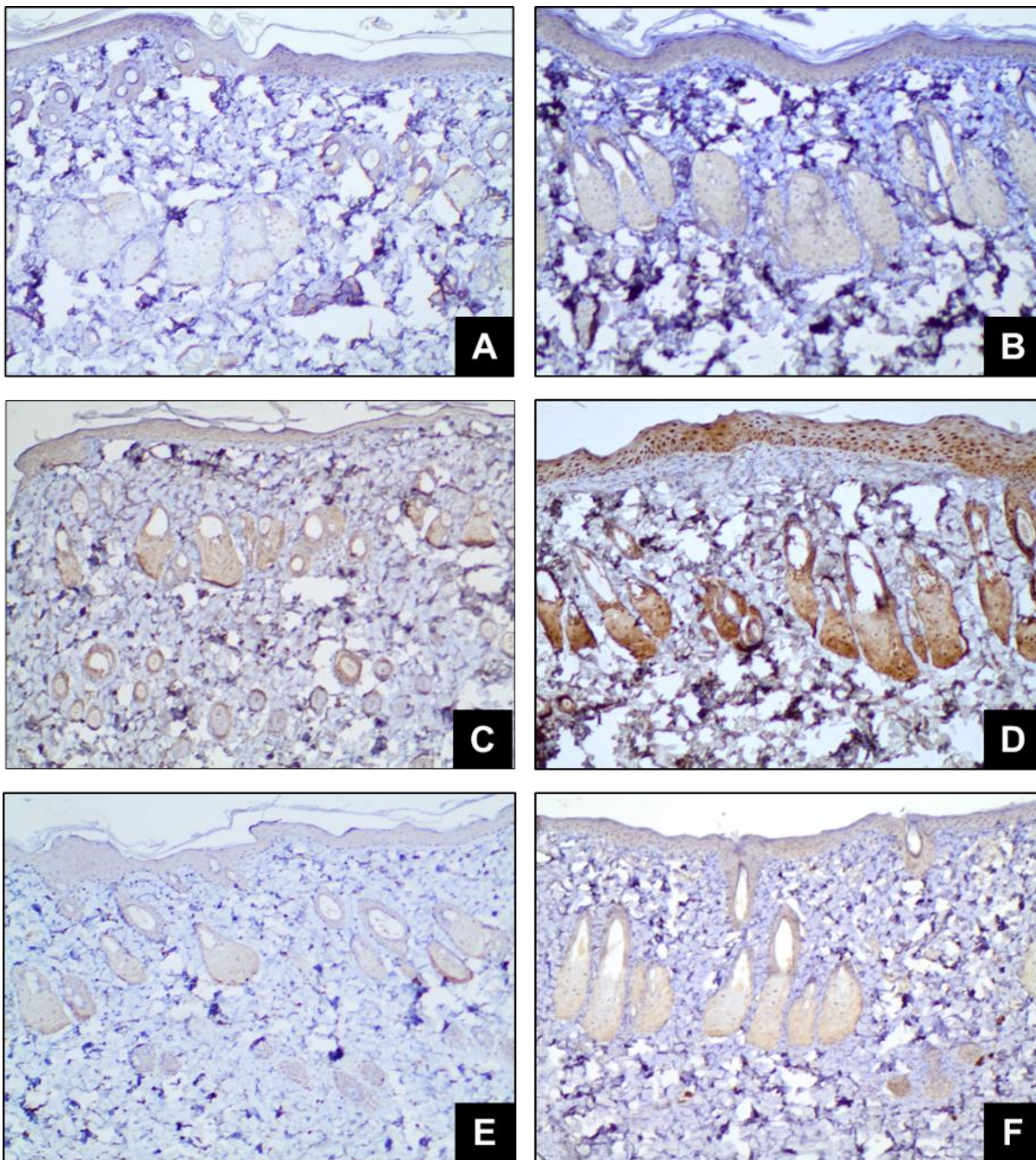


Fonte: da autora, 2021.

5.4 A RIBOFLAVINA AUMENTOU A EXPRESSÃO DO VEGF

As fotomicrografias demonstram a marcação imuno-histoquímica pelo VEGF na pele dos animais dos grupos SC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR (Fig. 12 A-F). Não houve diferença na marcação de VEGF nos animais não irradiados tratados ou não com riboflavina (Fig. 12A e Fig. 12B), enquanto os animais tratados com riboflavina por via oral (Fig. 12D) e por via tópica (Fig. 12F) apresentaram expressiva marcação para VEGF quando comparados aos grupos irradiados tratados com o veículo, tanto por via oral (Fig. 12C), quanto por via tópica (Fig. 12E).

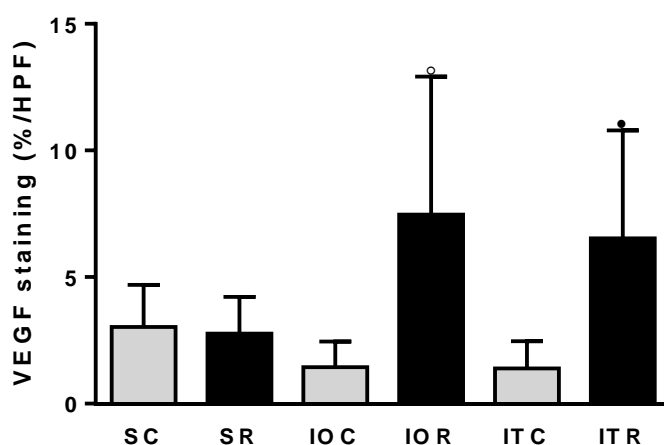
Figura 12: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica de VEGF da pele de animais dos grupos SC (A), SR (B), IOC (C), IOR (D), ITC (E), ITR (F) (VEGF, 20×)



Fonte: da autora, 2021.

Assim como ocorreu com a marcação pelo PCNA, não foi observada diferença significativa na expressão de VEGF entre os animais não irradiados tratados apenas com o veículo ($3,03\pm 0,74$) ou com veículo e riboflavina ($2,77\pm 0,65$) ($p>0,05$). Por outro lado, os animais irradiados e que receberam riboflavina por via oral ou tópica ($7,46\pm 2,06$ e $6,53\pm 1,61$, respectivamente), apresentaram aumento significativo na marcação pelo VEGF em relação aos animais tratados apenas com o veículo ($1,45\pm 0,50$ e $1,39\pm 0,48$, respectivamente) ($P=0,0121$ e $P=0,0177$, respectivamente) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Quantificação da marcação imuno-histoquímica de VEGF na pele de animais não irradiados tratados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P<0,05$, $\text{IOC}\times\text{IOR}$ e $\bullet = P<0,05$, $\text{ITC}\times\text{ITR}$.



Fonte: da autora, 2021.

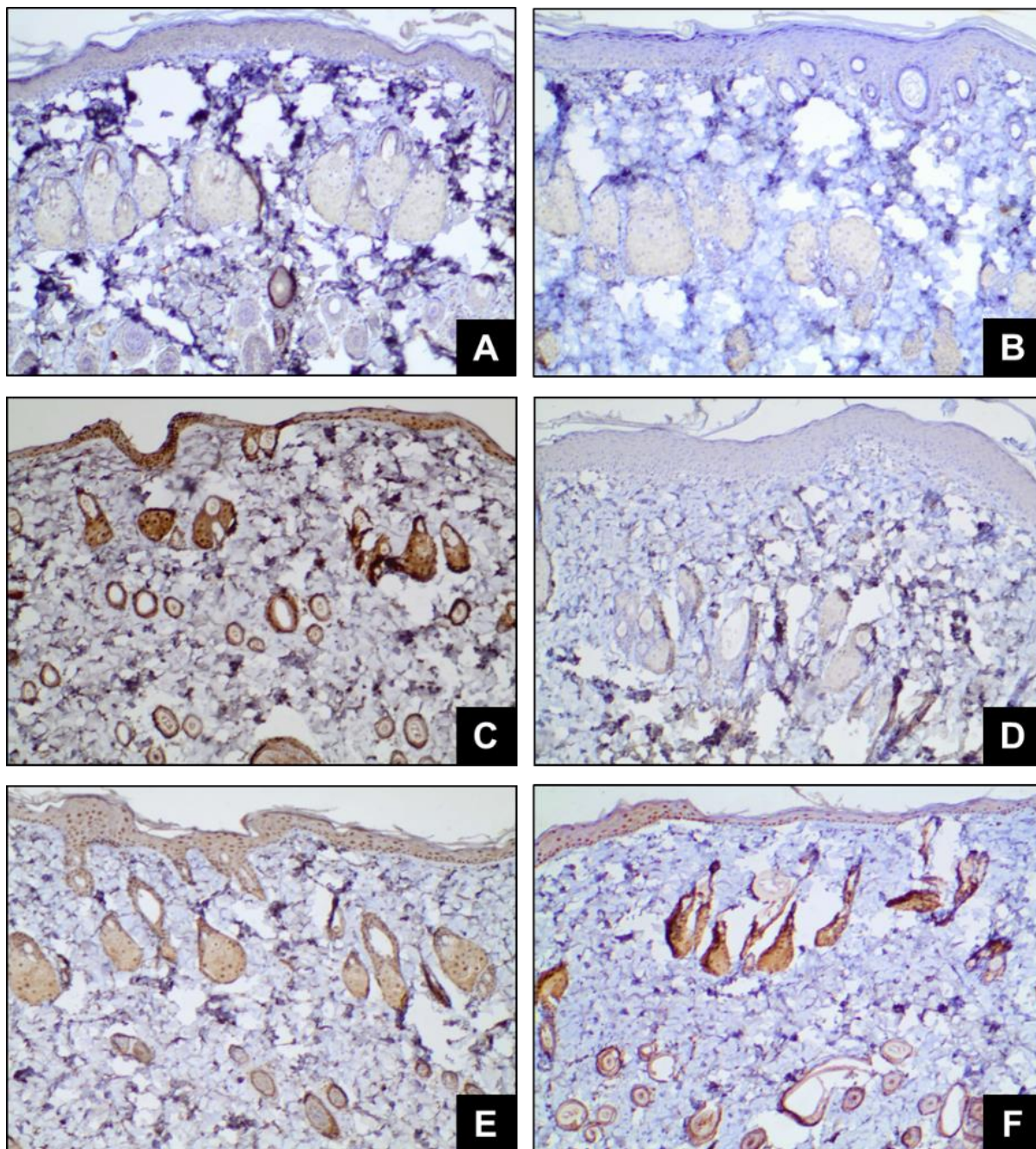
5.5 A RIBOFLAVINA REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO PELA IRRADIAÇÃO UV-A

