

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas

Fisiologia e Farmacologia

**ATIVIDADE DA FRAÇÃO PROTEOLÍTICA P1G10, DERIVADA DO
LATEX DE *V.Cundinamarzensis*, CONTRA DANOS CELULARES E
MOLECULARES INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA À
RADIÇÃO ULTRAVIOLETA B.**

Kátia Michelle Freitas

Belo Horizonte

2016

Kátia Michelle Freitas

**ATIVIDADE DA FRAÇÃO PROTEOLÍTICA P1G10, DERIVADA DO
LATEX DE *V.Cundinamarcesis*, CONTRA DANOS CELULARES E
MOLECULARES INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA À
RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B.**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor.

**Orientadora: Prof^a.Dr^a. Miriam Teresa Paz Lopes,
Coorientadores: Prof^a.Dr^a. Lucíola da Silva Barcelos e
Prof.Dr. Ênio Ferreira**

Belo Horizonte

2016

Dedico carinhosamente este trabalho aos meus amores,

Fofinha, Papy, Bernardo e Márcio Pessoa.

Agradecimentos

Acredito no risco que possa vir acontecer de esquecer alguém que contribuiu de alguma forma para o meu aprendizado. Espero a compreensão de todos os meus amigos e companheiros dessa jornada, que possam me perdoar e receber meu sincero agradecimento.

Ao criador do Céu e da Terra;

À minha amada família, Fofinha, Bernardo e papy, pelas orações, dedicação, amor incondicional, alegria e compreensão das minhas ausências nos momentos mais importantes das suas vidas. Amo vocês!

À Profa. Dra Miriam Teresa Paz Lopes pela confiança, colaboração e orientação durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Cândida Araújo e Silva, pela presteza, dedicação, discussões referentes ao trabalho, contribuições durante toda a minha jornada no Programa de pós-graduação, paciência, à grande colaboração para com esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ênio Ferreira pela presteza, dedicação, contribuições, idéias e o grande apoio.

Aos meus grandes amigos e ex-integrantes do LSAT: Aninha Araújo (Fenômeno!), Ariadne, Cinthia, Dalton Dittz, Fernanda Lemos, Fernanda Duarte, Gabriela, Heveline, Luiz Felipe, Lívia, Luciana, Maria Imaculada, Mateus Diniz, Sandrinha e Verlane que contribuíram com o apoio aos experimentos, idéias, discussões dos resultados, alegria e companheirismo.

Ao companheiro e amado Márcio Pessoa, “pessoa” iluminada que Deus colocou no meu caminho para eu aprender e crescer, constantemente. Agradeço pela grande contribuição para o prosseguimento desta pesquisa, toda a dedicação, compreensão, paciência, carinho, apoio, todas colaborações e incentivos até ao último minuto deste trabalho.

À Profa. Dra. Lucíola da Silva Barcelos, por acreditar no projeto, pelo aprendizado e apoio.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari, pelo incentivo, auxílio à morfometria, presteza e empolgação com o projeto.

Ao Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini, pela presteza, atenção, contribuições e apoio.

Ao Prof. Dr. Carlos E. Salas Bravo, chileno-cruzeirense, pela atenção, confiança e ensinamentos.

À Profa. Dra. Janetti Francischi , Prof. Dr. André Klein e Profa. Regina Maria de Marco Turchetti Maia, pelo apoio, presteza e por cederem o espaço para a realização de grande parte do projeto.

À secretaria de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia: Cintya Menezes e Rodner Almeida, pela presteza, apoio e serviços prestados.

Ao Mestrando Emerson Soares Veloso, pela presteza, auxílio na imunohistoquímica, atenção e contribuições. E às funcionárias do laboratório de técnicas histológicas: Luciana, Jaqueline, Olinda e Vânia, pela atenção e serviços prestados.

Ao Rinaldo e Wellington pela atenção, cuidado com os animais e serviços prestados.

Aos companheiros e ex-integrantes do laboratório de Angiogênese: Brígida, Camila Almeida, Camila Moreira, Celso Tarso, Fabrício, Jousie, Leandro Ceotto, Leandro Barb, Luíza Dias, Pollyana, Puebla, Suzane, pela presteza, paciência e apoio.

Aos grandes colegas dos Departamentos de Farmacologia e Fisiologia, em especial: Ayslan, Daniela Garcia, Flávia Fonseca, Gianne, Graziela , Isabel Vieira, Jonas, Juliana Navia, Josiane Fernandes, Lucas Souza, Natália Matos, Onésia Cristina, Paula Bellozi, Pedro Gobira, pela presteza, apoio e companheirismo.

Aos colegas do laboratório do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, em especial: Carol, Mariana e Michelle pela atenção, confiança, colaborações, ensinamentos e apoio.

À todos os professores dos Departamentos de Fisiologia e Farmacologia do ICB/UFMG que de alguma forma participaram da minha formação acadêmica.

Aos meus primos, José Reinaldo e Fernanda Pereira , tias e tios pelo apoio, carinho e atenção à minha família.

À minha vizinha Francisca pelo carinho, atenção, orações e compreensão das minhas ausências, que, ultimamente foram muitas. Perdoe-me!

À família “Pessoa”, pelo carinho,atenção, confiança e momentos de alegria.

Aos professores da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), em especial aos professores: Luciene Alves Moreira Marques, Helenice Aparecida de Carvalho e Sandra Maria Veiga, pela atenção, incentivo e apoio.

Obrigada.

"É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser

conhecer as borboletas..."

Antoine de Saint-Exupéry

Colaboradores

Profa. Dra. Ana Cândida Silva e Araújo

Faculdade de Medicina do Mucuri (FAMMUC)

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM)

Prof. Dr. Carlos E. Salas Bravo

Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG.

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

Departamento de Patologia, ICB/UFMG

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG

RESUMO

P1G10 é uma fração rica em cisteíno proteases, obtida do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, através de separação cromatográfica (Sephadex G10). Estudos prévios demonstraram atividade antitumoral contra melanoma murino, cicatrizante em diferentes modelos de lesões de pele, e protetora/cicatrizante gástrica, onde foi sugerida uma possível ação antioxidante. Nesse trabalho, avaliamos o efeito do tratamento tópico com P1G10 sobre fatores envolvidos nos danos celulares e moleculares induzidos pela radiação UVB, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. Em lesões induzidas por exposição única, o tratamento com P1G10 reduziu o edema e eritema, a celularidade da hipoderme, a atividade de MPO (33%), os níveis de TNF- α , (32%) e IL1 β (31%) e a expressão da enzima COX2, indicando um efeito anti-inflamatório significativo. Esses efeitos podem estar relacionados com a redução da expressão de Akt promovida pelo tratamento com P1G10. Essa fração ainda apresentou atividade antioxidante, verificada pela modulação do sistema oxidante/antioxidante da pele: O tratamento com P1G10 inibiu a depleção de GSH, GPx, SOD, causadas pela radiação UVB e aumentou a atividade da enzima catalase (50%). Sugere-se que estas ações contribuíram significativamente para a redução dos níveis de MDA (52%), verificadas nos grupos tratados com P1G10. Aliado aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, nossos resultados inferiram que o tratamento tópico com P1G10 proteja as células da pele contra os danos à matriz extracelular e ao DNA, induzidos pela radiação: nos grupos tratados com a fração, a atividade de MMP-9 e a expressão de caspase 3 foram reduzidas, acompanhada do aumento da expressão de p53. Outro indicativo dessa atividade antioxidante e protetora de P1G10 foi demonstrado por análises *in vitro*, onde se verificou um aumento da viabilidade celular e redução significativa da produção de EROs em células irradiadas por UVB, além de uma atividade antioxidante intrínseca da fração, comprovada pela capacidade de redução do radical DPPH' ($EC_{50} = 20,35 \pm 0,66 \mu\text{g/mL}$). Em lesões de pele promovidas pela exposição repetida à UVB, a aplicação tópica de P1G10 diminuiu a formação de EROs (47%), porém, não alterou os níveis de MDA e a atividade de SOD. Com o tratamento, os níveis de GSH e a atividade GPx foram preservados e de catalase aumentados, protegendo o sistema antioxidante cutâneo. Nesse modelo também observamos um efeito anti-inflamatório de P1G10 pela inibição dos níveis de TNF- α (73%), IL1 β (92%) e, em análises histológicas, a redução da celularidade e infiltração leucocitária da hipoderme. A hiperplasia epidérmica induzida pela radiação UVB foi reduzida, como evidenciado pela redução da espessura e de camadas da epiderme, e pela imunomarcagem para PCNA nos queratinócitos. Vias envolvidas no processo inflamatório e na produção de radicais livres pela radiação também foram avaliadas, sendo verificado que o tratamento reduziu a fosforilação das proteínas de MAP quinases (JNK e p-38) e Akt, e a atividade de MMP-9. Diante do exposto, sugere-se que P1G10 possui interessantes ações antioxidantes e anti-inflamatórias que podem contribuir para o reparo tecidual dos danos promovidos pela exposição à UVB.

Palavras chave: *Vasconcellea cundinamarcensis*, antioxidante, anti-inflamatório, proteção, e radiação UVB

ABSTRACT

P1G10 is a fraction rich in cysteine proteases, obtained from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex, by chromatographic separation (Sephadex G10). Previous studies have demonstrated antitumor activity against murine melanoma, healing action in different models of skin lesions, and protective/healing effect against gastric ulcers, where it was suggested a possible antioxidant activity. In this study, we evaluated the effect of topical treatment with P1G10 on factors involved in cellular and molecular damage induced by UVB radiation, using *in vivo* and *in vitro* models. In lesions induced by single exposure to UVB, P1G10 reduced edema and erythema, increased hypodermis cellularity, MPO activity (33%), TNF- α (32%) and IL1 β (31%) levels and CO2 expression. These results indicate a significant anti-inflammatory effect and seem to be related to the reduction of Akt expression promoted by treatment with P1G10. This fraction also showed antioxidant activity: P1G10 treatment inhibited the depletion of GSH, GPx, SOD caused by UVB radiation and increased the activity of catalase (50%). This possibly contributed to the significant reduction on MDA levels (52%), observed in groups treated with P1G10. Combined with anti-inflammatory and antioxidant effects, our results inferred that topical treatment with P1G10 protect skin cells from extracellular matrix and DNA damage induced by radiation: in the groups treated with the fraction, MMP-9 activity and caspase 3 expression were reduced and an increase in p53 expression was detected. Another indication of this antioxidant and protective of P1G10 was demonstrated by *in vitro* analysis. The treatment of keratinocytes (HaCat cells) promoted an increase in cell viability and significantly reduced ROS production in cells irradiated by UVB. P1G10 also displays an intrinsic antioxidant activity as proven by radical derating DPPH^{*} property (EC50 = 20.35 \pm 0.66 mg / mL). In skin lesions promoted by repeated exposure to UVB, topical application of P1G10 reduced ROS formation (47%), however, did not alter the MDA levels or SOD activity. The fraction also preserved the levels of GSH and GPx and increased catalase levels, protecting the skin antioxidant system. In this model we also observed an anti-inflammatory effect of P1G10 through reduction of TNF- α levels (73%) and IL1 β (92%) levels, and decrease of cellularity and inflammatory infiltrate in hypodermis. UVB-induced epidermal hyperplasia was inhibited by the P1G10 which was evidenced by a decrease in epidermal thickness and in immunostaining for PCNA in keratinocytes. These events may be related to the anti-inflammatory effect P1G10 combined with antioxidant activity, which was associated with reduced MMP-9 activity and minor phosphorylation of the proteins of MAP kinases (JNK and p-38) and Akt, as observed in treated animals. Given the above, it is suggested that P1G10 has interesting antioxidant and anti-inflammatory actions that may contribute to tissue repair of damage caused by exposure to UVB.

Keywords: Vasconcellea cundinamarcensis, antioxidant, anti-inflammatory, protection, and UVB radiation.

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação histológica da pele e suas camadas.	24
Figura 2 - Intensidade da radiação UV que atinge a superfície da Terra, após atravessar a camada de ozônio.	27
Figura 3 Espectro eletromagnético e sua interação com a pele.	28
Figura 4- Representação esquemática dos mecanismos de fotossensibilização tipo I e tipo II.	30
Figura 5- Defesa antioxidante celular.	34
Figura 6- Desenho ilustrativo do equilíbrio fisiológico oxidante/antioxidante e o estresse oxidativo.	35
Figura 7- Lesões no DNA induzidas pela radiação UV.	37
Figura 8- Diagrama de transdução de sinal, não-genômico, induzido pela radiação UV.	43
Figura 9 - Medida do comprimento de onda da lâmpada Cole-Parmer, modelo 9815 OOIBase32.	62
Figura 10 Representação esquemática da montagem do experimento de Exposição única à UVB.	63
Figura 11 - Padronização do modelo de exposição única à UVB.	63
Figura 12 - Esquema de indução e tratamento de lesões por exposição única à radiação UVB.	65
Figura 13 - Esquema da indução e tratamento de lesões por exposições repetidas à UVB.	66
Figura 14 - Linha cronológica do experimento de Exposição de múltiplas doses de UVB.	66
Figura 15 - Ilustração esquemática da padronização da coleta de amostras das lesões induzidas por UVB.	67
Figura 16 - Evolução temporal dos efeitos da exposição à radiação UVB sobre a pele de camundongos <i>Hairless</i>	81
Figura 17 - Fotomicrografias de cortes histológicos corados por H&E da pele do dorso dos animais <i>Hairless</i> após a exposição à UVB.	84

Figura 18 - Análise morfométrica de cortes histológicos corados por H&E de pele do dorso dos animais <i>Hairless</i> submetidos a irradiação por UVB.....	85
Figura 19 - Medida da atividade de Mieloperoxidase (MPO) em pele de camundongos <i>Hairless</i> após a exposição à UVB.....	86
Figura 20 - Medida dos níveis de TNF- α em pele de camundongos <i>Hairless</i> , após a irradiação com UVB	87
Figura 21 - Evolução temporal dos níveis de nitrito em pele de camundongos <i>Hairless</i> , após a exposição à radiação UVB.....	88
Figura 22 - Evolução temporal da atividade e níveis de fatores antioxidantes na pele de animais submetidos a radiação UVB.....	89
Figura 23 - Efeito do tratamento com P1G10 em lesões de pele produzidas pela exposição à radiação UVB	91
Figura 24 - Análise morfométrica da Derme-hipoderme da pele do dorso dos animais <i>Hairless</i> tratados com P1G10 após a irradiação aguda por UVB.....	93
Figura 25 - Análise morfométrica da celularidade da hipoderme na pele do dorso dos animais <i>Hairless</i> tratados com P1G10 após a irradiação aguda por UVB	95
Figura 26 - Fotomicrografias na pele do dorso dos animais <i>Hairless</i> tratados com P1G10 após a irradiação aguda à UVB corados com tricrômico de Gomori.....	96
Figura 27- Análise semi-quantitativa mostrando o efeito de P1G10 sobre a organização e preservação das fibras colágenas em fragmentos de pele após a irradiação por UVB	97
Figura 28 - Efeito de P1G10 sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em camundongos <i>Hairless</i> após dose única de UVB.....	98
Figura 29 - Efeito de P1G10 sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos <i>Hairless</i> após a irradiação com UVB.	99
Figura 30- Efeito de P1G10 sobre a atividade de MMP9 em fragmentos de pele após a irradiação com UVB.	101
Figura 31 - Efeito de P1G10 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e produtos de lipoperoxidação na pele de animais irradiados com UVB.....	103
Figura 32 - Efeito de P1G10 sobre enzimas do sistema antioxidante em fragmentos de pele de animais irradiados com UVB.	104
.Figura 33 - Efeito de P1G10 sobre a fosforilação de Akt em pele de camundongos <i>Hairless</i> expostos à UVB.....	105