5.5.1. A riboflavina diminuiu a expressão do 4-HNE

As fotomicrografias demonstram a marcação imuno-histoquímica pelo 4-HNE na pele dos animais dos grupos CC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR (Fig. 13 A-F), na qual se observa que os animais não irradiados, tratados (Fig. 13B) ou não com riboflavina (Fig. 13A) apresentaram expressão basal de 4-HNE. Os grupos irradiados e tratados apenas com veículo por via oral ou tópica (Fig.13C e Fig.13E, respectivamente) tiveram aumento na marcação de

4-HNE, mas que regrediu em vigência do tratamento com riboflavina (Fig. 13D e Fig. 13F, respectivamente).

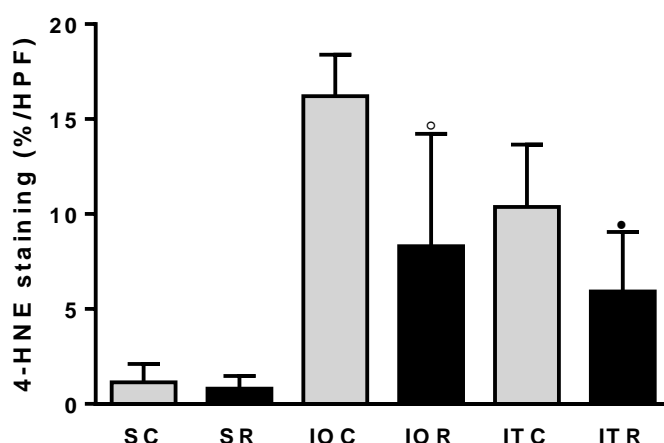
Figura 13: Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de 4-HNE da pele dos grupos SC (A), SR (B), IOC (C), IOR (D), ITC (E), ITR (F) (4-HNE, 20×).



Fonte: da autora, 2021.

O gráfico 4 apresenta a marcação pelo 4-HNE, onde nota-se que os animais que não sofreram radiação tratados tanto com veículo ($1,15\pm 0,43$) quanto com riboflavina ($0,81\pm 0,30$), apresentaram baixa expressão para o 4-HNE, sem diferença estatística entre eles ($P>0,05$). Entretanto, houve aumento da marcação para 4-HNE nos animais irradiados tratados com veículo por via oral ($16,21\pm 0,89$) ou tópica ($10,38\pm 1,34$). O tratamento com riboflavina promoveu diminuição significativa na expressão de 4-HNE por ambas as vias ($8,90\pm 1,85$ e $5,93\pm 1,28$, respectivamente) ($P=0,0087$ e $P=0,0411$, respectivamente).

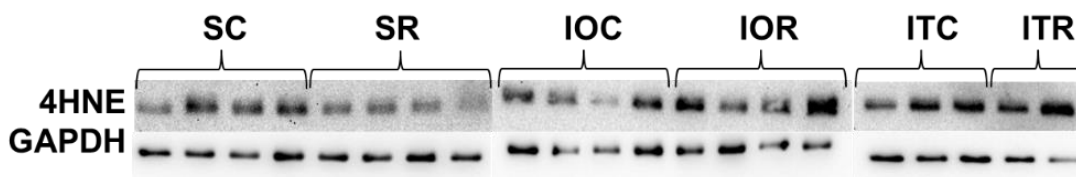
Gráfico 4. Quantificação da marcação imuno-histoquímica do 4-HNE na pele de animais não irradiados tratados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P<0,05$, $\text{IOC}\times\text{IOR}$ e $\bullet = P<0,05$, $\text{ITC}\times\text{ITR}$.



Fonte: da autora, 2021.

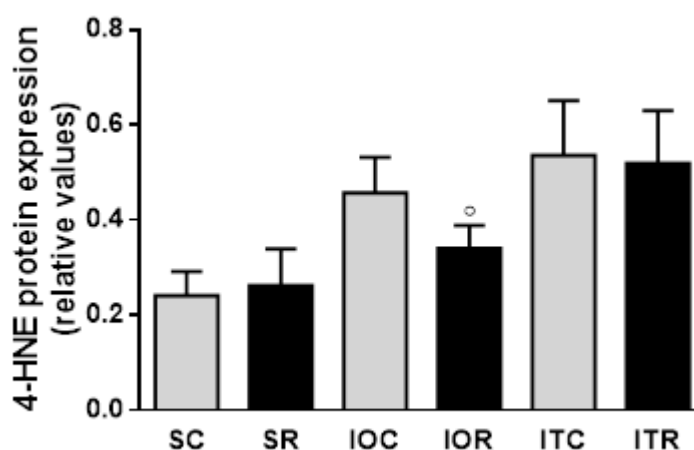
A Figura 14 demonstra a expressão proteica de 4-HNE determinada por Western Blotting na pele dos animais dos grupos CC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR. Não houve diferença significativa entre os animais não irradiados tratados com veículo ($0,24\pm 0,01$) ou com riboflavina ($0,26\pm 0,03$) ($P>0,05$). Os animais irradiados tratados por via oral com riboflavina ($0,33\pm 0,02$) apresentaram diminuição significativa na expressão do 4-HNE em relação aos animais tratados apenas com veículo ($0,45\pm 0,03$) ($P=0,048$). No entanto, os animais irradiados tratados com veículo tópico, acrescido ou não com riboflavina, não apresentaram diferenças significativas ($0,54\pm 0,05$ e $0,52\pm 0,06$, respectivamente) ($P>0,05$) (Gráfico 5).

Figura 14: Expressão proteica de 4-HNE por meio da técnica de Western Blotting.



Fonte: da autora, 2021.

Gráfico 5. Quantificação da expressão da proteína de 4-HNE por Western Blotting na pele de animais não irradiados tratados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P < 0.05$, $\text{IOC} \times \text{IOR}$.

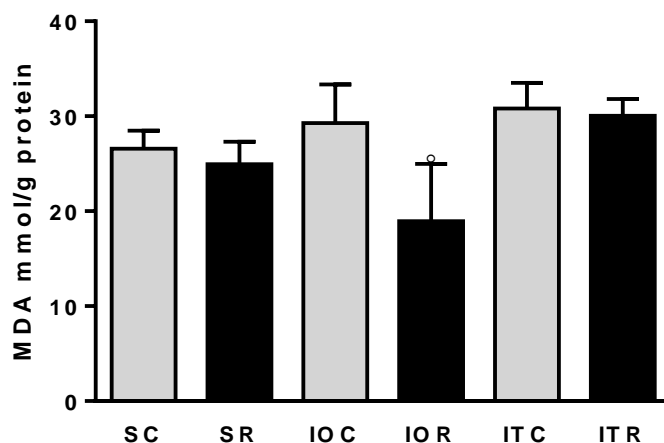


Fonte: da autora, 2021.

5.6. A RIBOFLAVINA REDUZIU A QUANTIDADE DE MDA

O gráfico 6 demonstra os níveis teciduais de MDA na pele dos animais dos grupos SC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR. Os animais que não sofreram radiação e foram tratados tanto com veículo sem riboflavina ($26,59 \pm 1,34$), quanto com riboflavina ($24,96 \pm 1,05$), apresentaram níveis fisiológicos de MDA, não apresentando diferença estatística entre eles ($P > 0,05$). A radiação promoveu aumento dos níveis de MDA nos animais tratados por via oral ou tópica apenas com o veículo ($29,28 \pm 1,67$; $30,81 \pm 1,35$ respectivamente). Contudo, nos animais irradiados, o tratamento com riboflavina promoveu diminuição significativa dos níveis de MDA apenas no grupo de animais tratados por via oral ($18,95 \pm 3,02$) ($P = 0,022$), sem apresentar diferença estatística no grupo de animais tratados com riboflavina por via tópica ($30,04 \pm 0,80$) ($P > 0,05$).

Gráfico 6. Quantificação tecidual do MDA na pele de animais não irradiados tratados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P < 0.05$, IOC \times IOR.