Figura 34 - Efeito de P1G10 sobre a expressão de COX-2 em pele de camundongos <i>Hairless</i> expostos à UVB.....	106
Figura 35 - Efeito de P1G10 sobre a expressão da proteína p53 em pele de camundongos <i>Hairless</i> expostos à UVB.	107
Figura 36 - Efeito de P1G10 sobre a expressão de caspase 3 em pele de camundongos <i>Hairless</i> expostos à UVB.	108
Figura 37 - Fotomicrografias da epiderme dos animais <i>Hairless</i> , tratados com P1G10 após à UVB, marcadas com o anticorpo anti-caspase3.....	109
Figura 38 - Efeito da fração P1G10 sobre a atividade sequestrante do radical livre DPPH.	110
Figura 39 - Avaliação da viabilidade de queratinócitos Hacat após exposição à radiação UVB.....	111
Figura 40 - Viabilidade celular frente ao tratamento com P1G10 através do ensaio MTT.....	112
Figura 41 - Avaliação <i>in vitro</i> do efeito de P1G10 sobre a viabilidade celular de queratinócitos <i>HaCat</i> expostos a radiação UVB.....	113
Figura 42 - Efeito de P1G10 na produção de EROS induzidos por radiação UVB..	114
Figura 43 - Efeito de P1G10 sobre peles expostas múltiplas doses de UVB por 10 dias consecutivos.....	115
Figura 44 - Fotomicrografias dos fragmetnos de pele do dorso dos animais <i>Hairless</i> tratados com P1G10 e após doses múltiplas de UVB.....	117
Figura 45 - Fotomicrografias na pele do dorso dos animais <i>Hairless</i> tratados com P1G10 por 10 dias consecutivos à UVB e corados com tricrômico de Gomori.....	118
Figura 46 - Medida morfométrica da Epiderme e Derme/hipoderme da pele do dorso dos animais <i>Hairless</i> tratados com P1G10 após doses repetidas de UVB.	120
Figura 47 - Análise morfométrica da celularidade da hipoderme na pele do dorso dos animais <i>Hairless</i> tratados com P1G10 após doses múltiplas de UVB.....	121
Figura 48 - Fotomicrografias da epiderme dos animais <i>Hairless</i> , tratados com P1G10 após doses repetidas à UVB, marcadas com o anticorpo anti-PCNA.	123
Figura 49 - Efeito de P1G10 sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos <i>Hairless</i> após múltiplas doses de UVB.	124
Figura 50 - Efeito de P1G10 sobre a atividade de MMP9 em fragmentos de pele após múltiplas doses de UVB.....	126

Figura 51 - Efeito de P1G10 no estresse oxidativo em fragmentos de pele, após múltiplas doses de UVB.	127
Figura 52 - Efeito de P1G10 no sistema antioxidante em fragmentos de pele, após doses múltiplas de UVB e tratados com P1G10 por 10 dias consecutivos.	129
Figura 53 - Efeito de P1G10 sobre a fosforilação de p38 MAPK em pele de camundongos <i>Hairless</i> expostos à doses repetidas de UVB.	130
Figura 54 - Efeito de P1G10 sobre a fosforilação de JNKem pele de camundongos <i>Hairless</i> expostos à doses repetidas de UVB.....	131
Figura 55 - Efeito de P1G10 sobre a fosforilação de AKTem pele de camundongos <i>Hairless</i> expostos à doses repetidas de UVB.....	132
Figura 56 - Ilustração dos principais eventos que ocorrem na pele de camundongos <i>Hairless</i> em resposta à exposição aguda da radiação UVB.....	140
Figura 57 - Diagrama esquemático mostrando o efeito de P1G10 em alterações celulares e moleculares induzidas por exposição dose única UVB.....	150
Figura 58 - Diagrama esquemático mostrando o efeito de P1G10 em alterações celulares e moleculares induzidas por doses múltiplas à UVB.....	158

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos experimentos de <i>Western blotting</i>	76
Tabela 2 - Avaliação macroscópica da pele de camunundongos <i>hairless</i> antes e após a irradiação com UVB.....	81
Tabela 3 - Avaliação macroscópica da pele de camunundongos <i>Hairless</i> tratados ou não com P1G10, após a irradiação com UV	90

Lista de Siglas

AINE	Antiinflamatório não esteroidal
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
AP 1	Proteína ativadora-1, do inglês <i>activator protein 1</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
CBC	Carcinoma basocelular
CEBIO	Centro de bioterismo
CEC	Carcinoma espinocelular
CETEA	Comitê de ética em experimentação animal
COX2	Ciclooxigenase-2
Cu/ZnSOD	Cobre/zinco superóxido dismutase
DCFH-DA	2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DHE	Dihidroetidina
DMEM	Meio de cultura eagle modificado por dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido deoxyribonucleico, do inglês <i>desoxiribonucleic acid</i>
DPPH•	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
e.p.m	Erro padrão da média
EC-SOD	Superóxido dismutase extracelular
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERKs	Quinases reguladas por sinais extracelulares
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro fetal bovino, do inglês <i>fetal bovine serum</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HE	Hematoxilina-eosina
ICB	Instituto de ciências biológicas
IKK	Inibitory kappa b alpha kinase
IL	Interleucina
IL 1 β	Interleucina 1beta
INCA	Instituto nacional de câncer
iNOS	Sintetase induzida por oxido nítrico
JNKs	Quinases c jun amino terminais
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeido
MMP-9	Metaloproteinase-9
MMPs	Metaloproteinases
MnSOD	Manganês superóxido dismutase

MPO	Mieloperoxidase
MTT	Sal de tetrazólio, do inglês <i>metiltiazolil-difenil-tetrazoluim bromid</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa b
NO	Óxido nítrico
OH-1	Heme oxigenase 1
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PGE	Prostaglandina e
PGE	Prostaglandina e
PGE2	Prostaglandinas e2
RUV	Radiação ultravioleta
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês transforming growth factor
UFMG	Universidade federal de minas gerais
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C

Lista de Símbolos e abreviaturas

Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
cm	centímetros (10 ⁻² m)
h	hora
g	grama
iv	intravenosa
kDa	quilodalton
Kg	quilogramas (10 ³ g)
mg	miligramas (10 ⁻³ g)
min	minutos
mL	mililitros (10 ⁻³ L)
mm	milímetros (10 ⁻³ m)
% (v/v)	Percentual (volume/volume)
µL	microlitros (10 ⁻⁶ L)
µg	microgramas (10 ⁻⁶ g)
M	concentração Molar (moles/L)
nm	nanômetro (10 ⁻⁹ m)
nM	concentração nanomolar (10 ⁻⁹ moles/L)
mM	concentração milimolar (10 ⁻³ moles/L)
p.e	Por exemplo
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
V	Volts
v.s	<i>versus</i>
W	Watts
% (p/v)	Percentual (peso/volume)
°C	graus Celsius ou centígrados
Da	Daltons
D.O	densidade ótica
et al	e outros, do latim <i>Et alli</i>
¹ FS•	fluoróforo singlete
³ FS•	fluoróforo triplete
O ₂ ^{•-}	ânion superóxido
OH ⁻	hidroxila
¹ O ₂	oxigênio singlete
-SH	grupos sulfidrilas
ONOO ⁻	peroxinitrito
NO ₂ [•]	dióxido de nitrogênio
LOOH	hidroperóxidos lipídios
CV	controle veículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1 VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS	19
1.1.1 ATIVIDADE CICATRIZANTE DE P1G10.....	20
1.1.2 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS	22
1.2 A PELE: FUNÇÃO E ESTRUTURA	23
1.3 A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E A PELE	25
1.3.1 A RADIAÇÃO UV.....	26
1.3.2 FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INDUZIDAS PELA RADIAÇÃO	28
1.4 EFEITOS OXIDATIVOS E BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO UV	32
1.4.1 SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	32
1.4.2 DANOS AO DNA: MECANISMO DE REPARO E MORTE CELULAR.....	36
1.4.3 INFLAMAÇÃO	39
1.4.4 DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	42
1.5 PREVENÇÃO E PROTEÇÃO DOS DANOS PROMOVIDOS POR UVB	44
2 JUSTIFICATIVA	48
3 OBJETIVOS	49
3.1 GERAL	49
3.2 ESPECÍFICOS	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 MATERIAIS	50
4.1.1 BIOLÓGICOS.....	50
4.1.2 REAGENTES E SOLVENTES	50
4.1.3 EQUIPAMENTOS.....	51
4.1.4 DIVERSOS	52
4.1.5 SOLUÇÕES PRINCIPAIS.....	53
4.1.5.1 Soluções utilizadas na determinação da atividade de Mieloperoxidase e Citocinas.....	54
4.1.5.2 Soluções utilizadas na determinação da atividade da metaloproteinase-9 (MMP-9) – Zimografia.....	55
4.1.5.3 Soluções utilizadas no ensaio Western Blotting e Cultura Celular.....	57
4.1.6 VEÍCULO PARA INCORPORAÇÃO DA FRAÇÃO P1G10	61
4.2 MÉTODOS	61
4.2.1 AVALIAÇÃO IN VIVO.....	61
4.2.1.1 Caracterização e padronização de modelo de lesão de pele por irradiação com UVB	61
4.2.1.2 Avaliação do efeito de P1G10 sobre lesões induzidas pela radiação UVB.....	64
4.2.1.3 Obtenção das amostras de pele	66
4.2.1.4 Dosagem de fatores antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em pele de camundongos <i>Hairless</i>	67
4.2.1.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio – EROs nos fragmentos de pele dos camundongos <i>Hairless</i>	69
4.2.1.6 Medida da peroxidação lipídica (Tbars) nos fragmentos de pele dos camundongos <i>Hairless</i>	70
4.2.1.7 Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) nos fragmentos de pele os camundongos.....	70
4.2.1.8 Quantificação de nitrito em fragmentos de pele de camundongos <i>Hairless</i>	71
4.2.1.9 Ensaio imunoenzimático para dosagem de IL8, TNF- α e IL-1 β nos fragmentos de pele os camundongos <i>Hairless</i>	72
4.2.1.10 Ensaio zimografia.....	73

4.2.1.11	Análise histológica.....	73
4.2.1.12	Western Blotting	75
4.2.2	AVALIAÇÃO IN VITRO.....	76
4.2.2.1	Avaliação da atividade antioxidante in vitro da amostra de P1G10	76
4.2.2.2	Cultivo celular.....	78
4.2.2.3	Determinação do nível ótimo de irradiação UVB em cultura de queratinócitos	78
4.2.2.4	Avaliação da citotoxicidade da radiação UVB ou P1G10 por ensaio de MTT	78
4.2.2.5	Avaliação da formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS)	79
4.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	80
5	RESULTADOS	81
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO <i>IN VIVO</i> DE EXPOSIÇÃO À UVB - DOSE ÚNICA.....	81
5.1.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	81
5.1.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA	82
5.1.2.1	Avaliação de parâmetros inflamatórios.....	86
5.1.3	AVALIAÇÃO DO SISTEMA OXIDANTE/ANTIOXIDANTE.....	87
5.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE P1G10 NA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB - DOSE ÚNICA	90
5.2.1	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i>	90
5.2.1.1	Análise macroscópica.....	90
5.2.1.2	Análise histológica.....	91
5.2.1.3	Avaliação de parâmetros inflamatórios.....	97
5.2.1.4	Atividade de Metaloproteinase-9 (MMP-9).....	100
5.2.1.5	Perfil do sistema oxidante/antioxidante	101
5.2.1.6	Expressão de proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização celular	104
5.2.2	AVALIAÇÃO IN VITRO.....	110
5.2.2.1	Avaliação da atividade antioxidante da amostra de P1G10.....	110
5.2.2.2	Avaliação da citotoxicidade da radiação UVB em cultura de queratinócitos	110
5.2.2.3	Avaliação da citotoxicidade de P1G10 em cultura de queratinócitos	112
5.2.2.4	Avaliação do efeito de P1G10 na eliminação de EROS intracelular.....	113
5.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE P1G10 SOBRE O MODELO <i>IN VIVO</i> DE EXPOSIÇÃO DE MÚLTIPLAS DOSES.....	114
5.3.1	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	115
5.3.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA	115
5.3.3	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS.....	124
5.3.4	ATIVIDADE DE METALOPROTEINASE-9 (MMP-9).....	125
5.3.5	PERFIL DO SISTEMA OXIDANTE/ANTIOXIDANTE.....	126
5.3.6	EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM DIFERENTES VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR	
	129	
6	DISCUSSÃO.....	133
6.1	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE EXPOSIÇÃO AGUDA À UVB – DOSE ÚNICA.....	133
6.2	P1G10 MODULA O SISTEMA ANTIOXIDANTE E INFLAMATÓRIO INDUZIDOS POR EXPOSIÇÃO AGUDA À UVB – DOSE ÚNICA	140
6.3	P1G10 MODULA O SISTEMA ANTIOXIDANTE E INFLAMATÓRIO INDUZIDOS POR EXPOSIÇÃO AGUDA À UVB – DOSES MÚLTIPLAS	151
7	CONCLUSÃO	159
8	REFERÊNCIAS	161
	ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UFMG.....	190
	ANEXO B - OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEOLÍTICA P1G10 DO LATEX DE <i>VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS</i>	191
	ANEXO C - AFERIÇÃO DA LÂMPADA UVB-15W	201

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A pele é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos e inorgânicos do meio ambiente (RIBEIRO, 2010), promovendo uma barreira seletiva entre o corpo e o meio externo (FITCH & SWAIM, 1995). Por essa função, a pele está direta e frequentemente exposta à um ambiente pró-oxidante, incluindo a luz solar, principalmente a radiação ultravioleta B (UVB) (ISHIDA & SAKAGUCHI, 2007). A UVB induz efeito direto em biomoléculas da pele gerando mutações e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (AFAQ & MUKHTAR, 2006). Além disso, a radiação leva à ativação de síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias, cujo genes de expressão são dependentes da ativação de fatores de transcrição como NFκB e/ou AP-1 e vias de sinalização, como vias MAP quinases e PI3K/Akt (SASAKI et al., 2000; GRANDJEAN-LAQUERRIERE et al., 2003). Tais eventos resultam em uma variedade de distúrbios cutâneos, incluindo queimadura e imunossupressão, como também efeitos ao longo prazo, como fotoenvelhecimento e câncer de pele (GARCÍA et al., 2010). Desse modo, diversos autores relatam a necessidade do uso de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias tópicas como uma estratégia eficaz contra os efeitos adversos promovidos pela radiação UVB (AFAQ & MUKHTAR, 2006; CASAGRANDE et al., 2006; PRATHEESHKUMAR et al., 2014). Nos últimos anos, os produtos naturais têm recebido considerável interesse, principalmente, aqueles que possuem propriedades antioxidantes e de reparo tecidual e que promovam benefícios potenciais na prevenção e tratamento de doenças degenerativas e diferentes tipos de lesões.

1.1 *Vasconcellea cundinamarcensis*

A espécie *Vasconcellea Cundinamarcensis* (sinonímia *Carica candamarcensis*) tem sido objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa há alguns anos, quanto ao potencial farmacológico e do ponto de vista bioquímico. Trata-se de uma planta nativa da América do Sul que apresenta um tronco grosso geralmente ramificado, medindo até 5 m de altura e que contém uma coroa compacta de folhas na sua parte terminal ou nas extremidades das ramificações (LEON, 1987). Possui

como fruto um mamão de 10 a 15 cm de tamanho, que apresenta canais laticíferos, em sua superfície, através dos quais é liberado um látex rico em cisteíno proteases (BRAVO *et al.*, 1994). A liberação do látex ocorre quando de uma injúria no fruto e o processo de regeneração lembra a cicatrização em mamíferos (MOUTIM *et al.*, 1999).

A partir das observações quanto aos mecanismos envolvidos na regeneração do tecido vegetal de plantas da família Caricaceae e o uso da papaína (cisteíno protease do látex de *Carica papaya*) como cicatrizante cutâneo, foi proposto o estudo da atividade mitogênica e cicatrizante de frações e proteases purificadas do látex de *V. candamarcensis*, resultando no depósito de uma patente (Patente – USPTO, 11/378.196 “*Proteases from Carica having mitogenic activity and their methods of use*” publicado 17/03/2006, USA). Através de filtração cromatográfica em coluna *Sephadex G10*, partir da amostra do látex é obtida 2 picos bem definidos, denominados P1G10 e P2G10, sendo o primeiro rico em cisteíno proteases (SILVA *et al.*, 2003).

1.1.1 Atividade cicatrizante de P1G10

Os estudos realizados em modelos de dermoabrasão em camundongos *Hairless*, demonstraram que a fração incorporada em creme Polawax®, nas concentrações 0,1, e 1,0%, apresentou efeito cicatrizante, com taxa de cicatrização de 100 e 600% superior às lesões controle, respectivamente. P1G10 também foi mais eficaz na cicatrização dessas lesões, em relação à papaína 0,1%, uma vez que a taxa de cicatrização promovida por esta cisteíno protease foi 66% maior quando comparada com as das lesões controle (MELLO *et al.*, 2006). Similarmente, LEMOS *et al.* (2011) mostraram, nesse mesmo modelo, o efeito cicatrizante de 0,1% P1G10, após oito dias da indução da ferida cutânea. Ademais, os autores também mostraram que esse efeito é independente da atividade proteolítica da fração, já que a sua inibição com Iodocetamida (IAA) não alterou sua ação cicatrizante.

Visando estudar a capacidade cicatrizante de P1G10 em lesões de diferentes etiologias, seguimos com outros modelos de cicatrização cutânea, como em

queimaduras provocadas por escaldadura. Camundongos *Hairless* foram submetidos à imersão de uma área delimitada da pele do dorso, em água a 90-95°C/10s. Após 24 h, o tratamento com P1G10 (0,01-1%) foi iniciado e realizado a cada 48 h, com oclusão das lesões. P1G10 0,1% ocasionou a taxa máxima de reepitelização entre 25 e 27 dias, sendo o controle observado a partir de 30 dias após a lesão. A avaliação histológica, mostrou que as concentrações de 0,01 e 0,1% de P1G10 promoveram a diminuição do infiltrado inflamatório e maior organização das fibras de colágenos paralelas e alinhadas ao epitélio (GOMES et al.,2009).

FREITAS (2011) avaliou o efeito da fração P1G10, incorporada em creme Polawax® sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais, confeccionadas com um furador circular de 5 mm de diâmetro no dorso de camundongos C57B16. Foi observado que no terceiro dia de tratamento, os animais do grupo P1G10 0,05% já apresentaram um percentual de retração da ferida significativamente maior em relação ao grupo controle. E no sétimo dia de tratamento esse mesmo grupo apresentou 80% de fechamento da ferida. Constatou-se ainda, que a atividade cicatrizante de P1G10 a 0,05% é dependente da sua atividade proteolítica, uma vez que a inibição desta (P1G10-IAA) não resultou em um efeito cicatrizante satisfatório. Foi observado, também, que o tratamento com P1G10 0,05% promoveu a redução da área do tecido de granulação e infiltrado inflamatório, a diminuição da apoptose, o aumento do depósito e maior organização do colágeno, além do aumento dos níveis de TGF- β ativo e redução da atividade da enzima metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9).

Além dos efeitos cicatrizantes, em feridas cutâneas, nosso grupo também avaliou a atividade protetora e cicatrizante gástrica de P1G10. MELLO et al (2008) mostraram que P1G10 foi eficaz de proteger o estômago de ratos contra lesões induzidas por indometacina, atingindo na maior dose testada (10 mg/kg) um efeito similar aos dos medicamentos controle (ranitidina – 100 mg/kg e omeprazol – 10 mg/kg). Além disso, esses autores observaram que os animais tratados com a fração apresentavam aumento da produção de muco. Tal efeito foi atribuído ao aumento dos níveis de prostaglandinas E2 (PGE₂) e grupos sulfidrílicos não-protéicos em estudos conduzidos por ARAÚJO-SILVA et al (2015). Além desses mediadores, os

autores mostraram que ação gastroprotetora de P1G10 é independente da ação do óxido nítrico (NO) e da atividade proteolítica da fração.

Estudos clínicos de Fase I e um estudo inicial de Fase II utilizando esta fração também já foram desenvolvidos. Na Fase I, realizada com indivíduos saudáveis, verificou-se a segurança e a inocuidade da administração tópica da fração na concentração de 0,1%, demonstrada pela ausência de evidências clínicas e laboratoriais de toxicidade. Os resultados preliminares de ensaio clínico de Fase II, em voluntários portadores de úlceras de pressão e venosas, mostraram que P1G10 0,1% reduziu os valores de comprimento (51,0%), largura (67,0%) e profundidade (37,0%) das feridas, enquanto que apenas os valores de profundidade das feridas tratadas com sulfadiazina de prata 1,0% (tratamento padrão) foram diminuídos (74,0%) (GOMES, 2009).

1.1.2 Estudos toxicológicos

Estudos toxicológicos sistêmicos realizados até o momento, demonstram que a atividade de enzimas do citocromo P450, o consumo alimentar, o peso corporal e do fígado e os valores de proteínas totais microsossomais encontrados nos grupos controle e tratado com P1G10 (334 mg/kg/dia- 6 dias (total 2 g/kg) não apresentaram diferenças estatísticas significativas (MELLO et al., 2006). Constatamos que a fração P1G10 possui baixa toxicidade aguda, não apresenta efeito mutagênico, medido pelo teste Ames e teste de micronúcleo, em concentrações que garantem sua aplicação terapêutica com margem de segurança por diferentes vias de administração (VILLALBA et al., 2010; LEMOS et al., 2016).

Na avaliação da toxicidade tópica de P1G10, foram feitas aplicações da fração nas concentrações de 0,1; 1 e 10% (p/v) incorporados em creme Polawax® no dorso de camundongos *Hairless*. Após um período de 10 dias de tratamento com 0,1 e 1% não foi observada qualquer alteração que pudesse ser caracterizada como efeito tóxico. Nos animais tratados com P1G10 10%, observou-se uma vermelhidão difusa no local da aplicação, caracterizando uma resposta inflamatória leve. As avaliações da toxicidade tópica subcrônica e crônica de P1G10 0,1% (maior efeito

cicatrizante) foram realizadas durante três e seis meses de tratamento, respectivamente, em camundongos *Swiss*, previamente depilados. Os resultados da análise histopatológica e da variação de peso dos órgãos selecionados demonstraram que não houve diferenças entre o grupo controle (Polawax®) e o tratado com P1G10, indicando uma ausência de toxicidade no modelo estudado (LEMOS et al., 2011). Além disso, esses autores mostraram que P1G10, marcada com o isótopo radioativo ^{99m}Tc , possui maior permeação cutânea em pele lesionada, no entanto, quando incorporada em creme Polawax®, apresenta uma retenção cutânea significativa do ativo em relação à solução aquosa aplicada. Assim, os autores sugerem avaliar outros veículos para a incorporação da fração P1G10. Em adição, MALHEIROS et al., 2011 relatam que o creme Polawax® possui características que podem mascarar, parcialmente, a ação de ativos incorporados nessa formulação.

1.2 A pele: Função e estrutura

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 16% do peso corporal (VAN LAETHEM *et al.*, 2005). Esse importante órgão desempenha inúmeras funções: proteção mecânica, barreira hídrica, controle da temperatura corporal, defesa imunológica, excreção de sais e síntese de vitamina D, dentre outras (KANITAKIS, 2002). Em cortes histológicos, observa-se três camadas, a epiderme, mais externa, e a derme, a intermediária. Logo em seguida, encontra-se uma camada formada por tecido adiposo, considerada como camada subcutânea ou hipoderme (RIBEIRO, 2010) (Figura 1).

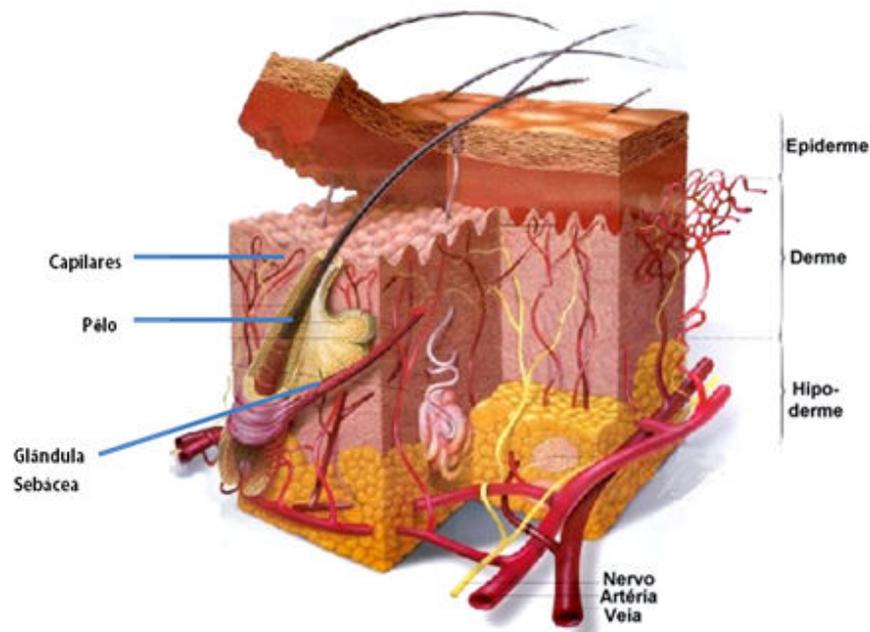


Figura 1 - Representação histológica da pele e suas camadas. Fonte: Adaptado de ESTAÇÃO DIGITAL MÉDICA, 2005

A primeira camada da pele, a epiderme, consiste em um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado derivado embriologicamente do ectoderma cutâneo e formada por quatro sub-camadas. Essa camada é constituída de células de defesa (células de Langerhans), células sensoriais (célula de Merkel), células pigmentares (melanócitos) e queratinócitos, que são a principais células da epiderme, estando em maior número. Os queratinócitos possuem ciclos de proliferação e diferenciação que resulta no processo de queratinização e morte celular por apoptose (LEVER, 2009). Assim, as sub-camadas que formam a epiderme são definidas pela posição, forma, morfologia, e estado de diferenciação desses queratinócitos e conhecidas como basal, espinhosa, camada granular e córnea (VAN LAETHEM *et al.*, 2005). A camada epiderme penetra na derme através de cones interpapilares, chamados de *cristas epidérmicas*, e a derme se adentra à epiderme através das *papilas dérmicas*, essa interface é conhecida como *junção dermoepidérmica*, além de ter como função a adesão, ela serve de suporte para a epiderme (AZULAY *et al.*, 2013).

A próxima camada da pele é a derme que é formada por tecido conjuntivo (resistente e elástico), e constituída de apêndices cutâneos (glândulas sudoríparas, sebáceas, folículo piloso e dentre outros), vasos sanguíneos, linfáticos, diversas células, tais como os fibroblastos, a principal, macrófagos, linfócitos e granulócitos (IOBST *et al.*, 2006). Além disso, possui uma matriz extracelular (MEC) composta de

colágeno e elastina (fibras) inseridas em uma substância fundamental constituída por água, sais minerais e macromoléculas (glicoaminoglicanos, mucopolissacarídeos e glicoproteínas de matriz). Essa estrutura dérmica é dividida em duas regiões, uma que se encontra mais próxima da epiderme, a derme papilar ou superficial, e logo abaixo, a derme reticular ou profunda (RIBEIRO, 2010). A derme papilar é formada muitas células e finos feixes fibrilares de colágenos dispostos verticalmente, enquanto que a derme reticular ou profunda é constituída de feixes mais densos de colágeno, ondulados e dispostos horizontalmente (AZULAY et al., 2013). Desse modo, a camada dérmica serve de suporte estrutural para a pele e nutricional para a camada epidérmica.

A camada mais profunda da pele, a hipoderme ou panículo adiposo, é composta de lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (SAMPAIO & RIVITI, 2001). Essa camada desempenha um papel importante na regulação térmica, isolamento e armazenamento de energia e proteção mecânica, além disso,

serve de ancoragem para os bulbos foliculares (KANITAKIS et al., 2002).

1.3 A radiação ultravioleta e a pele

Por estar em contato direto com o meio externo, a pele está exposta a vários fatores ambientais, sendo um destaque, a radiação ultravioleta (RUV), que é considerada como o fator mais importante que afeta a estrutura e função da pele (CLYDESDALE et al., 2001). O excesso de exposição à radiação solar promove efeitos agudos, incluindo queimadura (eritema e edema) e bronzeamento (TANAKA et al., 2004) que surgem alguns minutos ou horas. A exposição prolongada pode resultar em efeitos crônicos como a degradação da matriz extracelular, formação de rugas e o aumento do risco em desenvolver lesões pré-cancerosas (ISHIDA & SAKAGUCHI, 2007).

As alterações do estilo de vida dos indivíduos, ao longo das últimas décadas, incluindo o bronzeamento recreativo, associado à contínua destruição da camada de ozônio, levaram ao aumento da incidência de doenças dermatológicas

(CLYDESDALE et al., 2001; RAMACHANDRAN & PRASAD, 2012). Dentre os cânceres de pele, estima-se, nos Estados Unidos, que a exposição UV está associado a 65% dos casos de melanoma e 90% dos cânceres de pele não-melanoma, incluindo o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC) (RAMASWAMY et al., 1998; HAN et al., 2011). Nesse país, a incidência do câncer de pele não-melanoma aumentou e é o responsável, por aproximadamente, 15.000 mortes, 3,5 milhões de novos casos, e mais de 3 bilhões de dólares por ano, em custos médicos, portanto, representando um importante problema de saúde pública (KIM & HE, 2014). No Brasil, dados publicados em 2015, pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), relata que o câncer de pele não-melanoma é o mais frequente na população brasileira. O Instituto estimou para o ano de 2016, 80.850 novos casos em homens e 94.910 em mulheres.

1.3.1 A radiação UV

A RUV é uma onda eletromagnética não-ionizante (SILVA, 2008), representa 8% do total da radiação solar, no entanto, é considerada o componente mais prejudicial e mutagênico do espectro (RIDLEY et al., 2009). Essa energia é classificada de acordo com o comprimento de onda da radiação emitida: Ultravioleta C (UVC; 100-280 nm), Ultravioleta B (UVB; 280-320 nm) e Ultravioleta A (UVA; 320-400 nm) (AFAQ & MUKHTAR, 2006), conforme mostra a Figura 2. A radiação UVA apresenta maior comprimento de onda, sendo menos energética e mais penetrante na pele, comparada com UVB (BINIEK et al., 2012).