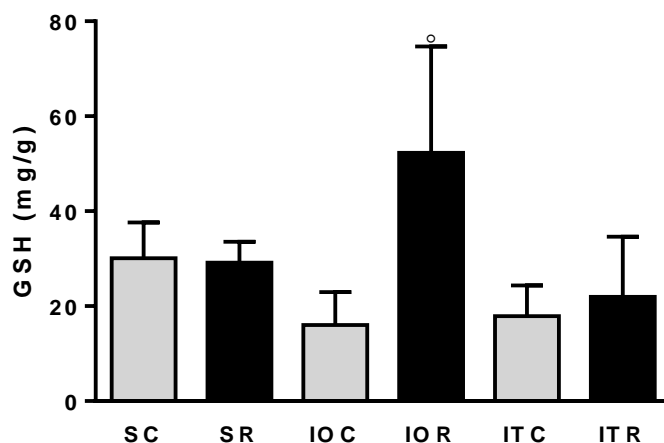


Fonte: da autora, 2021.

5.7 A RIBOFLAVINA AUMENTOU OS DEPÓSITOS DE GSH

O gráfico 7 demonstra os níveis teciduais de GSH na pele dos animais dos grupos SC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR. Os animais que não sofreram radiação tratados ou não com riboflavina ($29,18 \pm 2,18$ e $30,10 \pm 3,78$, respectivamente) apresentaram níveis preservados de GSH, sem diferença estatística entre eles ($P > 0,05$). No entanto, a radiação promoveu diminuição nos níveis de GSH nos grupos tratados com veículo por via oral ($16,03 \pm 3,46$) e por via tópica ($17,90 \pm 3,22$). Entretanto, o grupo tratado com riboflavina por via oral apresentou significativa recuperação dos níveis de GSH ($52,30 \pm 11,20$) ($P = 0,028$), mas o mesmo efeito não pôde ser observado no grupo tratado com riboflavina por via tópica ($21,98 \pm 6,34$) ($P > 0,05$).

Gráfico 7. Quantificação tecidual da GSH na pele de animais não irradiados tratados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P < 0.05$, IOC \times IOR.



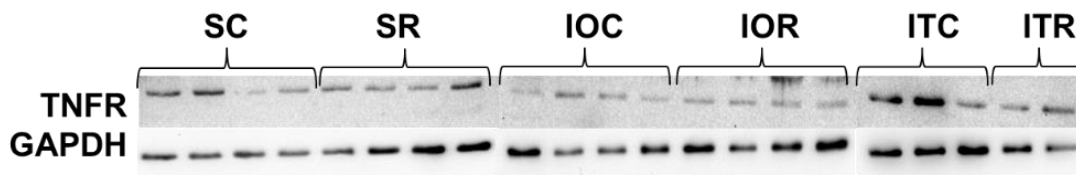
Fonte: da autora, 2021.

5.8 A RIBOFLAVINA DIMINUIU A INFLAMAÇÃO CUTÂNEA PROVOCADA PELA RADIAÇÃO UV-A

5.8.1. A riboflavina reduziu a expressão do receptor de TNF α (TNFR)

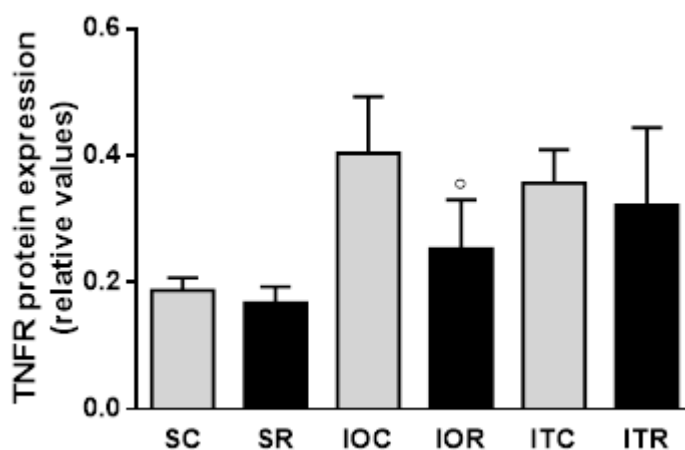
A Figura 15 mostra a expressão proteica de TNFR avaliada por Western Blotting na pele dos animais dos grupos CC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR. Os animais que não sofreram radiação e foram tratados ou não com riboflavina ($0,17 \pm 0,01$ e $0,19 \pm 0,01$, respectivamente), não apresentaram alteração na expressão dos níveis da proteína TNFR ($P > 0,05$). A radiação promoveu aumento na expressão proteica de TNFR no grupo tratado oralmente apenas com veículo ($0,40 \pm 0,03$), mas houve significativa diminuição dessa proteína no grupo tratado com riboflavina ($0,25 \pm 0,02$) ($P = 0,0022$). O grupo irradiado tratado topicamente com veículo também apresentou aumento na expressão proteica de TNFR ($0,36 \pm 0,01$), entretanto não houve redução de seus valores, mesmo com a adição de riboflavina ao veículo ($0,32 \pm 0,04$) ($P > 0,05$) (Gráfico 8).

Figura 15: Expressão proteica de TNFR por meio da técnica de Western Blotting.



Fonte: da autora, 2021.

Gráfico 8. Quantificação da expressão proteica de TNFR por Western Blotting na pele de animais não irradiados tratados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P < 0.05$, IOC \times IOR.

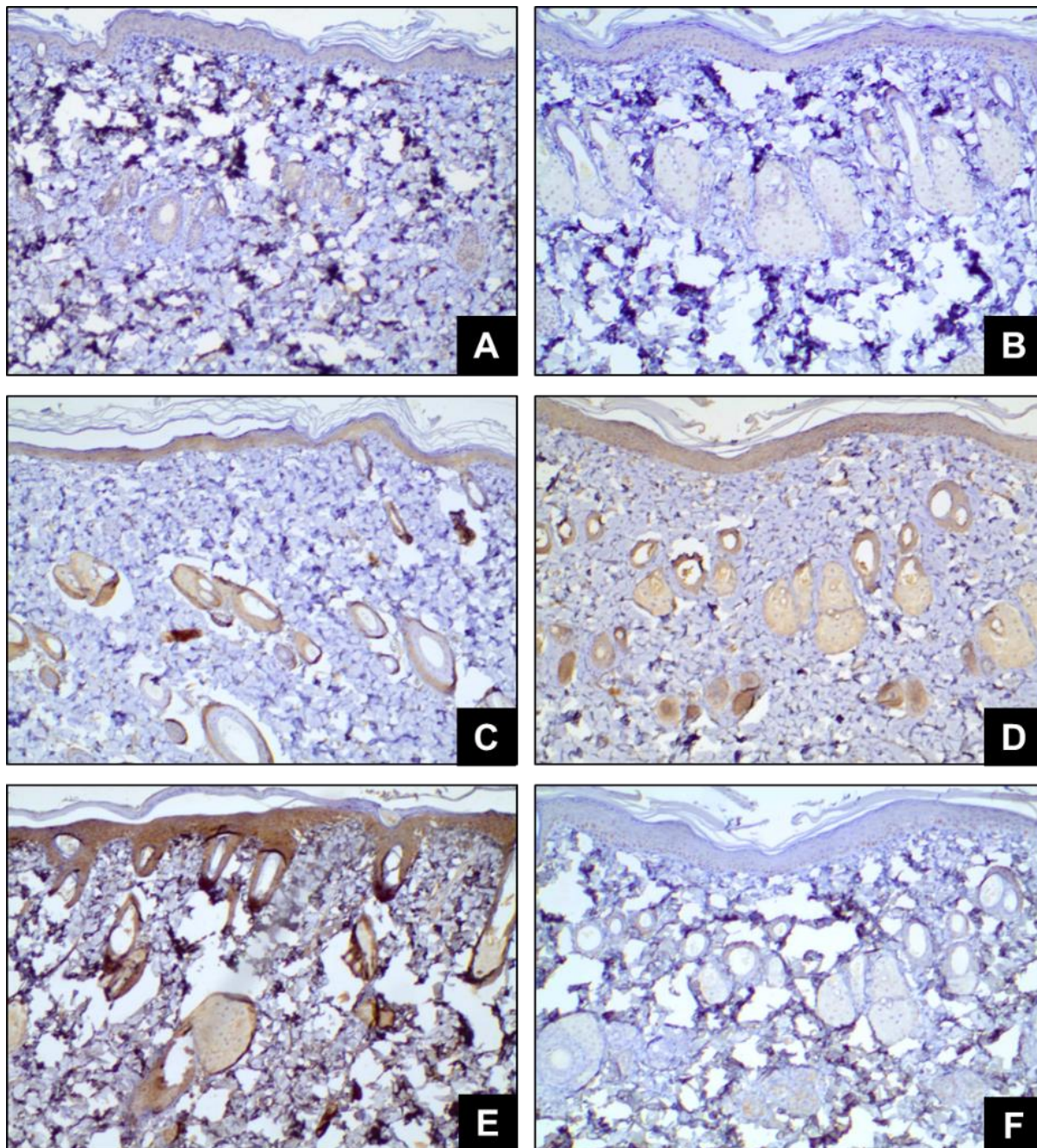


Fonte: da autora, 2021

5.9. A RIBOFLAVINA INIBIU A EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF κ B

A Figura 16 demonstra as fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica pelo NF κ B na pele dos animais dos grupos SC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR (Fig. 16 A-F) onde se observa que não houve diferença na marcação de NF κ B nos animais não irradiados e tratados com veículo (Fig. 16A) ou tratados com riboflavina (Fig. 16B). Houve uma maior expressão de NF κ B de modo similar nos animais irradiados tratados oralmente com veículo (Fig. 16C) e com riboflavina adicionada ao veículo (Fig. 16D). Entretanto, os animais irradiados e tratados com riboflavina por via tópica (Fig. 16F) apresentaram diminuição na marcação do NF κ B, em comparação aos não tratados (Fig. 16E).

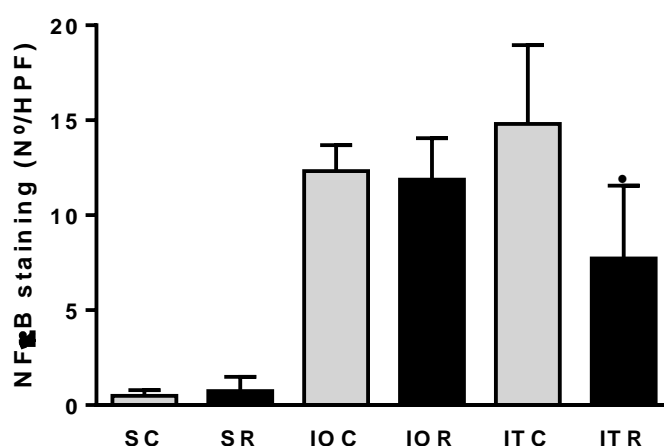
Figura 16: Fotomicrografias representativas da pele dos grupos SC (A), SR (B), IOC (C), IOR (D), ITC (E), ITR (F) (NF κ B, 20x).



Fonte: da autora, 2021.

O gráfico 9 representa a quantificação da marcação imuno-histoquímica de NFκB demonstrando que a marcação do NFκB se apresentou baixa nos animais que não sofreram radiação tanto não tratados ($0,49\pm 0,09$), quanto tratados com riboflavina ($0,73\pm 0,28$), sem apresentar diferença estatística entre eles ($P>0,05$). Nos animais tratados com veículo sem riboflavina por via oral ($12,33\pm 0,40$) houve aumento na expressão de NFκB, em que não pode ser revertido pela ação da riboflavina ($11,53\pm 0,77$) ($P>0,05$). No entanto, nos animais irradiados tratados com riboflavina por via tópica ($8,51\pm 1,10$) ocorreu diminuição significativa na expressão de NFκB em relação aos animais irradiados tratados com o veículo por via tópica ($14,80\pm 1,36$) ($P=0,035$).

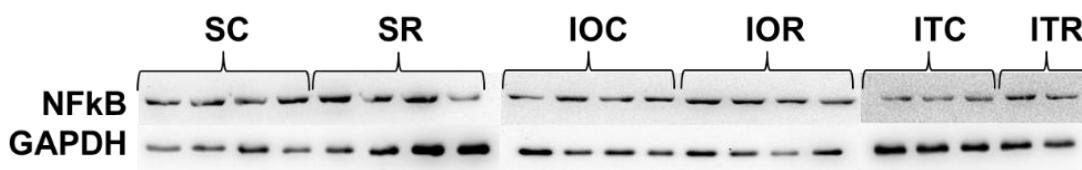
Gráfico 9. Representando a quantificação da marcação da proteína NFκB na pele de ratos Wistar não irradiados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). • = $P<0,05$, ITC×ITR.



Fonte: da autora, 2021.

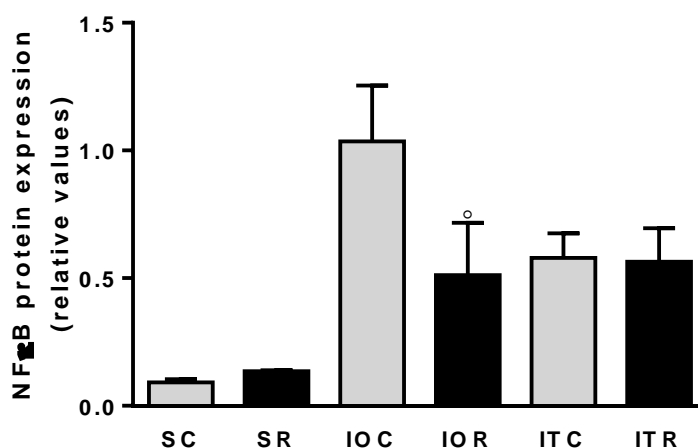
A Figura 17 apresenta a expressão da proteína NFκB obtida por Western Blotting realizado na pele dos animais dos grupos SC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR. Foi observado que não houve diferença significativa entre os animais não irradiados tratados ou não com riboflavina ($0,13\pm 0,003$ e $0,09\pm 0,008$, respectivamente) ($P>0,05$). Embora a expressão proteica de NFκB tenha aumentado nos animais irradiados e tratados com veículo por via oral ($1,04\pm 0,09$), tal achado foi revertido com o uso da riboflavina ($0,51\pm 0,08$) ($P=0,0022$). Todavia, os animais irradiados tratados com riboflavina por via tópica não apresentaram diminuição significativa na expressão de NFκB ($0,57\pm 0,04$) em relação aos tratados com veículo ($0,56\pm 0,05$) ($P>0,05$) (Gráfico 10).

Figura 17: Expressão proteica de NFκB por meio da técnica de Western Blotting.



Fonte: da autora, 2021.

Gráfico 10. Quantificação da expressão proteica de NFκB por Western Blotting na pele de animais não irradiados tratados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P < 0.05$, ITC \times ITR.



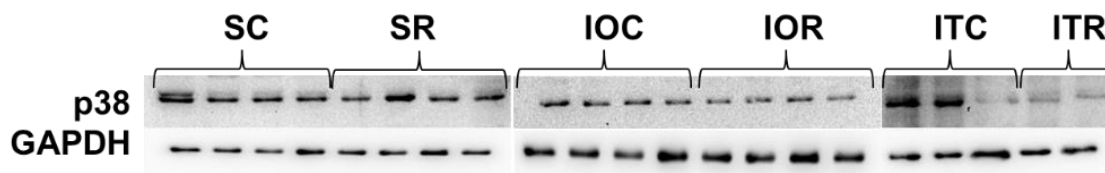
Fonte: da autora, 2021.

5.10 A RIBOFLAVINA REDUZIU A EXPRESSÃO DO P38 MAPK

A Figura 18 representa a determinação da expressão de proteínas de p38 MAPK por Western Blotting na pele dos animais dos grupos SC, SR, IOC, IOR, ITC e ITR. Os animais que não sofreram radiação, tanto não tratados ($0,18 \pm 0,02$), quanto tratados com riboflavina ($0,15 \pm 0,005$), apresentaram expressão proteica de p38 MAPK em níveis basais, sem apresentarem diferença estatística entre eles ($P > 0,05$). A radiação promoveu um aumento na expressão proteica de p38 MAPK no grupo tratado com veículo ($1,06 \pm 0,02$), mas houve diminuição significativa na expressão proteica de p38 MAPK com o uso da riboflavina por via oral ($0,46 \pm 0,01$) ($P = 0,028$). Os animais irradiados e tratados com veículo demonstraram uma ampliação significativa na expressão proteica de p38 MAPK ($0,34 \pm 0,40$), contudo o

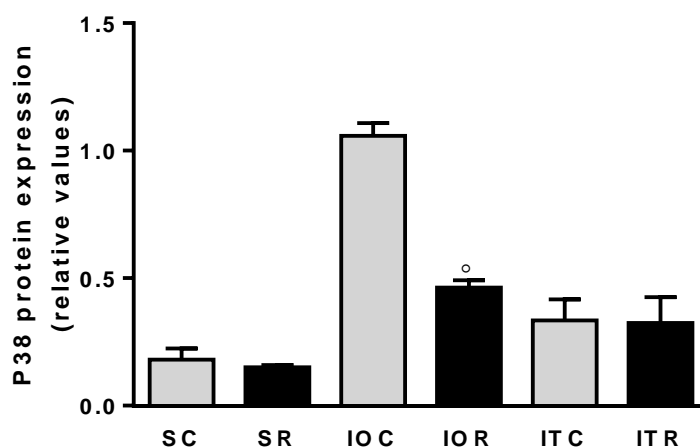
tratamento com riboflavina por via tópica não foi capaz de resultar em redução significativa dessa proteína ($0,32 \pm 0,05$) ($P > 0,05$) (Gráfico 11).

Figura 18: Expressão proteica de p38 MAPK por meio da técnica de Western Blotting.



Fonte: da autora, 2021.

Gráfico 11. Quantificação da expressão da proteína p38 MAPK por Western Blotting na pele de ratos Wistar não irradiados com veículo (SC) e veículo com riboflavina (SR); irradiados com tratamento por via oral com veículo (IOC) e veículo com riboflavina (IOR); irradiados topicamente tratados com veículo (ITC) e veículo com riboflavina (ITR). $\circ = P < 0,05$, $\text{IOC} \times \text{IOR}$.