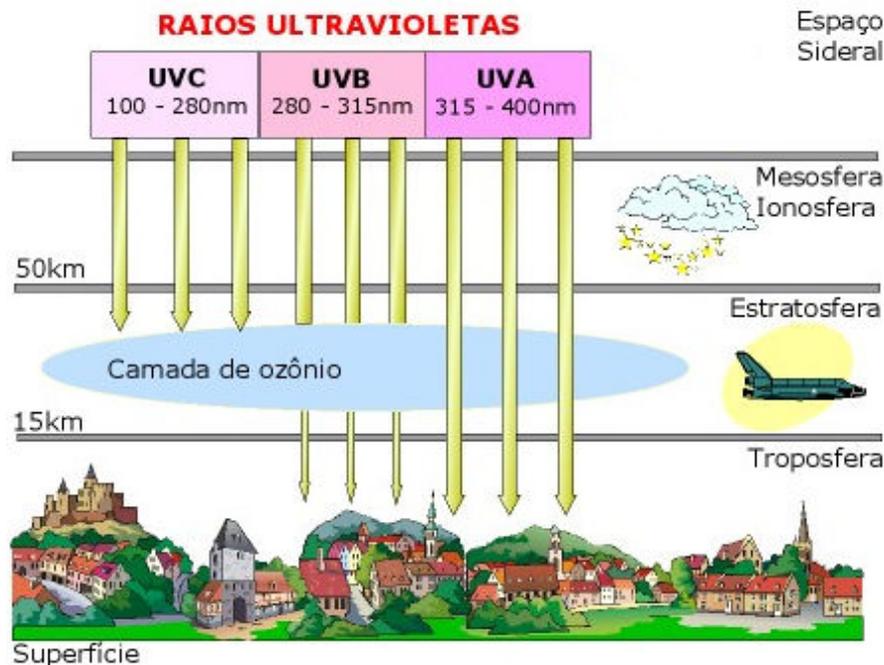


Figura 2 - Intensidade da radiação UV que atinge a superfície da Terra, após atravessar a camada de ozônio. Fonte: Disponível em <<http://www.solamigo.org/tipos-de-radiacao-uv>>. Acesso 04 de Setembro de 2016.

Por outro lado, a radiação UVB é absorvida pela camada de ozônio. Aproximadamente 95% deste comprimento de onda é bloqueado, restando apenas 5% (Figura 2), que atinge a superfície terrestre e interage apenas com a epiderme (SVOBODOVÁ & VOSTÁLOVÁ, 2006), como mostra a Figura 3. Apesar da radiação UVB contribuir com uma pequena parcela do espectro solar, é o constituinte mais ativo e genotóxico, sendo 1.000 vezes mais efetivo em produzir o bronzeamento imediato e, portanto possui maior capacidade de gerar queimadura e câncer (BENEDETTO, 1998; FILIP et al., 2013; AMARO-ORTIZ et al., 2014). Portanto, os efeitos dessa radiação para os seres vivos são muito relevantes, pois a exposição ocorre durante as atividades comuns ou no lazer (AUBIN & MOUSSON, 2004). Apesar da radiação UVC ser muito reativa, seus efeitos sobre a pele não são observados, pois os raios são bloqueados pela camada de ozônio (HYUN et al., 2013).

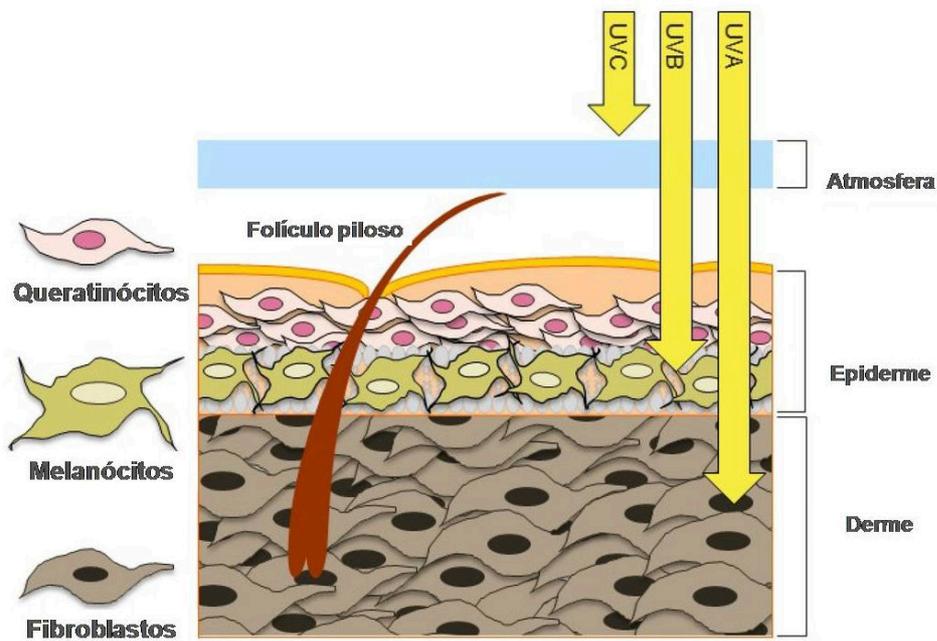


Figura 3 - Espectro eletromagnético e sua interação com a pele. A radiação UV é composta principalmente dos raios de energia UVA e UVB. Os raios UVB atingem a epiderme e causam danos direto ao DNA, enquanto que os raios UVA podem penetrar à derme e promover, indiretamente, a mutagênese. A radiação UVC é altamente reativa, no entanto, é absorvida pela camada de ozônio. Fonte: Adaptado de AMARO-ORTIZ et al., 2014.

1.3.2 Formação de espécies reativas induzidas pela radiação

EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produzidos em atividades metabólicas normais pelas células, como por exemplo, na fosforilação oxidativa mitocondrial, via metabólica do citocromo P450, peroxissomos, e células inflamatórias (WEI e t al., 2002). Por definição, denominam-se radicais livres as espécies químicas que contêm número ímpar de elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, os quais confere a alta reatividade a esses átomos ou moléculas que são capazes de capturar um elétron de qualquer outro composto próximo (FERREIRA & MATSUBARA., 1997). Esses compostos são importantes para homeostasia celular, já que são considerados mensageiros secundários e estão envolvidos em vias de transdução de sinal, ativação celular e controle da diferenciação e crescimento celular (RIBEIRO et al., 2005). No entanto, os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERNs) apresentam elevados após exposição à radiação UV (AMARO-ORTIZ et al., 2015), e em excesso depletam o sistema de defesa antioxidante da pele e promovem um desequilíbrio

oxidante/antioxidante, resultando em estresse oxidativo celular (GARCÍA et al., 2010).

As espécies reativas de oxigênio geradas, *in vivo*, apresentam diferenças na reatividade e tempo de meia vida. A formação dessas espécies reativas induzidas por radiação UV pode ocorrer, indiretamente, pela reação de fotossensibilização que consiste em um fotossensibilizador (FS) quando em estado excitado é capaz de transferir um elétron ou átomo de hidrogênio para outras moléculas e induzir a formação de EROs ou ERNs. Desse modo, fotossensibilizadores endógenos, como a flavina, absorvem luz solar e passam do estado fundamental para um estado eletronicamente excitado singlete ($^1\text{FS}^*$) e posteriormente, cruzam para um estado excitado triplete ($^3\text{FS}^*$) por inversão espontânea do spin do elétron excitado, em uma reação chamada de cruzamento intersistema, ou podem voltar para o seu estado fundamental e emitir luz (fluorescência) ou calor, conforme mostrado na Figura 4 (FOOTE, 1991). Na epiderme, o $^3\text{FS}^*$ reage com substratos orgânicos oxidáveis e formam radicais que interagem com o oxigênio molecular intracelular e transforma em radical livre instável e lesivo, conhecido como ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Essa reação é chamada de Fotossensibilização tipo I, que, muitos trabalhos relatam ser responsável pela formação dos primeiros EROs, ou seja, o ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$ (MARTIN & LOGSDON, 1987; FOOTE, 1991; DWIVEDI & PILLAI, 2014). Desse modo, o ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$ para se estabilizar promove uma reação em cadeia que resulta na geração de EROs secundários, como o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (HERRLING et al., 2007), ou mesmo sofre ação da enzima superóxido dismutase e forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LOWE, 2000).

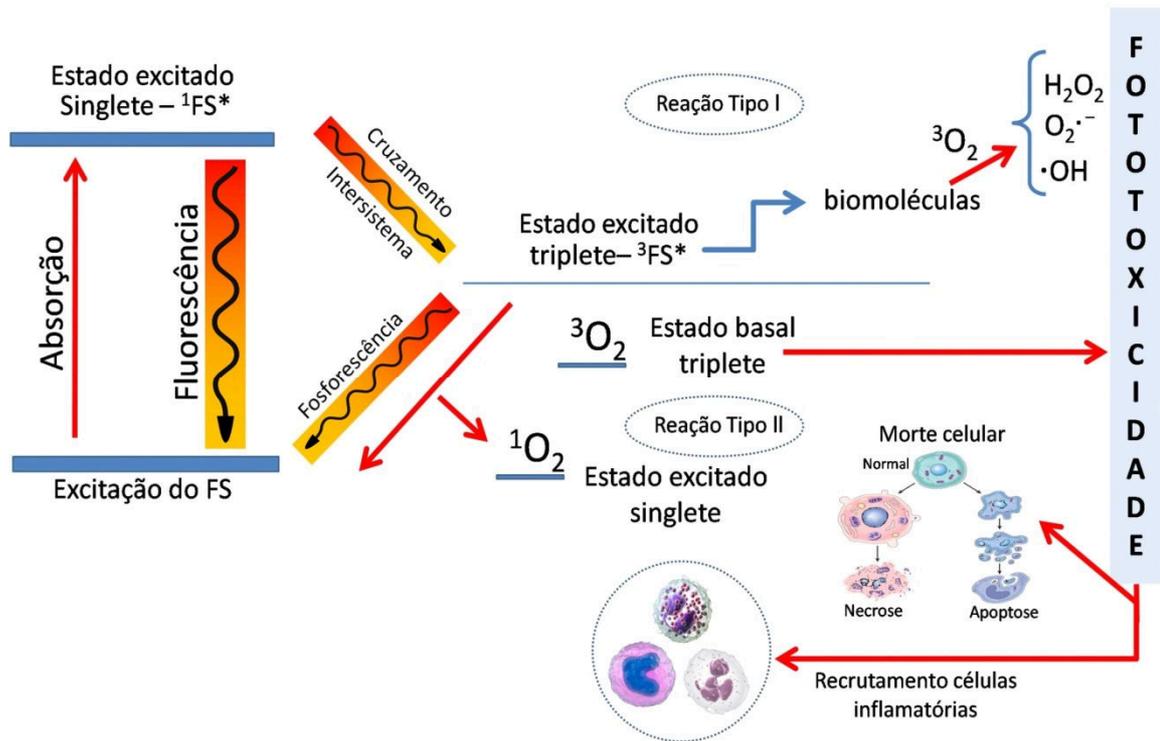


Figura 4 - Representação esquemática dos mecanismos de fotossensibilização tipo I e tipo II. Fotossensibilizadores (FS) são excitados singlete ($^1\text{FS}^*$) e retornam ao estado fundamental emitindo luz (fluorescência) ou passam para um estado triplete ($^3\text{FS}^*$). Estado tripletes transferem elétrons com biomolécula e transferência oxigênio molecular gerando radicais como os ânions superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (reação tipo I). Estado tripletes transferem energia para oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (reação tipo II). As espécies reativas formadas ativam vias inflamatórias e diferentes tipos de morte. Fonte: Adaptado de AGOSTINIS et al., 2011.

Ainda sobre a reação de fotossensibilização, o $^3\text{FS}^*$ pode reagir diretamente com a molécula de oxigênio intracelular e gerar o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) numa reação do tipo II (Figura 4) (THOMAS et al., 2002). Outra fonte de EROs é o peroxissomo que mantém em equilíbrio a produção e o consumo de H_2O_2 pela atuação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e oxidação de ácidos graxos (RIBEIRO et al., 2005). Esse composto não contém elétrons livres, portanto é uma espécie ativa de oxigênio não radicalar, devido à sua capacidade em reagir diretamente com a proteína heme, inativar enzimas, oxidar DNA, lipídios e grupos sulfidrilas ($-\text{SH}$) de proteínas. De acordo com WEI et al (2002), o H_2O_2 é uma parte da resposta da pele à exposição aguda pela radiação UVB, podendo ser gerado por queratinócitos e neutrófilos. Além disso, serve como fonte para outras espécies reativas mais tóxicas, como a OH^{\bullet} , que pode ser produzido principalmente, por duas reações bioquímicas denominadas de reação de Fenton e reação de

Haber-Weiss (MURAMATSU et al., 2005). Após a exposição à radiação, ânions $O_2^{\bullet-}$, produzidos da reação de fotossensibilização, liberam o "ferro livre" que reage com H_2O_2 , pela reação de Fenton, para a produção do radical OH^{\bullet} . O ânion superóxido também contribui para o aumento do radical OH^{\bullet} através de uma reação de redução do íon férrico (Fe^{3+}) em ferroso (Fe^{2+}), denominada de reação de Haber-Weiss (MARTIN & BURCH, 1990; BRENNEISEN et al., 2000). Os radicais, H_2O_2 e OH^{\bullet} , se diferenciam quanto ao potencial de reatividade em meio biológico, sendo o segundo mais reativo e de vida curta, portanto, reage em sítios mais próximos do seu local de formação. Já o H_2O_2 é mais estável e favorece a sua permeação pelas membranas celulares que possibilita que essa molécula reaja com alvos biológicos em compartimentos distantes do seu local de formação (HALLIWEL & GUITERIDE, 1990; HANCOCK et al., 2001).

As ERNs também são induzidas por UVB, e algumas são produzidas através da reação entre óxido nítrico gerado (NO^{\bullet}) com radicais $O_2^{\bullet-}$ produzindo radicais peroxinitrito ($ONOO^-$), altamente reativo e citotóxico (TERRA et al., 2012). Estudos conduzidos por MOWBRAY et al (2009) mostram que o radical NO^{\bullet} , por apresentar meia-vida curta, sofre rápida oxidação e armazena na pele na forma de nitratos, nitritos e grupos s-nitrosotióis por um mecanismo agudo e não enzimático. Assim, após uma exposição solar, a radiação UV pode promover a decomposição do nitrito armazenado levando a formação de NO^{\bullet} e conseqüentemente, uma cascata de reações que geram o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}). Este composto é altamente tóxico e capaz de gerar uma cadeia de reações de peroxidação lipídica, semelhante ao $ONOO^-$ (OPLÄNDER & SUSCHEK 2013).

Nesse contexto, a peroxidação lipídica produz uma grande variedade de produtos de oxidação, como os hidroperóxidos lipídios (LOOH) que são compostos muito instáveis e resultam, rapidamente, em uma variedade de sub-produtos, como por exemplo, o malondialdeído (MDA) (AYALA et al., 2014). Este composto é um produto secundário e, por ser relativamente estável, é comumente utilizado como biomarcador de injúria da membrana celular (GROTTO et al., 2009). Devido a sua reatividade com o reagente, ácido tiobarbitúrico (TBA), produz um cromógeno intensamente colorido, assim, a sua detecção é realizada por um ensaio denominado de Ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (AYALA

et al., 2014). Além disso, a monitorização da produção de radicais livres pode ser feita pela utilização de sondas fluorescentes devido a sua maior sensibilidade, conhecidas como 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) reativa para H_2O_2 , 4,5-Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2-DA) para NO^* e Dihidroetidina (DHE) para $O_2^{\bullet-}$. Esses compostos são marcadores oxidativos intra e extracelular e possuem propriedades químicas que possibilitam uma fácil difusão pela membrana celular em diferentes tecidos (SILVEIRA, 2004; ERUSLANOV & KUSMARTSEV, 2010).