Fonte: da autora, 2021.

Díscussão

8 DISCUSSÃO

As alterações histológicas relacionadas ao fotoenvelhecimento em humanos envolvem o espessamento da camada córnea, atrofia epidérmica com algumas atipias celulares, dispersão irregular de melanina, diminuição de glicosaminoglicanos e degenerações das fibras colágenas e elásticas na derme. Tais achados tendem a culminar com elastose solar, melasma e ceratose actínica. A presença de anexos cutâneos também eventualmente está diminuída e pode ocorrer alterações vasculares. As barreiras de integridade e de imunidade da pele, com o passar do tempo, passam a ser comprometidas. E finalmente, o carcinoma não melanocítico pode ser considerado o evento final e cumulativo dos danos provocados pela radiação solar à pele (FORE, 2006). Quando se particulariza os danos relativos ao fotoenvelhecimento provocados pelo UV-A, já foi bem estabelecido que os fótons UV-A penetram profundamente na pele e assim podem perturbar a adesão intercelular epidérmica e a comunicação célula a célula, mediada por junções comunicantes, afetando a fixação dos queratinócitos à membrana basal, comprometendo sua motilidade e estratificação celular. Além disso, há um desequilíbrio entre a ativação de vias pró-apoptóticas e de proliferação celular podendo resultar nas alterações observadas na epiderme (NICULITE *et al.*, 2018). Estes dados corroboram com o modelo experimental apresentado por Andrade *et al.*, 2015, no qual a incidência de luz UV-A, na pele de camundongos *hairless* e juntamente na pele humana, provocou até mesmo necrose de queratinócitos. Alguns danos cutâneos similares nos animais expostos ao UV-A foram observadas no presente estudo, como por exemplo, epiderme adelgada, eventual espessamento da camada córnea, desorganização do colágeno com ocasional degeneração basofílica e diminuição de glândulas e anexos. Tais alterações foram revertidas com o uso de riboflavina, principalmente ministrada por via oral.

O dano na derme, mais especificamente, induzido pela radiação UV se manifesta principalmente pela desorganização das fibrilas de colágeno e o acúmulo de material anormal contendo elastina, estes dois eventos em conjunto são denominados histologicamente como degeneração basofílica do colágeno. Esse processo ocorre inicialmente devido à fragmentação do colágeno dérmico resultante da ativação de metaloproteinases da matriz extracelular, prejudicando a integridade estrutural da derme. Na sequência, os fibroblastos que produzem e organizam o colágeno não podem mais se ligar ao colágeno fragmentado. A perda desta ligação impede que os fibroblastos recebam informações de contato para que possam ser reativados e acabam entrando em colapso. Assim, na pele que sofreu o processo de fotoenvelhecimento, os fibroblastos colapsados produzem baixas quantidades de colágeno e

altos níveis de enzimas que degradam o próprio colágeno (FISHER *et al.*, 2008). Observou-se ainda que principalmente o UV-A, entre todos os raios UV, penetra mais profundamente através das camadas da pele e medeia os danos que ocorrem além da epiderme, ou seja, nas fibras colágenas e de elastina na derme (WANG *et al.*, 2010). Da mesma forma, radiação UV-A causa a degeneração da matriz extracelular na derme, principalmente devido à interrupção da homeostase do colágeno, resultando no fotoenvelhecimento cutâneo (SHIM *et al.*, 2012). No presente estudo, o tratamento com riboflavina por via oral, também mostrou-se capaz de reestabelecer os depósitos de colágeno, os quais passaram a se dispor sob uma arquitetura mais organizada mesmo após radiação UV-A. Estudos anteriores também reportam a atividade da riboflavina no remodelamento do colágeno corneano, mas nesse caso via fotossensibilização da riboflavina com UV-A, resultando na formação de oxigênio *singlet*, o qual acarreta o envolvimento de histidina, hidroxiprolina, hidroxilisina, tirosina e treonina nas ligações cruzadas com o colágeno em tramas tridimensionais, tornando o colágeno mais firme, o que auxilia na terapêutica de patologias da córnea (McCALL *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2018). Todavia, o presente estudo mostra pela primeira vez, que a riboflavina, mesmo não fotossensibilizada pelo UV-A, ou seja, sem a produção de oxigênio *singlet* associada, foi capaz de promover a recuperação e o remodelamento dos depósitos de colágeno em animais que sofreram radiação UV-A quando ministrada por via oral, sem que haja danos adicionais relacionados ao estresse oxidativo.

Embora não se saiba o quanto atribuir aos efeitos do próprio envelhecimento celular e àqueles secundários à radiação solar, a consequência mais comum relacionada ao fotoenvelhecimento humano, mas que também pode ser observada nos modelos envolvendo animais expostos à radiação UV, é o afinamento da epiderme, principalmente devido à retração das papilas dérmicas. A espessura geral da pele diminui com um declínio na espessura do estrato espinhoso e uma diminuição significativa na espessura máxima da pele. Vários fatores têm sido associados a esse processo, como a altura vertical diminuída de cada queratinócito com aumento relativo da área de superfície dos corneócitos, redução da aderência dos queratinócitos, e sobretudo, o comprometimento da taxa de renovação epidérmica (NEERKEN *et al.*, 2004). O tempo de renovação da pele normalmente aumenta em até 50% nos idosos. A atividade mitótica na camada basal torna-se reduzida e o tempo de acesso das células da camada basal para o estrato córneo passa a ser aumentado. A maturação ordenada da pele ocorre de maneira mais lenta, incompleta ou desarticulada, o que também pode estar associada ao maior risco de carcinoma não-melanocítico (WULF *et al.*, 2004).

A radiação UV-A justamente compromete os níveis adequados do PCNA,

implicando em prejuízo ao reparo do DNA danificado pela própria radiação. Como há envolvimento de mecanismos de estresse oxidativo nesses eventos, agentes antioxidantes como a L-carnitina podem recuperar a expressão do PCNA na pele de animais que sofreram exposição à radiação UV-A (SALAMA *et al.*, 2018). Foi observado que a riboflavina em altas doses é capaz de induzir intensa proliferação celular em cultura de células de câncer de pulmão, antagonicamente por mecanismos relacionados a maior síntese de citocinas associadas ao estresse oxidativo que induzem fatores de crescimento celular (YANG *et al.*, 2013). O estudo atual revelou que a exposição à radiação UV-A comprometeu a proliferação celular estimada pela expressão do PCNA, mas que pode ser recuperada com o uso de riboflavina, principalmente pelo tratamento por via oral.

Assim, como ocorreu uma maior expressão da capacidade proliferativa celular nos animais irradiados e tratados com riboflavina, os presentes dados também demonstraram uma maior expressão imuno-histoquímica de VEGF, denotando aumento de neoformação vascular, ou seja, reestabelecimento da capacidade de reparo cutâneo nesses animais. De modo análogo aos estudos envolvendo riboflavina fotossensibilizada associada à liberação de oxigênio *singlet* e remodelamento do colágeno, também foram observados efeitos inibitórios deste tipo de riboflavina sobre o VEGF, até mesmo como auxílio na terapia para diferentes patologias, dentre as quais, a regressão de tumor linfocítico (MIKKELSEN *et al.*, 2019) e a diminuição de vasculopatia associada a lesões da córnea (XU *et al.*, 2018). Todavia, no atual estudo, trata-se de riboflavina não fotossensibilizada, que acarretou o aumento da expressão do VEGF, justamente o contrário dos estudos com riboflavina fotossensibilizada, onde ela atuou como anti-angiogênica. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de que a fotossensibilização pode transformar a riboflavina, um produto classicamente antioxidante, em pró-oxidante devido à liberação do oxigênio *singlet* associada.

De acordo com os dados expostos no presente estudo, observou-se que a riboflavina reestabeleceu a arquitetura usual da pele, remodelou e recuperou os depósitos de colágeno, induziu a expressão da capacidade proliferativa das células e aumentou a expressão de fator de crescimento endotelial vascular. Logo, a riboflavina estimulou o reparo da pele irradiada com UV-A. Para melhor entendimento dos mecanismos nesse processo envolvidos é necessário que se foque no tipo de lesão provocada pelo UV-A e suas vias patogênicas.

A irradiação UV-A induz estresse oxidativo e ativa vias de sinalização complexas que estão associadas a eventos celulares fundamentais na pele, incluindo adesão, proliferação, diferenciação, senescência, transformação maligna e morte celular (NICULIȚE *et al.*, 2018). Acredita-se que a radiação UV-A exerça seu efeito carcinogênico por meio da geração de

EROs, incluindo radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, com o oxigênio *singlet* como a principal espécie, que por sua vez causa danos oxidativo de macromoléculas, incluindo DNA e estruturas celulares. O UV-A é um iniciador relativamente fraco, mas um promotor relativamente potente da carcinogênese (SYED *et al.*, 2012).

Vários outros mecanismos foram implicados à lesão por estresse oxidativo provocado pela exposição cutânea ao UV-A, incluindo a redução nas defesas antioxidantes, ativação da sinalização inflamatória e o recrutamento de células mononucleares inflamatórias, indução de fatores de transcrição sensíveis a redox e de proteases elastolíticas (LARROQUE-CARDOSO *et al.*, 2015). Dentre as defesas antioxidantes naturais da pele há os cromóforos como a melanina e as flavinas que absorvem o UV-A na tentativa de neutralizar seus efeitos deletérios. Todavia, a exposição intensa e/ou prolongada ao UV-A pode extrapolar a habilidade dessas substâncias endógenas em prevenir a formação de EROs, gerando as alterações cutâneas já referidas (LIEBEL *et al.*, 2012; MAHMOUD *et al.*, 2010). Outros agentes antioxidantes intracelulares (glutathiona e ácido ascórbico) ou enzimas como álcool desidrogenase, glutathiona transferase ou aldeído desidrogenase podem desintoxicar e neutralizar aldeídos, inibindo a formação de adutos 4-HNE e assim, suas atividades patogênicas (LARROQUE-CARDOSO *et al.*, 2015). Dessa forma, durante a evolução do estresse oxidativo, os níveis de antioxidantes endógenos como o GSH encontram-se reduzidos, passando a serem recuperados após os estímulos pró-oxidantes serem interrompidos e ocorrer diminuição das EROs.

O presente estudo demonstrou que a incidência de raios UV-A na pele de ratos conduziu a um intenso estresse oxidativo, elevando os níveis do 4-HNE e MDA, ambos subprodutos da peroxidação lipídica, além de diminuir os níveis teciduais da GSH cutânea. Todavia, o tratamento com riboflavina por via oral foi capaz de reduzir os níveis de 4-HNE e MDA, além de recuperar o aporte de GSH cutânea. Esses resultados demonstram que a riboflavina, em sua forma não fotossensibilizada apresenta evidente papel antioxidante sobre a pele de animais irradiados com UV-A, sendo capaz de reverter os danos causados pelo estresse oxidativo nessa circunstância. Em detalhes, a ação antioxidante da riboflavina ocorre por meio de FMN e FAD, que participam de uma série de reações redox, incluindo o sistema de glutathiona, no qual a GSH atua como um potente antioxidante endógeno em diferentes tipos de células, cuja função pode ser aumentada com o uso da riboflavina (DEY e BISHAYI, 2016). Estudos prévios em diferentes órgãos demonstraram ação protetora da riboflavina contra o estresse oxidativo (BASHANDY *et al.*, 2018; DEY e BISHAYI, 2016; SANCHES *et*

al., 2014), entretanto este foi o primeiro a demonstrar efeitos protetores da riboflavina em lesões cutâneas através de sua ação antioxidante.

Como descrito anteriormente, o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória altamente sensível aos estímulos desencadeados pelo estresse oxidativo (LEONG e KARSAN, 2000). Estudos anteriores revelam que o estímulo na produção do TNF- α pode ser revertida com o uso de fatores antioxidantes (SALAMA *et al.*, 2018). Os dados atuais revelaram que os animais expostos ao UV-A apresentaram aumento na expressão proteica do TNFR, mas o tratamento com riboflavina por via oral foi capaz de inibir esse processo. Estudos anteriores corroboram a atividade antioxidante da riboflavina interferindo em favor da redução dos níveis de TNF- α (BASHANDY *et al.*, 2018; DEY e BISHAYI, 2016).

Como citado anteriormente, a inativação ou diminuição do NF κ B pode ser o elemento chave regulatório no controle do processo inflamatório desencadeado pelas EROs. Corroborando com estes mecanismos fisiopatológicos, no presente estudo os animais irradiados apresentaram elevação da expressão do fator de transcrição NF κ B, relacionados à atividade pró-inflamatória. Todavia, o tratamento com riboflavina por via oral foi efetivo em reduzir a produção do NF κ B, quando avaliado por Western Blot e por via tópica quando observado através da expressão imuno-histoquímica. De fato, diferentes autores apontaram a importância biológica da riboflavina, principalmente como fator antioxidante e na imunomodulação (GRIMBLE, 1997). Para adequada absorção e utilização da riboflavina no organismo é necessário que a proteína transportadora apical rfv-3 (SLC52A3) e a proteína transportadora basolateral rfv-1 (SLC52A1) de riboflavina (SLC52A3) estejam íntegras e em níveis normais, o que pode ser prejudicado pela ação da citocina pró-inflamatória TNF- α (ANANDAM *et al.*, 2018). Por outro lado, a SLC52A3 é ativada pelo NF κ B, reestabelecendo a absorção e o transporte da riboflavina (LONG *et al.*, 2018). Coincidentemente, o NF κ B é ativado pelo próprio TNF- α durante os processos inflamatórios (SHI e SUN, 2018). Desta forma, percebe-se que há um processo modulador promovido pelo NF κ B para que se reestabeleça os níveis de riboflavina, especificamente obtida por meio da dieta, durante os eventos inflamatórios. Provavelmente, devido a estes mecanismos regulatórios na absorção e transporte da riboflavina da dieta e sua estreita relação com o controle do estresse oxidativo, os resultados do presente estudo foram mais promissores com o uso da riboflavina por via oral, com consequente e fundamental manutenção dos níveis adequados desta vitamina no organismo (LAKSHMI; LAKSHMI; BAMJI, 1989) mediante o aumento de seu consumo decorrente do estresse oxidativo secundário à exposição UV-A.

Conforme reportado, a ativação da via de sinalização p38 MAPK é decorrente produção das citocinas, como o TNF- α , e de sua ligação com seus respectivos receptores, podendo culminar em uma cascata de sinais que resultam no aumento da resposta inflamatória e na exacerbação da ativação da fosforilação da p38 MAPK. Neste cenário, a via de sinalização p38 MAPK ativada é capaz de aumentar a expressão do fator de transcrição c-Jun na pele humana, responsável pelo aumento da expressão das metaloproteinases teciduais e da diminuição de pró-colágeno I, resultando em, além da ativação da resposta inflamatória, na desestruturação da arquitetura tecidual (COSTA, 2015; SHAH e MAHAJAN, 2013). Especificamente tratando-se da irradiação por UV-A, foi demonstrado que a ativação induzida por UV-A de p38 MAPK é mediada por EROs e que o uso de agentes antioxidantes como a L-carnitina é capaz de reverter esse processo (SALAMA *et al.*, 2018). No presente estudo, os animais irradiados com UV-A apresentaram maior expressão de p38 MAPK, ou seja, estiveram sujeitos a maior estresse oxidativo e consequente resposta inflamatória mediada por TNF- α . A administração da riboflavina por via oral reverteu este cenário, sugerindo a ação inibitória da riboflavina da ativação do p38 MAPK. Até o momento, há poucos trabalhos descrevendo a ação da riboflavina na via de sinalização p38 MAPK. A riboflavina atuou inibindo a ativação da fosforilação de p38 MAPK em transplante de ilhotas pancreáticas de ratos, (COBIANCHI *et al.*, 2008), contudo, simplesmente não produziu nenhum efeito significativo em cultivo de células leucêmicas (SOUZA *et al.*, 2006), mas em ambos os casos a riboflavina foi utilizada sob a forma fotossensibilizada. Na verdade, a fotossensibilização da riboflavina, faz com que ela abandone seu papel usual de antioxidante, e começa a potencializar os efeitos pró-oxidantes do UV-A, conforme foi descrito em cultura de fibroblastos humanos (YOSHIMOTO *et al.*, 2020). A questão da ministração de riboflavina não fotossensibilizada em conjunto com os mecanismos que envolvem as proteínas transportadoras de riboflavina da dieta já reportados, poderia explicar os resultados mais significativos quando o tratamento com a riboflavina foi feito por via oral no presente estudo. A aplicação tópica da riboflavina envolve questões de biodisponibilidade, pois pode haver uma pequena fotossensibilização da riboflavina pela exposição a luz ambiente.

Conclusão

9 CONCLUSÃO

- O modelo experimental adaptado obteve alterações compatível a fotoenvelhecimento;

- A riboflavina foi capaz de promover a recuperação da pele dos ratos irradiada com UV-A estimulando a recuperação e o remodelamento dos depósitos de colágeno;

- A riboflavina estimulou a expressão proliferativa das células e aumentou a expressão do fator de crescimento endotelial vascular durante o período de reparo da pele dos ratos após a radiação por UV-A;

- A riboflavina revelou-se como potente antioxidante combatendo o estresse oxidativo promovido pela radiação e apresentou efeitos inibitórios nas citocinas pró-inflamatórias, ou seja, reduziu a inflamação cutânea provocada pela radiação, envolvendo mecanismos relacionados ao NFκB e ao p38 MAPK;

Assim, a suplementação com riboflavina por via oral, mais do que sua aplicação tópica, foi capaz de atuar como agente antioxidante e reparador sobre lesões cutâneas causadas por radiação UV-A, reforçando seu potencial terapêutico contra o estresse oxidativo, com consequente ação anti-inflamatória. Estudos posteriores poderão ser realizados para melhor elucidação dos mecanismos de ação da mesma sobre a pele, bem como para avaliar a aplicação clínica dos efeitos terapêuticos da riboflavina em indivíduos que foram expostos ao sol.

Referências

REFERÊNCIAS

AFAQ, F; MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. **Experimental Dermatology**, [s.l.], v. 15, n. 9, p. 678-684, set. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00466.x>.

AFAQ, F; MUKHTAR, H. Photochemoprevention by Botanical Antioxidants. **Skin Pharmacology And Physiology**, [s.l.], v. 15, n. 5, p. 297-306, 2002. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000064533>.