1.4 Efeitos oxidativos e biológicos da radiação UV

A exposição aguda à radiação UV induz estresse oxidativo que promove oxidação de proteínas, RNA e DN que resultam em peroxidação lipídica, inflamação, imunossupressão, ativação de vias de proliferação, danos ao DNA e morte celular (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002).

1.4.1 Sistema antioxidante

A pele é um dos poucos órgãos do nosso corpo que está sujeita às exposições ao estresse oxidativo de ambas fontes, endógenas e exógenas. Desse modo, esse órgão possui um sistema antioxidante extremamente eficiente e desenvolvido para combater o aumento de radicais livres cutâneos (YANG et al., 2009). Dentre os antioxidantes, existem moléculas com natureza enzimática, incluindo a glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), heme oxigenase 1 (OH-1) e catalase (CAT), e também, antioxidantes não-enzimáticos, como ácido ascórbico, ácido α -tocoferol e glutathione (GSH) (TERRA et al., 2012). Além dessas, há enzimas auxiliares como NADPH/NADH, a ubiquinona redutase e o sistema tioredoxina/tioredoxina redutase que também exercem importante função antioxidante (FUCHS, 1998). Dentre os componentes desse sistema, observamos na literatura, que as principais moléculas citadas como participantes ativas no mecanismo de defesa antioxidante cutâneo são SOD, CAT, GPx e GSH (FILIP et al., 2010; FILIP et al., 2011; OLTEANU et al., 2012; TERRA et al., 2012). Esse sistema antioxidante desempenha um papel importante na manutenção da integridade celular (YASUI & BABA, 2006), pois, EROS e ERNs são constantemente produzidos em queratinócitos e fibroblastos e rapidamente

removidos por esse sistema para a manutenção do equilíbrio oxidante/antioxidante (OLTEANU et al., 2012).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os danos causados por EROs. Tal enzima é responsável pela dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , prevenindo a formação de compostos altamente reativos como $ONOO^-$ e OH^{\bullet} (AFONSO et al., 2007). A Figura 5 mostra as três isoformas de SOD encontradas em diferentes compartimentos celulares: Cu/ZnSOD ou SOD1 localizada no citoplasma e EC-SOD ou SOD3 em meio extracelular, ambas isoformas usam o cobre e o zinco como cofatores e o manganês como cofator para SOD2 ou MnSOD, localizado nas mitocôndrias (TEDESCO et al., 1997). De acordo com AFONSO et al (2007) a enzima SOD desempenha um papel central na sobrevivência e crescimento celular. Assim, o aumento da sua expressão está associada à proteção de tecidos do cérebro contra isquemia e doença de Parkinson, infartos e doenças inflamatórias.

O produto, H_2O_2 , da reação de SOD sofre ação da enzima CAT convertendo-o em água e oxigênio molecular (D'ORAZIO et al., 2013), conforme mostra a Figura 5. Em sistemas fisiológicos, essa enzima é a mais comum e eficiente encontrada na célula, pois cada molécula da proteína é capaz de decompor milhões de moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio por segundo (BANSAL & KAUSHAL, 2014). Dentro desse sistema, a decomposição do H_2O_2 é compartilhada, também, pela enzima GPx que, diferentemente de CAT, promove dismutação tanto de hidroxiperoxídeos orgânicos quanto inorgânicos (H_2O_2), além de prevenir a formação do radical OH^{\bullet} . A conversão do H_2O_2 pela GPx possui o auxílio da molécula GSH como única doadora de hidrogênio na reação de redução, resultando como produtos a glutatona oxidada (GSSG) e água (FONSECA et al., 2010), (Figura 5). A redução de GSSG é catalisada por glutatona redutase (GR) através de um processo dependente de NADPH (TOWNSEND et al., 2003).

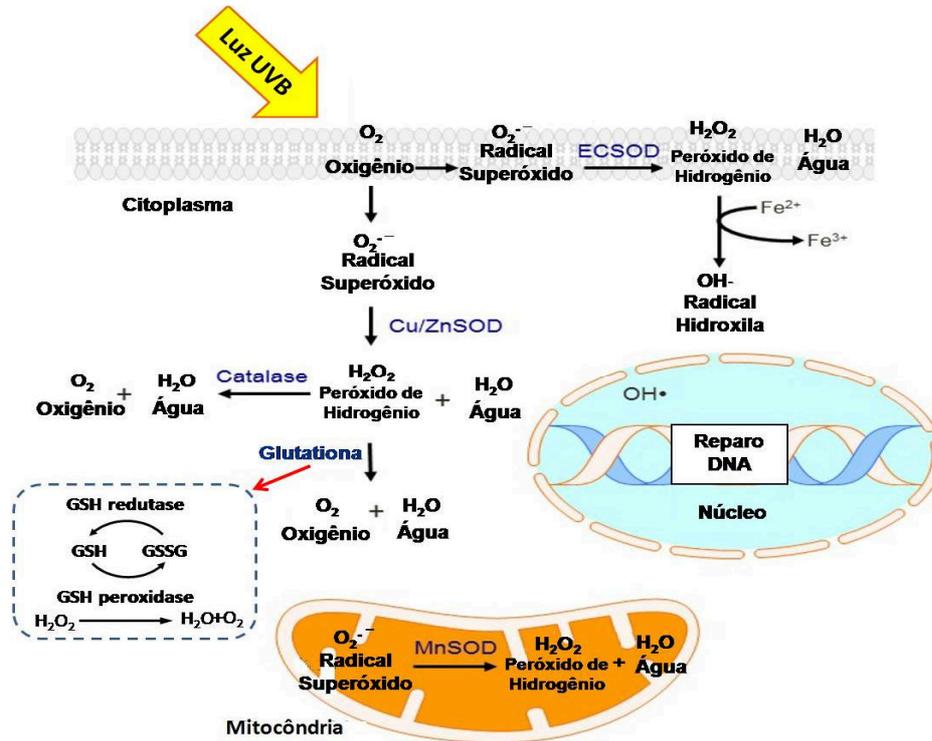


Figura 5 - Defesa antioxidante celular. UV induz radicais livres que possuem alta reatividade química e altera estruturas moleculares promovendo danos à lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Diferentes enzimas antioxidantes (SOD, GSH, CAT) medeiam a remoção de EROs que funcionam em compartimentos específicos (por exemplo, MnSOD localizadas nas mitocôndrias). O excesso de radicais pode prejudicar esse sistema de defesa antioxidante. ECSOD, superóxido dismutase extracelular. Cu/ZnSOD, cobre/zinco superóxido dismutase. MnSOD, manganês superóxido dismutase. GSH, glutathione reduzida. GSSG, glutathione oxidada. CAT, catalase. Fonte: Adaptado de AMARO-ORTIZ et al., 2014

Assim, tanto GPx quanto a CAT são enzimas importantes no mecanismo de catálise enzimática, sendo a primeira encontrada em citosol e na mitocôndria, responsável por eliminar baixas concentrações de H_2O_2 , enquanto a CAT é localizada apenas no peroxissomo, onde se espera atuar em processos com grande produção de peróxido, como o estresse oxidativo (SHINDO & HASHIMOTO, 1998). Ainda sobre o sistema glutathione, CASAGRANDE et al (2006) relata que GSH é considerada como um marcador precoce do estresse oxidativo epidermal, induzido por UVB. O grupamento tiol (-SH), do resíduo da cisteína, confere a esse tripeptídeo um poderoso poder redutor através da doação de elétrons e assim, eliminação eficiente de EROs para manutenção do equilíbrio redoxi celular (BANSAL & KAUSHAL, 2014). Portanto, o aumento da expressão e níveis de GSH estão associados a um efeito protetor contra os danos oxidativos (CASAGRANDE et al., 2006).

Essa rede de moléculas e enzimas antioxidantes atua com objetivo de manter o equilíbrio redox intracelular a fim de limitar a lesão promovida pelos radicais livres (TERRA et al., 2012; AMARO-ORTIZ et al., 2014). Conforme ilustra a Figura 06, a produção excessiva de EROS promove efeito deletério sobre o sistema de defesa antioxidante, pois ocorre uma sobrecarga na capacidade de defesa da pele que resulta um desequilíbrio entre os componentes oxidante e antioxidante cutâneo (SHINDO & HASHIMOTO, 1998; FILIP et al., 2010).

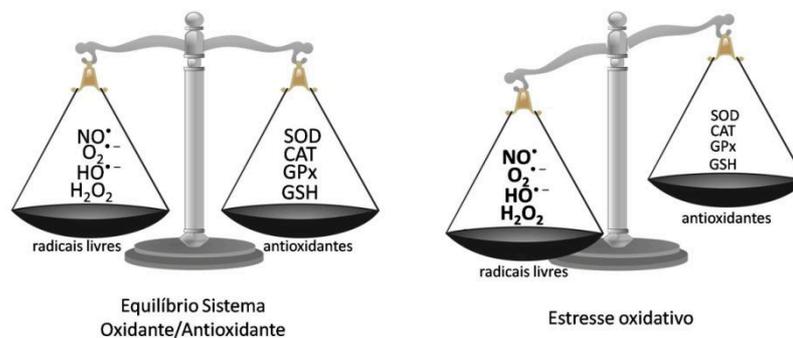


Figura 6 - Desenho ilustrativo do equilíbrio fisiológico oxidante/antioxidante e o estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre o excesso de radicais livres que depleta o sistema de defesa antioxidante. Fonte: Elaborado pelo autor.

SHINDO & HASHIMOTO (1998) relatam que a exposição aguda à UV promove redução das atividades das moléculas antioxidantes, principalmente, CAT, SOD, α -tocoferol, ácido ascórbico e GSH. Em estudos prévios, esses autores mostraram que radiação UV reduziu a atividade de SOD e CAT, em pele de camundongos irradiados, ademais, demonstraram que essa redução apresentou diferenças entre tais enzimas, sendo a CAT apresentando atividade cinco vezes maior que a SOD (SHINDO et al., 1993). FILIP et al (2011a) demonstraram que uma única dose de radiação UVB (240 mJ/cm^2) promove redução da atividade de CAT, em pele de camundongos *Hairless*. Neste mesmo modelo, diferentes estudos utilizando doses maiores da radiação UVB ($2,4 - 4,4 \text{ J/cm}^2$) mostraram que os níveis de GSH se apresentavam reduzidos, após à exposição à radiação e, sugerem que a depleção dessa molécula é requerida como um mecanismo fotoprotetor da pele

frente ao estresse oxidativo (CASAGRANDE et al., 2006; FONSECA et al., 2010; FONSECA et al., 2011; CAMPANINI et al., 2013; IVAN et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2014).

Por outro lado, alguns trabalhos mostram que a radiação UV pode induzir a ativação do sistema antioxidante, no entanto, esse efeito depende da dose da radiação e do tempo que foi avaliado após a exposição. Nesse sentido, FILIP et al (2011b) mostraram que doses repetidas de radiação UVB (240 mJ/cm², por 10 dias) estimularam a atividade antioxidante da pele, pois promoveu o aumento da atividade de GPx e níveis de GSH em pele de camundongos *Hairless*, após 24 h da última exposição. Em outro estudo, JIN et al (2007) observaram, em cultura de queratinócitos, que a atividade de GPx aumentou nas três primeiras horas após a exposição de UVB (450 J/m²) e teve o seu declínio, significativo até 24 h. Esses autores também mostraram que a atividade de SOD depende da dose de UVB usada, nesse modelo experimental, sendo em doses menores da radiação (150 J/m²) se observava maior atividade da enzima após 24 h, e em doses maiores promoviam redução dessa atividade, após 6 h da exposição. Interessantemente, VILELA et al (2012) não observaram alterações na atividade de SOD, em pele de camundongos, após 6h da exposição à dose única de 2,87 J/cm² de UVB.

1.4.2 Danos ao DNA: mecanismo de reparo e morte celular

De acordo com BOWDEN (2004), a RUV induz danos ao DNA, direta e indiretamente, os quais, se não reparados, podem replicar e gerar mutações, detectadas, por exemplo, em gene supressor de tumor (p53 mutante). UV reage com componentes celulares, como ácidos nucleicos, aminoácidos e melanina e induz danos indiretos ao DNA (HSEU et al., 2012). Estas moléculas exercem a função de cromóforos na pele, ou seja, absorvem a energia não-ionizante da radiação e sofrem transição eletrônica para um estado excitado, resultando em mudanças químicas e produção de radicais livres (TEDESCO et al., 1997), como descrito anteriormente. Ambas as reações (direta e indireta), promovidas por UV resultam na interação com diferentes componentes do DNA e produzem infinitas lesões: ligações cruzadas entre e/ou intrabases, ligações cruzadas de DNA-proteínas, além de promover quebras das cadeias de DNA (JENA, 2012). Nesse sentido, a radiação UVB induz a formação de ciclobutanos de pirimidina (CPD) e

fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs) (BLACK et al., 1987; RASTOGI et al., 2010). A formação CPD ocorre quando bases pirimidínicas adjacentes formam um anel ciclobutano pela ligação covalente e atípica entre os átomos de carbono C5 e C6, de ambas as bases nitrogenadas (Figura 7). Já a formação de 6-4PPs ocorre se essas ligações são feitas na mesma fita de DNA e de uma forma não cíclica que envolve os carbonos C6 e C4 das pirimidinas (SOEHNGE et al., 1997; KIM et al., 2013). Dentre os dímeros de pirimidinas, timina-citosina (T-C) e citosina-citosina (C-C), estas são as CPDs mais mutagênicas, e suas mutações se relacionam, frequentemente, ao gene p53 que são ativados mais intensamente pela UVB. Essas mutações são difíceis de serem reparadas, ao contrário dos fotoprodutos (SVOBODOVA et al., 2006).

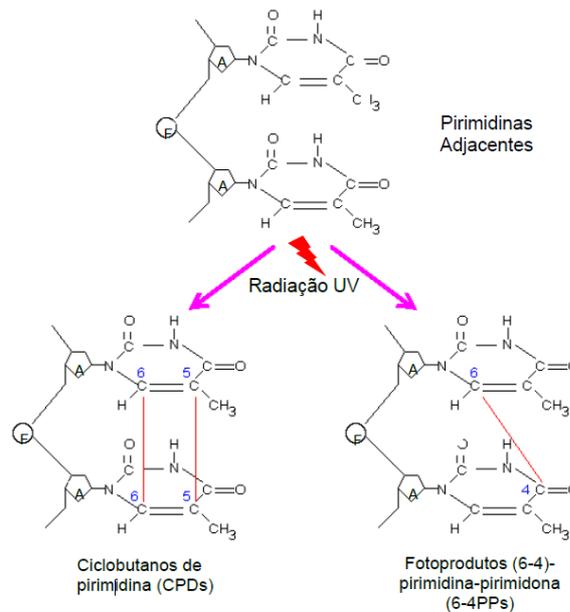


Figura 7- Lesões no DNA induzidas pela radiação UV. Fonte: SANTOS, 2010

O reparo do dano ao DNA ocorre pela parada do ciclo celular e/ou indução de apoptose, com objetivo de prevenir a instabilidade genômica e transmissão de mutações para células filhas, auxiliando na manutenção da integridade genética (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2004). Há diferentes tipos de mecanismo de reparo para determinados tipos de lesões de DNA que incluem reversão da lesão, reparo por excisão de bases (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo de quebras do DNA, recombinação homóloga e junção de extremidades (ALTIERI ET AL., 2008). Cada mecanismo consiste em vias de sinalização,

composto por genes específicos e proteínas, que participam na detecção da lesão e reparo ao DNA (LAWRENCE et al., 2009). De acordo com SMITH & SEO (2002), UV estimula a atividade da proteína p53 que está envolvida na remoção de CPDs pela via NER. Os níveis de acetilação da p53 aumentam, significativamente, em resposta ao estresse que proporciona uma estabilização da proteína, pois reduz à sua degradação pela proteína ubiquitina ligase (MDM2) (sistema ubiquitina-proteossomo) (ORTOLAN & MENCK, 2013), e conseqüentemente ocorre a sua ativação e sua translocação para o núcleo (PAL et al., 2015).

De acordo com COTRAN et al (2005), a proteína p53 funciona como um fator de transcrição, pois se liga ao DNA em uma sequência específica e ativa a transcrição de diferentes genes-alvos regulatórios, como o promotor do gene p21. Ao ser ativado, esse gene leva a produção da proteína p21 que inibe o complexo CDK4/ciclina D, bloqueando a progressão do ciclo celular (VOGELSTEIN et al., 2000; PAL et al., 2015). Além disso, a proteína p21 também é capaz de sequestrar o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), impedindo a formação do complexo PCNA-POL δ (associado à DNA polimerase δ), e assim, auxilia no bloqueio da replicação do DNA (CAYROL et al., 1998; SRIVASTAVA et al., 2007). Portanto, dentre as proteínas que participam desse mecanismo, p53 tem um papel importante no ponto de controle do ciclo celular pela indução da parada do ciclo na fase G1 e conseqüentemente, o bloqueio da replicação do DNA na fase S, até que o dano seja reparado (FILIP et al., 2013). No entanto, quando o dano ao DNA é severo, a proteína p53 induz apoptose por uma via dependente da liberação de citocromo c e ativação de Apaf1/caspase 9 (BENCHIMOL, 2001). A via intrínseca da apoptose é promovida por estresses celulares, incluindo danos no DNA, ativação de oncogenes, hipóxia, estresse oxidativo e irradiação (TOWER, 2015).

Em estudos utilizando células epiteliais e pigmentares da retina, ARMSTRONG et al (2004) observaram uma redução dos níveis de GSH, acompanhado do aumento de EROs e estresse mitocondrial que resultaram no aumento da transição da permeabilidade mitocondrial, com conseqüente morte celular. FRANCO & CIDLOWSKI (2009) relataram que a depleção de substâncias antioxidantes mitocondriais, como GSH, promove baixo potencial de membrana e abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial. Esse mecanismo resulta

na liberação de citocromo c para o citosol celular que, posteriormente, é acoplado à molécula adaptadora (Apaf-1) e dATP/ATP formando um complexo apoptossômico. Este complexo é responsável pela ativação de caspase 9 que ativará a caspase executora da apoptose, a caspase 3 (CHANG & YANG, 2000). Diversos estudos têm associado o aumento dos níveis de GSH intracelular com fenótipos resistentes à apoptose em diferentes modelos de indução de apoptose (LIU et al., 2001; FRANCO et al., 2008; . FRANCO & CIDLOWSKI, 2012).

1.4.3 Inflamação

O estresse oxidativo, induzido pela radiação UVB, desempenha um papel importante no progresso do processo inflamatório pelo estímulo da produção de citocinas pró-inflamatórias e modulação de vias de sinalização celular (HUR et al., 2010). Essa resposta promovida pela radiação é caracterizada por aparecimento de edema e eritema na pele e aumento do infiltrado inflamatório celular (KIM et al., 2005).

As EROs e ERNs, especialmente, H_2O_2 e $ONOO^-$ (gerados da radiação) interagem diretamente com diversas moléculas celulares sensíveis à estímulos oxidativos, como fator de transcrição Nuclear Kappa B (NF κ B) (XU & FISHER., 2005). NF κ B é um heterodímero (p50 e p65/RelA) e pertence à uma família de proteínas denominadas Rel como p-65 (Rel-A), Rel-B, Rel-c, p50/p105 e p52/p100. No citoplasma forma um complexo inativo com a proteína inibidora I κ B α (BHUI et al., 2009), no entanto, muitos estímulos levam à fosforilação de I κ B α em duas serinas (S32, S36) através do complexo I κ B quinase (IKK α , - β , - γ) (CHEN et al., 1996). Após a fosforilação, I κ B sofre degradação, e o NF κ B é liberado e translocado para o núcleo que se liga à receptores κ B específicos (VALLABHAPURAPU & KARIN, 2009), afim de controlar a transcrição de genes pertencentes ao processo inflamatório, incluindo TNF- α , IL-6, Interleucina-1 β (IL-1 β), IL-8, COX-2 e iNOS (BARNES et al., 1997; FILIP et al., 2013).

Na pele, UV causa liberação de IL-1 do estrato córneo e, em seguida, estimula a síntese e liberação de TNF- α nos queratinócitos (PILLAI et al., 2005). TNF- α e IL1 estimulam à mobilização de ácido araquidônico (AA) de fosfolipídeos de membrana através da ação da enzima fosfolipase A2, e subsequente, promove a

atuação de COX2 e ativação de receptores que conduz a produção de eicosanóides como prostaglandinas (PGE₂) e tromboxanos (LEE et al., 2013; BANSAL & KAUSHAL, 2014). CLYNDESDALE et al (2001) relatam que PGE₂ é um potente mediador da resposta eritemal e vasodilatador cutâneo em resposta à UV. Tal permeabilidade vascular propicia passagem de células do sangue para o interstício. Em adição, o aumento de citocinas pró-inflamatórias auxiliam na expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) estimulada por IL1 α , nos queratinócitos (PILLAI et al., 2005). UV também promove a superexpressão de E-selectina em células endoteliais microvasculares da derme.

Todos esses eventos auxiliam no recrutamento de neutrófilos e linfócitos T para o local da inflamação cutânea (CLYDASDALE et al., 2001; CHUNG et al., 2002). Esse infiltrado de células inflamatórias fagocíticas e linfócitos produzem grande quantidade de radicais livres, como ânions O₂^{•-}, HO^{•-} e H₂O₂. Adicionalmente, os neutrófilos ativados produzem mieloperoxidase (MPO) que catalisa a produção de EROS através da conversão do H₂O₂ em ácido hipocloroso (HOCl), na presença de íons cloreto (TIZARD, 2002; GRANDJEAN-LAQUERRIERE et al., 2003). Níveis aumentados de EROs também são observados na produção de mediadores inflamatórios através da liberação de fosfolipídios para serem metabolizados durante a cascata do ácido araquidônico para a produção de prostaglandinas (CHANDRA et al., 2000).

Nesse contexto, UVB induz a ativação de receptores de fatores de crescimento e de citocinas que desencadeiam a fosforilação, em cascata, de moléculas efetoras e/ou ativadoras de vias de sinalização inflamatória, como a via de proteína quinases ativadas por mitógenos (via MAP quinase) e PI3K/Akt (FISHER et al., 1998; BOWDEN, 2004; ANGGAKUSUMA et al., 2010; KIM et al., 2013). A via MAP quinase é, evolutivamente, conservada entre eucariotos e participa de uma variedade de processos biológicos em resposta a estímulos externos. Esta via pertence a uma grande família de serino/treonina quinases constituída de diferentes proteínas, como as ERKs 1 e 2 (do inglês, “Extracellular-regulated kinases 1 e 2”), JNKs (do inglês, “c-Jun NH2-terminal kinases”), e p38 MAP quinases (OSAKI & GAMA, 2013). HOMMES et al (2003) relatam que tal via desempenha um papel

central na sinalização inflamatória da superfície para o núcleo da célula. A via ERK está associada com ativação de receptores de fatores de crescimento, enquanto que a ativação das vias JNK e p-38 MAP quinases estão associadas à ativação de receptores de citocinas e com estresse celular, incluindo a radiação UV (FISHER et al., 1998; KIM et al., 2005). Essas vias controlam diretamente a expressão gênica e fosforilação de fatores de transcrição, como NF- κ B que é, geralmente estimulada por ERK e p38 MAP quinase e a proteína ativadora-1 (AP-1) por p-38 e JNK MAP quinases, estes fatores são importantes na coordenação da inflamação e resposta imune (CHOI et al., 2014).

Diversos autores mostram a importância da via p38 MAP quinase na regulação do processo inflamatório (FISHER et al., 1998; CHEN & BOWDEN, 1999; TANG et al., 2001; BACHELOR et al., 2005; ANGGAKUSUMA et al., 2010). KIM et al (2005) mostraram, em pele de camundongos *Hairless*, que UVB induz um aumento tempo-dependente da fosforilação de p-38 MAP quinase, detectada após 30 min da exposição, com nível máximo no tempo de 24 h. Em adição, esses autores, relataram que a radiação UVB aumenta a expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX2), e assim, mostraram que a inibição (inibidor SB242235) da via p-38 MAP quinase reduz os níveis de expressão dessa enzima após 3h da exposição. MUTOU et al (2010) mostraram, em células queratinócitos (linhagem *HaCat*) irradiadas com UVB, que o uso do inibidor da via p-38 MAP quinase (SB203580) inibe, especialmente, a produção das citocinas TNF- α e IL-10. Neste mesmo modelo, HUR et al (2010) mostraram que o uso do inibidor SD203580 para p-38 MAP quinases inibe a expressão de COX2 e a síntese de citocinas inflamatórias. Esses autores demonstram que p-38 MAP quinase está envolvida na ativação e translocação do fator NF- κ B para núcleo e conseqüentemente, ativação da transcrição de genes pró-inflamatórios. Ademais, outros estudos relacionam essa via com diferentes mediadores inflamatórios: sinalização da síntese de IL-6 (KIM et al., 2013), bem como no controle da transcrição de IL-1 β (BALDASSARE et al., 1999; JUNG et al., 2002).

A via PI3K/Akt também está envolvida na maquinaria de transdução de sinais que participa dessa regulação da resposta inflamatória, após a exposição à UVB (BACHELOR et al., 2005). De acordo com DI LORENZO et al (2009), diversos

estudos têm relatado a importância da sinalização PI3K/Akt em doenças mediadas por inflamação, como a artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica, psoríase e dentre outras. Tanto Akt quanto PI3K são alvos promissores de drogas com ações antagonistas afim de modular a inflamação, doenças auto-imunes e câncer.

A radiação UVB ativa a enzima PI3K que fosforila a fosfatidilinositol-3,4-difosfato (PIP2) resultando em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato ou PIP3 que pode ativar PDK-1 (do inglês, *phosphoinositide-dependent kinase1*), uma serina/treonina quinase que regula outra serina/treonina quinase conhecida como proteína quinase B (PKB ou Akt) (LIETZKE et al., 2000; HAWKINS & STEPHENS, 2015). Akt é uma quinase multifuncional envolvida em diversas funções celulares, incluindo a sobrevivência, proliferação e migração celular e expressão de genes (DI LORENZO et al., 2009). A fosforilação de Akt ativa a regulação de fatores transcricionais, como CREB e NFκB que resultam no aumento de expressão de uma ampla variedade de genes pró-inflamatórios (TANG et al., 2001; TSOYI et al., 2008; ANGGAKUSUMA et al., 2010).

1.4.4 Degradação da Matriz Extracelular

EROs, induzidos por UV, desempenham um importante papel na transdução de sinais e expressão de genes. Como mencionado, anteriormente, os radicais livres promovem a ativação de mecanismos moleculares que compreendem na ativação de diversos receptores de superfície celular e iniciação de eventos de transdução de sinais, incluindo estímulo às vias de sinalização MAP quinases, PI3K/Akt e NFκB (XU & FISHER, 2005). Conforme ilustra a Figura 8, a ativação de NFκB induz, adicionalmente, a expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs), as quais são fatores fisiopatológicos importantes no desenvolvimento do fotoenvelhecimento (KARTHIKEYAN et al., 2016).

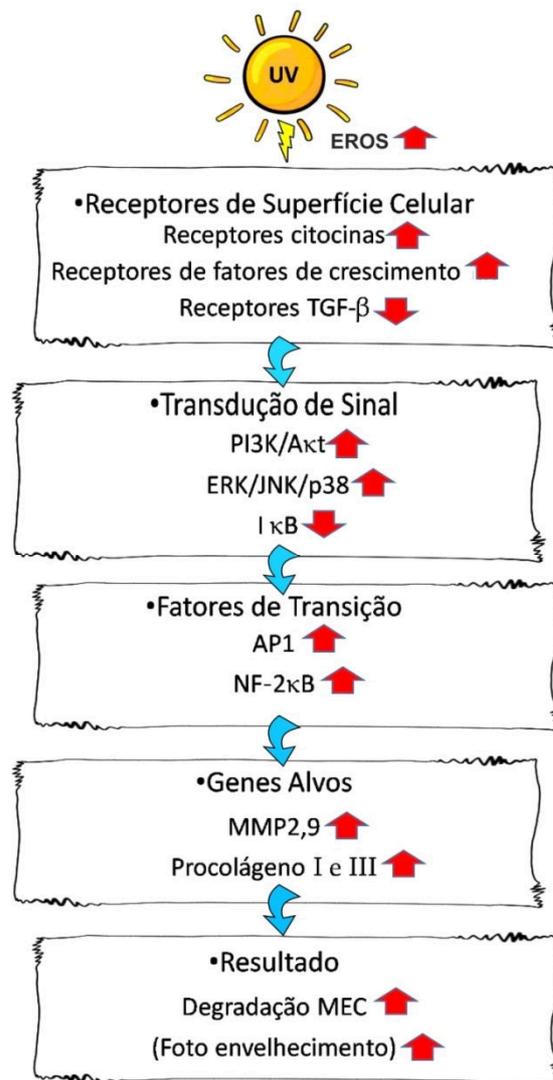


Figura 8- Diagrama de transdução de sinal, não-genômico, induzido pela radiação UV.. A radiação UV induz uma variedade de eventos de transdução de sinal, os quais são independentes aos danos do DNA. Estas vias de sinalização iniciam na superfície da célula e utilizam o circuito de sinalização celular para transmitir sinais da membrana plasmática para o núcleo e aumento de transcrição genes alvo, como as metaloproteinases. As abreviaturas utilizadas no esquema são as seguintes: UV, luz ultravioleta; EROs, espécies reativas de oxigênio; MMPs, metaloproteinases de matriz; MEC, matriz extracelular. Fonte: Adaptado de XU et al., 2005

As MMPs são endopeptidases zinco-dependentes e expressas em diversos diferentes tipos celulares (BRENNEISEN et al., 2002). Todas as metaloproteinases são sintetizadas como pré-pró-enzimas e secretadas como pró-MMPs latentes ou zimogênios, em sua maioria. Em condições fisiológicas normais, a expressão dessas enzimas é regulada por inibidores endógenos, como os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP). Quatro TIMPs (TIMP-1 a 4) já foram identificados em

vertebrados e sua expressão é regulada durante o desenvolvimento e remodelamento tecidual (BREW et al., 2000). Esses inibidores são produzidos pela maioria das células mesenquimais e se ligam não covalentemente às MMPs, inibindo-as e prevenindo sua ação descontrolada. Essa interação ocorre numa relação estequiométrica de 1:1 (UENO et al., 1997). A classe das gelatinases é composta pela MMP-2 (gelatinase-A ou colagenase tipo IV-A, 72 kDa) e MMP-9 (gelatinase-B ou colagenase tipo IV, 92 kDa) e se diferencia dos outros grupos por possuir um domínio adicional semelhante à fibronectina, que é responsável pela ligação dessas enzimas ao colágeno desnaturado ou gelatina. A ativação proteolítica da pró-enzima ocorre após remoção do pró-peptídeo NH₂- terminal através da quebra de ligação entre o grupo tiol do resíduo da cisteína no pró-peptídeo e o zinco no domínio catalítico. (SCHROEDER et al., 2008; QUANT et al., 2009; GEURTS et al., 2011; MANNELLO & MEDDA, 2012).

A produção de EROs, após a exposição da pele à radiação UV, promove destruição diretamente do colágeno intersticial, além de inativar os TIMPs e, conseqüentemente, induzir a síntese e a ativação de MMPs para a degradação de proteínas e da MEC (WENK et al., 2001). O acúmulo de elastina, degradação e desorganização do colágeno são características proeminentes na pele danificada pela radiação solar que resulta numa condição denominada de elastose solar (WANG & KOCHEVAR, 2005). Dentre as células que compõem o sistema tegumentar, os queratinócitos são considerados as principais fontes de produção de MMPs em resposta à radiação solar (QUANT et al., 2009). De acordo com RABE et al (2006), exposições repetidas à luz UV, equivalente entre 5 a 15 minutos de exposição ao sol, no horário de meio dia, é suficiente para manter os níveis elevados de MMPs. Estudos sugerem que a perda da integridade estrutural da MEC é a principal responsável pelo desenvolvimento de rugas devido ao fotodano da pele. Compostos antioxidantes e inibidores de colagenases (como MMP-2 e MMP-9) são apontados como agentes terapêuticos com grande potencial na proteção contra os danos promovidos pela radiação UV (WEN et al., 2012).

1.5 Prevenção e proteção dos danos promovidos por UVB

Desde as civilizações antigas já existia a preocupação em proteger contra os raios solares com o uso de roupas, acessórios, óleos e outros compostos naturais

(URBANICH, 2001). No entanto, somente no século XIX surgiram os primeiros relatórios científicos sobre o uso de agentes fotoprotetores, definidos como moléculas capazes de proteger a pele do eritema induzido por UV (SCHALKA & REIS, 2011). Os filtros solares orgânicos (ácido para-aminobenzóico, derivados de ácido salicílico e do ácido cinâmico, benzofenonas) e inorgânicos (dióxido de titânium e óxido de zinco) possuem a capacidade de interagir com a radiação incidente através de três mecanismos: reflexão, dispersão e absorção. De acordo com PINNELL (2003), o desenvolvimento de produtos químicos para absorção da luz UV não fornecem, totalmente, uma proteção contra os fotodanos. Além disso, a quantidade do produto aplicado não apresenta uma proporção linear à fotoproteção. Ademais, o estudo relata a possibilidade da instabilidade de certos filtros devido a sua incapacidade de dissipar a energia, absorvida pela UV, podendo resultar na formação de radicais livres, ou mesmo ser absorvidos pela pele e causar danos cutâneos.

VILELA et al (2013) mostraram, em pele de camundongos *Hairless*, que o uso da formulação contendo a combinação de filtros benzofenona 3, salicilato de octila e metoxicinamato de octila promoveram a inibição de 76% da depleção de GSH, porém, não reduziram as atividades de mieloperoxidase (MPO) e MMP9. Apesar da formulação inibir, parcialmente, a depleção de GSH, esses autores sugerem o desenvolvimento de novas formulações que previnem, completamente, a depleção de GSH cutâneo e, relatam, como estratégia, a incorporação de compostos antioxidantes em formulações fotoprotetoras.

Muitos compostos exógenos têm a capacidade de modular os mecanismos danosos promovidos por UVB (FILIP et al., 2013), e uma variedade de compostos naturais antioxidantes, de origem vegetal, têm demonstrado benefícios através da redução e/ou eliminação de radicais livres e prevenção do fotoenvelhecimento cutâneo (PILLAI et al., 2005). A aplicação tópica de antioxidantes possibilita que essas substâncias atuem, diretamente, na área da pele que necessita de proteção.

A aplicação tópica de epigallocatequina-3-galato (EGCG), maior polifenol constituinte do chá verde, protege contra muitos danos da radiação UV. Em animais, a aplicação de polifenóis do chá verde e EGCG é usada como prevenção de queimaduras induzidas por UV, fotoenvelhecimento, resposta inflamatória, além de

promover proteção contra a carcinogênese. Esses compostos inibem a infiltração de leucócitos, reduzem a atividade de MPO e oxidação de lipídios e inibem a atividade MMP-2 e MMP-9 induzidos por UVB. Resultados similares contra a queimadura solar, também, foram observados em pele humana quando pré-tratada com o extrato bruto de chá verde ou com EGCG (KATIYAR et al., 1999; KATIYAR & MUKHTAR, 2001; KATIYAR, 2003; YUSUF et al., 2007). KIM et al (2005) mostraram que o pré-tratamento tópico com 6- gingerol, um composto fenol de gengibre fresca, em pele de camundongos, reduziu os níveis de COX-2 demonstrada pela interação inibitória do ativo com a via p-38 MAP quinase e, conseqüentemente, a não ativação de NFκB.

As algas marinhas também são fontes de polifenóis. Estudos conduzidos por REGALADO et al (2011) avaliaram o efeito da aplicação tópica do extrato de folhas de *Thalassia testudinum*, em pele de camundongos Balb/C previamente depilados, por 7 dias após a última irradiação por UVB. Os resultados obtidos mostraram proteção cutânea do extrato frente às alterações macroscópicas (eritema, rugosidade e aspereza) e microscópicas (infiltrado inflamatório e degradação de colágeno) induzidos pela radiação, além disso, reduz a lipoperoxidação e protege o sistema de defesa antioxidante. Outros fenóis, como ácido gálico e elágico, também são descritos na literatura como substâncias fotoprotetores pela proteção do sistema antioxidante e danos ao DNA (HSEU et al., 2012; PANICH et al., 2012).

Os polifenóis são bastante explorados na pesquisa científica, especialmente o resveratrol e seus análogos (por exemplo, pterostilbeno) como agentes terapêuticos e quimiopreventivos (BISHAYEE, 2009; SIREROL et al., 2015). Apesar dos estudos incompletos do resveratrol, esta substância tem sido utilizada em hidratantes faciais, creme anti-envelhecimento, creme para área dos olhos e dentre outros (ALLEMANN & BAUMANN, 2009). Estudos conduzidos por AFAQ & MUKTHAR (2001) relataram que resveratrol, presentes nas cascas ou sementes de uva, é um potente antioxidante e anti-inflamatório. Estudos posteriores mostraram, em modelos *in vivo* e *in vitro*, que o resveratrol inibe a produção de H₂O₂ e do edema após a irradiação com UVB, invertendo a depleção de GSH e estresse oxidativo (AFAQ et al., 2003).

Apesar dos inúmeros estudos sobre bioativos fenólicos, a maioria desses compostos são instáveis e coloridos, o que dificulta formulações estáveis e

aceitáveis para o uso cosmético (PINNELL et al., 2003). Atualmente, diversos outros agentes com propriedades fotoprotetoras estão sob investigação. Estudos conduzidos por LEE et al (2009) mostraram que o uso de cordicepina, derivado nucleosídeo e isolado de *Cordyceps sinencis*, em fibroblastos dermais irradiados por UVB, inibem a expressão de MMPs e bloqueio a ativação de NFκB. Ainda sobre o estudo de diferentes, possíveis, ativos fotoprotetores, HAN et al (2011) avaliaram o efeito quimiopreventivo da cafeína em células de queratinócitos (linhagem *HaCat*) expostos à radiação UVB. Esses autores mostraram que esse ativo inibe a expressão de COX2 e a via de sinalização Akt, além disso, estimula a eliminação dos queratinócitos danificados e não reparados por mecanismo apoptótico.

Nesse contexto, o uso de compostos anti-inflamatórios como os inibidores da ciclooxigenase e inibidores da produção de citocinas, também é uma estratégia para prevenir os danos promovidos pela UV (PILLAI ET AL., 2005). Esses compostos devem possuir características fotoprotetoras semelhantes àquelas observadas em substâncias antioxidantes, como redução de eritema e da formação de células queimadas, proteção ao DNA e dentre outras ações protetoras contra os eventos da radiação UV (PINNELL et al., 2003).

2 JUSTIFICATIVA

A pele é o manto de revestimento do organismo, estando direta e frequentemente exposta a fatores externos pró-oxidantes, incluindo a luz solar (ISHIDA & SAKAGUCHI, 2007). A UVB induz efeito direto em biomoléculas da pele produzindo radicais livres (especialmente EROs), inflamação e danos ao DNA que resultam em uma variedade de distúrbios cutâneos agudos, como também efeitos em longo prazo, como fotoenvelhecimento e câncer (GARCÍA et al., 2010). Desse modo, diversos autores relatam a necessidade do uso de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias tópicas como uma estratégia eficaz contra os efeitos adversos promovidos pela radiação UVB (AFAQ & MUKHTAR, 2006; PRATHEESHKUMAR et al., 2014).

Nos últimos anos, os produtos naturais têm recebido considerável interesse, principalmente, aqueles que possuem propriedades antioxidantes e de reparo tecidual e que promovam benefícios potenciais na prevenção e tratamento de doenças degenerativas e diferentes tipos de lesões. O uso de antioxidantes exógenos derivados de plantas tem sido associado com a redução de incidência do fotoenvelhecimento cutâneo ou fotocarcinogênese (AFAQ&MUKHTAR, 2006). Além de sua utilização pelas ações colagenolíticas, a aplicação de proteases por sua ação antioxidante também tem sido descrita, sendo atribuída aos aminoácidos presentes em sua estrutura, por exemplo: triptofano, tirosina e cisteína (ELIAS et al., 2008; CHIANG et al. 2014).

A fração P1G10 derivada do látex de *V. cundinamarcesis* é rica em cisteíno proteases e tem se mostrado um promissor agente de reparo tecidual em lesões cutâneas. Em estudos prévios, a fração demonstrou atividade cicatrizante cutânea de feridas de várias etiologias, sendo essa ação associada a um efeito anti-inflamatório, imunomodulador e anti-apoptótico (MELLO et al., 2006; CRISTIANO, 2008; LEMOS et al., 2011; FREITAS, 2011). Além disso, em modelos de ulcerogênese gástrica, a proteção contra lesões induzida por indometacina, um anti-inflamatório não esteroideal, foi associada ao aumento de compostos sulfidrílicos não proteicos, que são antioxidantes (ARAÚJO-SILVA et al. 2015). Diante do exposto, nesse trabalho, propomos investigar o efeito de P1G10 em injúrias cutâneas promovidas pela radiação UVB, avaliando suas ações sobre o processo inflamatório e oxidativo induzidas por esse agente

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudo dos efeitos da fração proteolítica P1G10 do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, sobre as alterações cutâneas (celulares e moleculares) promovidas por exposição aguda única e repetida à radiação UVB.

3.2 Específicos

Em modelo animal utilizando camundongos *Hairless*:

- 1) Caracterizar e padronizar o modelo de exposição dose única à radiação UVB;
- 2) Avaliar o efeito do tratamento tópico com P1G10 sobre lesões promovidas por exposição única e múltipla à radiação UVB, verificando na pele:
 - i) Aspectos macroscópicos das lesões;
 - ii) O balanço de oxidantes (EROs), produtos de lipoperoxidação (MDA) e biomoléculas do sistema antioxidante enzimático e não enzimático (SOD, CAT, GSH, GPx);
 - iii) A resposta tecidual, quanto à espessura das camadas da pele, presença de infiltrado inflamatório, proliferação de queratinócitos, por análises histológicas e imunohistoquímicas.
 - iv) Aspectos referentes ao processo inflamatório tecidual, pela avaliação da presença de neutrófilos (dosagem de MPO), destruição da matriz extracelular (atividade de MMP-9) e níveis de mediadores pró-inflamatórios (IL8, TNF- α , IL-1 β e COX2);
 - v) Sua atuação sobre vias de sinalização celular, envolvidas no processo lesivo da radiação UVB (PI3/Akt e MAP quinases: p-38 e JNK).
 - vi) A expressão das proteínas p53 e caspase 3, envolvidas em mecanismos de reparo a danos ao DNA e da apoptose;

Em sistemas *in vitro*, avaliar:

- 1) A atividade antioxidante de P1G10 pelo sequestro de DPPH \cdot ;
- 2) A citotoxicidade de P1G10 e UVB sobre linhagem de queratinócitos humanos (*HaCat*);
- 3) O efeito de P1G10 sobre a produção de EROs em células irradiadas por UVB;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Biológicos

- Amostra liofilizada da fração do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, P1G10, obtida pela separação cromatográfica em coluna de gel de filtração Sephadex G10 (Anexo B).
- Camundongos *Hairless* (linhagem HRS/J) - as matrizes foram doadas pela professora Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, e mantidos em cruzamento no Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (Cebio-ICB/UFMG).
- Linhagem de células queratinócitos humano (*HaCat*) gentilmente doadas pelo Professor Dr. André Luis Vettore de Oliveira do Laboratório De Biologia Molecular do Câncer da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

4.1.2 Reagentes e solventes

- Acetato de sódio P.A., etanol 96%, etileno-diamino-tetracetato dissódico (EDTA) P.A., fosfato monobásico de potássio P.A., fosfato dibásico de sódio P.A. -**Merck, Darmstadt, Alemanha.**
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólico ou sal de tetrazólico (MTT), 1,4-Bis(5-fenil-2-oxazolil) benzeno (POPOP), 2,5-difeniloxazol (PPO), albumina bovina fração V (BSA), ampicilina sódica, benzoil-arginil-*p*-nitro-anilida (BAPNA), chaps, coquetel de inibidores (P-8340) dimetilsulfóxido (DMSO), ditioneitol (DTT), fluoreto de sódio, gelatina, meio de cultura DMEM, ortovanadato de sódio, persulfato de amônio (APS), sulfato de estreptomicina, tris base, triton X-100, tween 85 e 20, Peróxido de hidrogênio 30%, *o*-ftalaldeído (OPT), *o*-fenilenodiamina (OPD) - **Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA.**
- Ácido acético glacial P.A., ácido fosfórico 85%, ácido tricloroacético (TCA), bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio,

clorofórmio, formaldeído 37%, hidróxido de sódio, glicerol, glicina, isopropanol, metanol absoluto - **Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil.**

- Ácido hidrocloreídrico P.A. - **Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.**
- Solução Acrilamida/bis 30%, Corante azul-brilhante de coomassie G-250, dodecil sulfato de sódio (SDS) e N',N',N',N'-tetrametil-etileno-diamina (TEMED) - **Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA.**
- Kit para imunohistoquímica - Estreptavidina-biotina-peroxidase (Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP – pronto para uso – Lab Vision) -**DAKO K0690).**
- Luminata Forte Western HRP substrate, ReBlot plus strong antibody stripping solution, 10x - **EMD Millipore Corporation, USA.**
- Nitrogênio líquido - **White Martins do Brasil S/A, Brasil.**
- Soro fetal bovino (FBS) e tripsina 0,25% - **Cultilab, Campinas, SP, Brasil.**
- Solução de cetamina a 10% (Cetamin®) e solução de xilazina a 2% (Xilazin®) - **Syntec do Brasil, Cotia, São Paulo, Brasil.**
- Meio de cultura RPMI 1640 - **Gibco-BRL Corporate Headquarters, Gaithersburg, EUA.**
- ATV (solução aquosa de tripsina) contendo: tripsina (0,20 g), versene (0,02 g) e água deionizada q.s.p. (100,00 mL) - **Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, SP, Brasil.**
- Kits de imunoensaio DuoSet® TNF- α , IL1 β , IL8 anti-mouse - R & D Systems, **Mineapolis, EUA.**
- Azul de metileno, Giemsa, eosina azul de metileno (May Grunwald) – **Sciavicco Comércio e Indústria Ltda, Belo Horizonte – MG, Brasil.**

4.1.3 Equipamentos

- Refrigerador ajustado à temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$; freezer à temperatura de -20°C - Consul - **Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, SP, Brasil.**
- Lâmpada modelo 9815 – Serves Lamps 15W - **Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, EUA.**

- Ultra-sonicador modelo FS-28H - **Fisher Scientific, California, EUA.**
- Agitador magnético modelo 252 - **Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil.**
- Centrífuga refrigerada de média rotação, modelo Z252MK, equipada com rotor modelo 220.87.V01 - **Hemle Labortechnik, Gosheim, Alemanha.**
- Balança eletrônica analítica modelo MT-200 - **Mettler Micronal Instrumentos.**
- Deionizador de água por meio de osmose reversa - S/A, São Paulo, SP, Brasil - **Milipore Corporation, Bedford, EUA.**
- Medidor de pH modelo NT-PH2 - equipado com eletrodo modelo V-620 C - **Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, SP, Brasil**
Novatécnica Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil.
- Estufa incubadora 36,5 °C - **Nuaire Equipaments, Plymouth, Minneapolis, EUA.**
- Microscópio ótico linha CB, microscópio ótico invertido modelo CK2 - **Olympus Corporation, New York, EUA.**
- Câmera digital, 7,2 Mega Pixels/ DSC W120 - **SONY DSC-W120, Cyber-Shot.**
- Shaker Roto Mix modelo 48200 - **Thermolyne, Dubuque, Iowa, EUA.**
- Capela com fluxo laminar de ar ultrafiltrado - **Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, Campinas, SP, Brasil.**
- Célula de transferência semi-seca Trans-Blot® SD, cuba de Eletroforese Mini-Protean® Tetra Cell, e fonte de energia para eletroforese e transferência em “Western Blot” modelo 3000 xi - **Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA.**
- Espectrofotômetro de duplo feixe para faixas UV (ultra-violeta) e visível, modelo UV-150-02 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e do tipo leitor de placas Multiskan GO - **Thermo Fisher Scientific, EUA.**
-

4.1.4 Diversos

- Botijão de nitrogênio 10 m³ de gás acoplado ao sistema de ultrafiltração - **Air Liquid Ltda, Ipiranga, SP, Brasil.**
- Tubos de microcentrifuga tipo “Eppendorf” com capacidade para 0,5 e 1,5 mL- **Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA**

- Barras magnéticas - **Fizatron, Equipamentos Eletrônicos para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil.**
- Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000 μL , acompanhados de ponteiros de polipropileno - **Gilson Sas, França.**
- GraphPad Prism 5-GraphPad Software, Inc., **San Diego, CA, EUA.**
- Lâmina de bisturi 11-BD- **Hualyin Medical Instruments Factory, Hualan-Jiangsu, China.**
- Agulhas e seringas descartáveis - Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda, Ourinhos, Brasil. Gaze StericleanR - **MedGauze Ind. e Com. Ltda, São Paulo, Brasil.**
- Membranas filtrantes de nitrato de celulose, com 0,45 μm e 0,22 μm de diâmetro de poro - **Millipore Corporation, Bedford, EUA.**
- Béqueres, Ehrlenmeyers, Funis, Pipetas graduadas, Provetas, Quitassatos, Balões volumétricos - **PyrexR , Cidade do México, México.**
- Lâminas 25,4 x 76,2 mm e lamínulas para microscopia. **SolidorR , Médico Industries & Trade Co. Ltd., Shijiazhuang, China.**
- Material cirúrgico - **S.S White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.**
- Vidraria (Quitassato de 1000 ml, béquer 1000 ml e tubos de ensaio com 14 X 1 cm de dimensões) - **Vidrolabor-Thermex Astra Brasil Ind. Vidros, F. Vasconcelos, SP, Brasil.**

4.1.5 Soluções principais

Solução anestésica

Quetamina	3,00 mL
Xilasina	1,00 mL
PBS	4,00 mL

4.1.5.1 Soluções utilizadas na determinação da atividade de Mieloperoxidase e Citocinas

Tampão de extração de Citocinas

NaCl	0,40 M
Tween 20	500,00 µL
BSA	5,00 g
Phenil Metil Sufonil Fluoride (PMSF)	17,00 g
DMSO	100,00 µL
Cloreto de Benzetônio 0,1 mM	44,80 mg
EDTA 10mM	372,00 mg
Aprotinina 20Kj	20,00 µL
Água ultrapura q.s.p	1,00 L

Tampão 1 (pH= 4,7)

NaCl	0,10 M
Na ₃ PO ₄	0,02 M
Na ₂ EDTA	0,015 M
Água ultrapura q.sp	1,00 L

Tampão 2 (pH=5,4)

Na ₃ PO ₄	0,05 M
Água ultrapura q.s.p	1,00 L

Solução de paralisação do ensaio Elisa

H ₂ SO ₄ 4M	3,00 mL
Água destilada q.s.p	10,00 mL

Tampão de bloqueio

PBS estéril	4,00 mL
BSA 1,0%	400 mg

Solução A - para tampão citrato/fosfato (pH=5,0)

Ácido cítrico monohidratado	10,51 g
Água ultrapura q.s.p	500,00 mL

Solução B - para tampão citrato/fosfato (pH=5,0)

Fosfato de sódio dibásico	35,82g
Água ultrapura q.s.p	500,00 mL

Tampão citrato/fosfato (pH=5,0)

Solução A	20,00 mL
Solução B	30,00 mL
Água ultrapura q.s.p	100,00 mL

Tampão de lavagem (ensaios imunoenzimáticos)

PolioxietinIsorbitano mololaurato 20 (Tween 20)	650,00 µL
PBS	1,30 L

4.1.5.2 Soluções utilizadas na determinação da atividade da metaloproteinase-9 (MMP-9) – Zimografia**Solução aquosa de gelatina 1% (p/v)**

Gelatina	20,00 mg
Água deionizada	2,00 mL

A gelatina foi dissolvida em água e aquecida por 20 segundos em microondas na potência máxima

Tampão Tris-HCl 1M pH 7,4

Tris base	121,14 g
Água ultrapura q.s.p	1000,00 mL

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

Tampão de lavagem

Tris-HCl 1M pH 7,4	25,00 mL
Triton X-100	12,50 mL
Água ultrapura q.s.p	500,00 mL

Tampão de incubação

Tris-HCl 1M pH 7,4	25,00 mL
Cloreto de cálcio	555,00 mg
Cloreto de sódio	5,85 g
Chaps	100,00 mg
Água ultrapura q.s.p	500,00 mL

Solução para gel separador acrilamida 7,5% e gelatina 0,1 %

Solução aquosa de Acrilamida 30%	1,25 mL
Tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8	1,25 mL
SDS 10% (p/v)	50,00 µL
Gelatina 1% (p/v)	500,00 µL
Água deionizada	3,65 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	50,00 µL
TEMED	20,00 µL

Solução corante de géis

Corante azul-brilhante de Coomassie G-250	125,00 mg
Ácido acético glacial P.A	10,00 mL
Água destilada q.s.p	100,00 mL

Solução descorante de géis

Metanol P.A.	4,00 mL
Ácido acético glacial P.A	8,00 mL
Água destilada q.s.p	100,00 mL

Tampão de corrida eletroforese desnaturante 5X (solução estoque)

Tris base	15,10 g
Glicina	4,00 g
SDS	5,00 g
Água destilada q.s.p	1000,00 mL

A solução de uso (1X) foi preparada no momento do uso por diluição 1:5 em água milli Q.

4.1.5.3 Soluções utilizadas no ensaio Western Blotting e Cultura Celular

Solução aquosa de SDS 10% (p/v)

SDS	1,00 g
Água ultrapura q.s.p	10,00 mL

Solução aquosa de APS 10% (p/v)

APS	1,00 g
Água ultrapura q.s.p	10,00 mL

Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tris Base	18,21 g
Água ultrapura q.s.p	100,00 mL

O pH foi ajustado para 8,8 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

Tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8

Tris Base	13,14 g
Água ultrapura q.s.p	100,00 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

Solução para o gel separador desnaturante 10% acrilamida

Solução aquosa de Acrilamida 30%	1,67 g
Tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8	1,25 mL
SDS 10% (p/v)	50,00 µL
Água ultrapura	1,98 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	50,00 µL
TEMED	10,00 µL

Solução para o gel concentrador desnaturante 4% acrilamida

Solução aquosa de Acrilamida 30%	267,00 µL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8	250,00 µL
SDS 10% (p/v)	20,00 µL
Água ultrapura	1,44 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	20,00 µL
TEMED	5,00 µL

Solução fixadora para géis

Metanol P.A.	50,00 mL
Ácido acético glacial P.A	10,00 mL
Água ultrapura q.s.p	100,00 mL

Tampão de lise**Solução A (pH=7,9)**

Fluoreto de Sódio	107,3 mg
Ortovanadato de sódio 40 mM	15,4 mg
Coquetel de inibidor (P8340 – Sigma®)	3,20 mg
HEPES	0,24 g
Cloreto de Magnésio	0,03 g
PMSF	4,35 mg
DTT	200 µL
Triton X 0,1%	100,00 µL
Cloreto de potássio	0,075 g
Água ultrapura q.s.p	50,00 mL

Solução B (pH=7,9)

EDTA	0,0074 g
Glicerol	25 mL
Coquetel de inibidor (P8340 – Sigma®)	3,20 mg
HEPES	0,48 g
Cloreto de Magnésio	0,03 g
PMSF	4,35 mg
DTT	200 µL
Cloreto de sódio	2,45 g
Água ultrapura q.s.p	100,00 mL

Tampão de amostra eletroforese desnaturante 6X

Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v)	700,00 µL
Glicerol	300,00 µL
SDS	100,00 µL
Azul de bromofenol	120,00 mg

Tris-Buffered Saline plus Tween 20 (TTBS)

Cloreto de sódio	8,70 g
Tris base	24,20 g
Tween 20	500,00 µL
Água utrapura q.s.p.	1000,00 mL

Solução de bloqueio

BSA	2,50 g
TTBS q.s.p	50,00 mL

Tampão de transferência

Metanol absoluto	200,00 mL
Glicina	3,00 g
Tris base	1,49 g
Água ultrapura q.s.p.	1000,00 mL

Tampão PBS pH 7,4

Fosfato dibásico de sódio	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio	250,00 mg
Cloreto de sódio	8,20 g
Cloreto de potássio	200,00 mg
Água destilada q.s.p	1000,00 mL

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C , 2 ATMs durante 20 min.

Tampão PBS/EDTA pH 7,4

Fosfato dibásico de sódio	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio	250,00 mg
Cloreto de sódio	8,20 g
Cloreto de potássio	250,00 mg
EDTA	1,37 g
Água destilada q.s.p	1000,00 mL

Meio F12- Ham pH 7,4

Meio F12Ham desidratado	11,10 g
Bicarbonato de sódio	1,50 g
Ampicilina sódica	100,00 mg
Estreptomicina	100,00 mg
Água ultrapura q.s.p	1000,00 mL

Após a completa dissolução dos componentes, o pH foi ajustado com hidróxido de sódio 1 M ou ácido clorídrico 1 M para 7,4 e o meio foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade absoluta de 0,22 µm.

Meio DMEM pH 7,4

Meio DMEM desidratado	11,10 g
Bicarbonato de sódio	3,70 g
Ampicilina sódica	100,00 mg
Estreptomicina	100,00 mg
Água ultrapura q.s.p	1000,00 mL

Após a completa dissolução dos componentes, o pH foi ajustado com hidróxido de sódio 1 M ou ácido clorídrico 1 M para 7,4 e o meio foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade absoluta de 0,22 µm.

4.1.6 Veículo para incorporação da fração P1G10

Gel de Natrosol®

Propilenoglicol	1,5mL
Natrosol	0,6g
Sol. conservante (nipagim e nipazol)	0,3mL
Água Deionizada	27,6 mL

4.2 Métodos

4.2.1 Avaliação in vivo

Animais

A linhagem HRS/J, conhecidos como *Hairless*, foram provenientes da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, e mantidos em cruzamento no Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (Cebio-ICB/UFMG). Os camundongos *Hairless* foram utilizados com 8 semanas de idade e mantidos em gaiolas individuais no período de 5 dias anteriores ao procedimento e até ao final do experimento, submetidos a um ciclo de claro/escuro de 12/12 h, recebendo água e alimentação *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, Protocolo nº 174/10 (ANEXO A).

4.2.1.1 Caracterização e padronização de modelo de lesão de pele por irradiação com UVB

As lesões foram promovidas por irradiação com lâmpada UVB (Coler-Parmer®, 15W), comprimento máximo de UV a 312 nm. Inicialmente, para a montagem do sistema de irradiação foi necessário fazer a aferição da lâmpada (Coler-Parmer®, 15W). A intensidade emitida pela lâmpada foi determinada por radiômetro CMP22® (Kipp e Zonen, Netherlands), realizado no departamento de

Engenharia de Energia CEFET-MG, sendo a potência aferida no aparelho a 13 cm (LAAT et al., 1997) foi de 8W/m^2 (ANEXO C). E o espectro de emissão da lâmpada foi medido em espectrômetro Ocean Optics com auxílio do software OOIBase32, no departamento de Física/UFMG. Assim verificou-se que o espectro emitido pela lâmpada é de 312 nm, cujo o espectro corresponde à radiação Ultravioleta B (Figura 9).

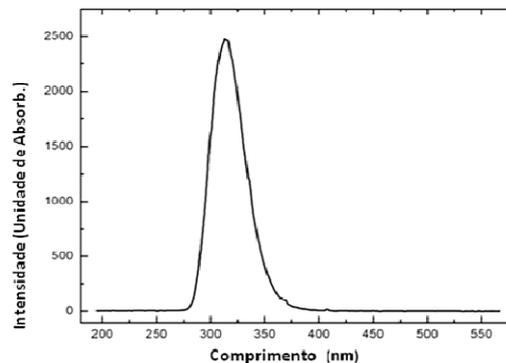


Figura 9 - Medida do comprimento de onda da lâmpada Cole-Parmer, modelo 9815 OOIBase32 (desenvolvido pela Ocean Optics e fornecido junto com o equipamento).

As doses de irradiação foram estabelecidas utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Dose (J/cm}^2\text{)} = \text{tempo de exposição (s)} \times \text{intensidade (W/cm}^2\text{)}.$$

A) Exposição dose única à radiação UVB

Na padronização do protocolo de exposição única, os animais foram anestesiados com solução anestésica xilazina/ketamina (1:0,75, 0,1mL/100g de peso do animal), por via intramuscular (*i.m*). Cada animal foi colocado em câmara de PVC (policloreto de vinila), com abertura de, aproximadamente, 25 por 15 mm, de modo que apenas uma pequena área da região mediana dorsal do animal se apresentava descoberta para a exposição à radiação UVB. Para isso, os animais foram posicionados na posição ventral, sendo que a lâmpada foi colocada à uma altura fixa de 13 cm da porção dorsal exposta. Em seguida, os animais receberam, topicamente, uma dose única de UVB de $2,4\text{ J/cm}^2$ (CASAGRANDE et al., 2006) (Figura 10). Para caracterização das lesões promovidas pela radiação, foi realizada

uma análise macroscópica (eritema e edema) e feitas imagens do dorso dos animais lesionados ou não pela radiação nos tempos de 6, 12, 24 e 48 h após as lesões (Figura 11). Em cada tempo, animais foram eutanasiados para coleta de fragmentos da pele para análises histológicas, de citocinas (TNF- α , IL1 β e outras), MPO, perfil oxidante/antioxidante e dentre outras (*item 4.1.2.3*) (Figura 15).