AGAR, N. S. *et al.* The basal layer in human squamous tumors harbors more UV-A than UV-B fingerprint mutations: A role for UV-A in human skin carcinogenesis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 101, n. 14, p. 4954-4959, 23 mar. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401141101>.

ALMEIDA, B. L. **MODELO DE PELE HUMANA RECONSTRUÍDA COMO PLATAFORMA PARA ESTUDOS DE FOTOENVELHECIMENTO**. 2020. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019. Disponível em: < <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html#>>.

ANANDAM, K.Y. *et al.* Effect of the proinflammatory cytokine TNF-alpha on intestinal riboflavinuptake: inhibition mediated via transcriptional mechanism(s). **Am J Physiol Cell Physiol.**, [s.l.], v. 315, n. 5, p. 653-663, nov. 2018. doi: 10.1152/ajpcell.00295.2018.

ANDRADE, T.A. *et al.* Ex vivo Model of Human Skin (hOSEC) as Alternative to Animal use for Cosmetic Tests. *Procedia Engineering*, [S.L.], v. 110, p. 67-73, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2015.07.011>.

BAKOS, L. Melanoma cutâneo: estudos de base populacional no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 81, n. 5, p. 402-402, out. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962006000500002>.

BANDARCHI, B. *et al.* From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. **Dermatology Research And Practice**, [S.L.], v. 2010, p. 1-8, 2010. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/583748>.

BANDYOPADHYAY, D.; MEDRANO, E. E. Melanin Accumulation Accelerates Melanocyte Senescence by a Mechanism Involving p16INK4a/CDK4/pRB and E2F1. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 908, n. 1, p. 71-84, 25 jan. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06637.x>.

BARONI, A. *et al.* Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics In Dermatology**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 257-262, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>.

Barrientos S, *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen.**, [s.l.], v.16, n. 5, p. 585-601, set-out. 2008. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.

BASHANDY, S. A. E. *et al.* Potential effects of the combination of nicotinamide, vitamin B2 and vitamin C on oxidative-mediated hepatotoxicity induced by thioacetamide. **Lipids In Health And Disease**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-9, 14 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-018-0674-z>.

BERNEBURG, M. *et al.* Singlet Oxygen Mediates the UV-A-induced Generation of the Photoaging-associated Mitochondrial Common Deletion. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 274, n. 22, p. 15345-15349, 28 maio 1999. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.22.15345>.

BETZ, A. L. *et al.* Riboflavin Reduces Edema in Focal Cerebral Ischemia. **Brain Edema IX**, [S.L.], p. 314-317, 1994. Springer Vienna. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-9334-1_84.

BROHEM, C. A. *et al.* Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 35-50, 9 nov. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148x.2010.00786.x>.

CARRARA, I. M. *et al.* Looking beyond the skin: cutaneous and systemic oxidative stress in UV-B-induced squamous cell carcinoma in hairless mice. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 195, p. 17-26, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.04.007>.

Caetano GF, Fronza M, Leite MN, Gomes A, Frade MA. Comparison of collagen content in skin wounds evaluated by biochemical assay and by computer-aided histomorphometric analysis. **Pharm Biol.** 2016 Nov;54(11):2555-2559. doi: 10.3109/13880209.2016.1170861. Epub 2016 May 14. PMID: 27180834.

CHIARELLI NETO, O. **EFEITOS DA LUZ E VISÍVEL EM CÉLULAS DA PELE E CABELO.** 2014. 186 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

CICHOREK, M. *et al.* Skin melanocytes: biology and development. **Advances In Dermatology And Allergology**, [s.l.], v. 1, p. 30-41, 2013. Termedia Sp. z.o.o. <http://dx.doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>.

COBIANCHI, L. *et al.* Riboflavin Inhibits IL-6 Expression and p38 MAPK Activation in Islet Cells. **Cell Transplantation**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 559-566, maio 2008. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.3727/096368908785096060>.

COLOMBO-BARBOZA, M. *et al.* Induction of corneal collagen cross-linking in experimental corneal alkali burns in rabbits. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [S.L.], v. 77, n. 5, p. 310-314, 2014. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0004-2749.20140078>.

COSTA, K. C. Avaliação in vitro e in vivo do potencial fotoprotetor e fotoquimioprotetor da fração purificada de *Inga edulis* (Ingá). 2015. [Dissertação]. Curso de Ciências Farmacêuticas,

Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2015.

COSTIN, G.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 21, n. 4, p. 976-994, abr. 2007. FASEB. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-6649rev>.

DEY, S.; BISHAYI, B. Riboflavin along with antibiotics balances reactive oxygen species and inflammatory cytokines and controls *Staphylococcus aureus* infection by boosting murine macrophage function and regulates inflammation. **Journal Of Inflammation**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-21, 28 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12950-016-0145-0>.

DUTHIE, M. S.; KIMBER, L.; NORVAL, M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. **British Journal Of Dermatology**, [s.l.], v. 140, n. 6, p. 995-1009, jun. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.02898.x>.

DUV-AL, C. *et al.* Keratinocytes Control the Pheo/Eumelanin Ratio in Cultured Normal Human Melanocytes. **Pigment Cell Research**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 440-446, dez. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.02055.x>.

FISHER, G. J.; VARANI, J.; VOORHEES, J. J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. **Arch Dermatol.**, [s.l.], v. 144, n. 5, p. 666-672, maio 2008. doi: 10.1001/archderm.144.5.666.

FORE, J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. **Ostomy wound manage.**, [s.l.] v. 52, n. 9, p. 24-35, set. 2006.

FORSLIND, B. The skin: Upholder of physiological homeostasis. A physiological and (bio)physical study program. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 1-22, out. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0049-3848\(95\)00132-b](http://dx.doi.org/10.1016/0049-3848(95)00132-b).

GRIMBLE, R. F. Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. **Int J Vitam Nutr Res.**, [s.l.], v. 67, n. 5, p. 312-320, 1997.

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [s.l.], v. 571, n. 1-2, p. 107-120, 1 abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013>.

HECK, D. *et al.* Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 195, n. 3, p. 288-297, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2003.09.028>.

HUSSEIN, M. R. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. **Journal Of Cutaneous Pathology**, [s.l.], v. 32, n. 3, p. 191-205, mar. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0303-6987.2005.00281.x>.

INAL, M. E.; KAHRAMAN, A.; KOKEN, T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. **Clinical And Experimental Dermatology**, [s.l.], v. 26, n. 6, p. 536-539, set. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2230.2001.00884.x>.

INCA Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - **Ministério da Saúde**. Estimativa 2019, Incidência de Câncer no Brasil. Disponível na Internet em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em 30 mar. 2020.

IWANAGA, K. *et al.* Riboflavin-Mediated Reduction of Oxidant Injury, Rejection, and Vasculopathy after Cardiac Allotransplantation. **Transplantation**, [S.L.], v. 83, n. 6, p. 747-753, mar. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000256283.06469.d4>.

JENKINS, N. C.; GROSSMAN, D. Role of Melanin in Melanocyte Dysregulation of Reactive Oxygen Species. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p. 1-3, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/908797>.

KHAN, A. *et al.* Antioxidative and antiphotaging activities of neferine upon UV-A irradiation in human dermal fibroblasts. **Biosci Rep.**, [s.l.], v. 38, n. 6, p. 1-14, dez. 2018. doi: 10.1042/BSR20181414.

LAKSHMI, R.; LAKSHMI, A.V.; BAMJI, Mahtab S. Skin wound healing in riboflavin deficiency. **Biochemical Medicine And Metabolic Biology**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 185-191, dez. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0885-4505\(89\)90054-6](http://dx.doi.org/10.1016/0885-4505(89)90054-6).

LARROQUE-CARDOSO, P. *et al.* Elastin Modification by 4-Hydroxynonenal in Hairless Mice Exposed to UV-A. **Role in Photoaging and Actinic Elastosis Journal of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 135, p. 1873-1881, abr. 2015. doi:10.1038/jid.2015.84.

LEONG, K. G.; KARSAN, A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor α . **Histology And Histopathology**, [S.L.], n. 33, p. 1303-1325, 1 out. 2000. Scrcisma International. <http://dx.doi.org/10.14670/HH-15.1303>.

LI, Min *et al.* Hesperidin ameliorates UV radiation-induced skin damage by abrogation of oxidative stress and inflammatory in HaCaT cells. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 165, p. 240-245, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.037>.

LIEBEL, F. *et al.* Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 132, n. 7, p. 1901-1907, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.476>.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, [s.l.], v. 445, n. 7130, p. 843-850, fev. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05660>.

LIPPENS, S. *et al.* Cell death in the skin. **Apoptosis**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 549-569, 17 fev. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-009-0324-z>.

LONG, L. *et al.* SLC52A3 expression is activated by NF-kappaB p65/Rel-B and serves as a prognostic biomarker in esophageal cancer. **Cell Mol Life Sci.**, [s.l.], v. 75, n.14, p. 2643-2661, jul. 2018. doi: 10.1007/s00018-018-2757-4.

MACK, C. P.; HULTQUIST, D. E.; SHLAFER, M. Myocardial Flavin Reductase and Riboflavin: a potential role in decreasing reoxygenation injury. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 212, n. 1, p. 35-40, jul. 1995. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1995.1932>.

MAHMOUD, B. H. *et al.* Impact of Long-Wavelength UV-A and Visible Light on Melanocompetent Skin. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 130, n. 8, p. 2092-2097, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.95>.

MANTHEY, K. C. *et al.* Riboflavin deficiency causes protein and DNA damage in HepG2 cells, triggering arrest in G1 phase of the cell cycle. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 250-256, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.004>.

McCALL, A. S. *et al.* Mechanisms of Corneal Tissue Cross-linking in Response to Treatment with Topical Riboflavin and Long-Wavelength Ultraviolet Radiation (UV-A). **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 129-137, 1 jan. 2010. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.09-3738>.

MEDRANO, E. E. *et al.* Terminal Differentiation and Senescence in the Human Melanocyte: Repression of Tyrosine Phosphorylation of the Extracellular Signal-regulated Kinase 2 Selectively Defines the Two Phenotypes. **Molecular Biology Of The Cell**, Boston, v. 5, n. 1, p. 497-509, abr. 1994.

MIKKELSEN, K. *et al.* Anti-Tumor Effects of Vitamin B2, B6 and B9 in Promonocytic Lymphoma Cells. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 15, p. 3763-3771, 1 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20153763>.

MOORE, J O. *et al.* Effects of ultraviolet B exposure on the expression of proliferating cell nuclear antigen in murine skin. **Photochem Photobiol.**, [s.l.], v. 80, n. 3, p. 587-595, nov-dez. 2004. doi: 10.1562/0031-8655(2004)080<0587:EOUBEO>2.0.CO;2.

MURPHREE, R. W. Impairments in Skin Integrity. **Nursing Clinics Of North America**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 405-417, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnur.2017.04.008>.

NEERKEN S. *et al.* Characterization of age-related effects in human skin: a comparative study that applies confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography. **J Biomed Opt.**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 274-281, mar-abr. 2004. DOI: 10.1117/1.1645795.

NICULITE, C. *et al.* Keratinocyte Motility Is Affected by UV-A Radiation - A Comparison between Normal and Dysplastic Cells. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 1-13, 7 jun. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061700>.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. DNA damage checkpoints in mammals. **Mutagenesis**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 3-9, 28 nov. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gei063>.

POWERS, H. J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. **Am J. Clin. Nutr.**, v. 77, n. 6, p. 1352-1360, 2003.

RUBERT, A. *et al.* Vitaminas do complex B: Uma breve revisão. **Revista Jovens Pesquisadores**, Santa Cruz do Sul, v. 7, n. 1, p. 30-45, jan-jun. 2017. DOI: 0.17058/rjp.v7i1.9332.

SALAMA, S. A. *et al.* L-carnitine mitigates UVA-induced skin tissue injury in rats through downregulation of oxidative stress, p38 MAPK/c-Fos signaling, and the proinflammatory cytokines. **Chemico-Biological Interactions.**, [s.l.], v. 285, p. 40-47, abr. 2018. DOI: 10.1562/0031-8655(2004)080<0587:EOUBEO>2.0.CO;2.

SANCHES, S. C. *et al.* Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischaemia and reperfusion in mice. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 67, p. 65-71, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.013>

SANDER, C. S. *et al.* Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **International Journal Of Dermatology**, [s.l.], v. 43, n. 5, p. 326-335, maio 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02222.x>.

SCHALKA, S. *et al.* Brazilian Consensus on Photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 89, n. 61, p. 1-74, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20143971>.

SEKAR, R. *et al.* Microbially Driven Fenton Reaction for Degradation of the Widespread Environmental Contaminant 1,4-Dioxane. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 48, n. 21, p. 12858-12867, 27 out. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es503454a>.

SHAH, H.; MAHAJAN, S. R. Photoaging: New insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. **Biomedicine & Aging Pathology**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 161-169, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomag.2013.05.003>.

SHI, J. H.; SUN, S. C. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. **Front. Immunol.**, [s.l.], v. 9, p. 1-13, aug. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01849>.

SHIM J. H. *et al.* The retinoic acid-induced up-regulation of insulin-like growth factor 1 and 2 is associated with prolidase-dependent collagen synthesis in UVA-irradiated human dermal equivalentes. **Dermatol Sci.**, [s.l.], v. 66, n. 1, p. 51-59, abr. 2012. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.12.008. Epub 2011 Dec 22.

SILVERTHORN, D. U.; JOHNSON, B. R. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 957 p.

SOUZA, A. C. S. *et al.* A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. **Apoptosis**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 1761-1771, 21 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-006-9549-2>.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel. **Life Sciences**, [s.l.], v. 67, n. 5, p. 477-502, jun. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00653-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00653-6).

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D; VOSTALOVA, J. ULTRAVIOLET LIGHT INDUCED ALTERATION TO THE SKIN. **Biomedical Papers**, [s.l.], v. 150, n. 1, p. 25-38, 1 jul. 2006. Palacky University Olomouc. <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2006.003>.

SYED, D. N.; AFAQ, F; MUKHTAR, H. Differential Activation of Signaling Pathways by UVA and UVB Radiation in Normal Human Epidermal Keratinocytes. **Photochem Photobiol.**, [s.l.], v. 88, n. 5, p. 1184-1190, set. 2012. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01115.x.

TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, K. A study of the photolightening mechanism of red hair with visible and ultraviolet light: comparison with blond hair. **International Journal Of Cosmetic Science**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 192-192, jun. 2005. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.0142-5463.2005.00265_4.x.

TERRA, V. A. *et al.* Nitric oxide is responsible for oxidative skin injury and modulation of cell proliferation after 24 hours of UV-B exposures. **Free Radical Research**, [s.l.], v. 46, n. 7, p. 872-882, 8 maio 2012a. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2012.686036>.

TERRA, V. A. *et al.* Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UV-B irradiation. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 109, p. 34-41, abr. 2012b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.01.003>.

THIELE, J.; ELSNER, P. **Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology: Current Problems in Dermatology**, Vol. 29. Iowa: Karger, 2001. 194 p.

TOBIN, D. J. The cell biology of human hair follicle pigmentation. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 75-88, 6 dez. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148x.2010.00803.x>.

TOYOSAWA, T. *et al.* Highly Purified Vitamin B2 Presents a Promising Therapeutic Strategy for Sepsis and Septic Shock. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 1820-1823, 20 fev. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.72.3.1820-1823.2004>.

VILE, G. F.; TYRRELL, R. M. UV-A radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 721-730, abr. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00192-m](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(94)00192-m).

WANG, L. *et al.* Nitric oxide synthase activation and oxidative stress, but not intracellular zinc dyshomeostasis, regulate ultraviolet B light-induced apoptosis. **Life Sciences**, [s.l.], v. 86, n. 11-12, p. 448-454, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.01.017>

WAKAMATSU, Tais Hitomi; DOGRU, Murat; TSUBOTA, Kazuo. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**,

[S.L.], v. 71, n. 6, p. 72-79, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27492008000700015>

WOLK, K.; WITTE, K.; SABAT, Robert. Interleukin-28 and Interleukin-29: Novel Regulators of Skin Biology. **Journal Of Interferon & Cytokine Research**, [s.l.], v. 30, n. 8, p. 617-628, ago. 2010. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2010.0064>.

WOLPOWITZ, D.; GILCHREST, B. A. The vitamin D questions: How much do you need and how should you get it? **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [s.l.], v. 54, n. 2, p. 301-317, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2005.11.1057>

WULF H. C. *et al.* Skin aging and natural photoprotection. **Micron.**, [s.l.], v. 35, n. 3, p. 185-191, abr. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.11.005>

XU, X.; LIU, T.; LI, H. Effect of Collagen Cross-Linking on Alkali Burn-Induced Corneal Neovascularization in Rabbits. **Journal Of Ophthalmology**, [S.L.], v. 2018, p. 1-6, 9 out. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/7325483>.

YANG, H.T.; CHAO, P. C.; YIN, M. C. Riboflavin at high doses enhances lung cancer cell proliferation, invasion, and migration. **J Food Sci.**, [s.l.], v. 78, n. 2, p. 343-349, fev. 2013. doi: 10.1111/1750-3841.12012.

YOSHIMOTO, S. *et al.* Riboflavin Plays a Pivotal Role in the UVA-Induced Cytotoxicity of Fibroblasts as a Key Molecule in the Production of H₂O₂ by UVA Radiation in Collaboration with Amino Acids and Vitamins. **Int J Mol Sci.**, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 554-574, jan. 2020. doi: 10.3390/ijms210205.

YUASA, H.; HIROBE, M.; TOMEI, S.; WATANABE, J. Carrier-mediated transport of riboflavin in the rat colon. **Biopharm. Drug. Dispos.**, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 77-82, 2000.

Anexo

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “Efeito da riboflavina na pele de ratos irradiados com UV-A”, registrado com o número **110/2019**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 26 de agosto de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 40 ratos Wistar-OLD machos pesando 200g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 26/08/2019 a 01/08/2020.

We certify that the Protocol *nº 110/2019*, entitled “*Effect of riboflavina in the skin of UV-A irradiated rats*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/26/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 40 male Wistar-OLD rats weighing 200g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School. This certificate is valid until 08/01/2020.

Ribeirão Preto, 26 de agosto de 2019


Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP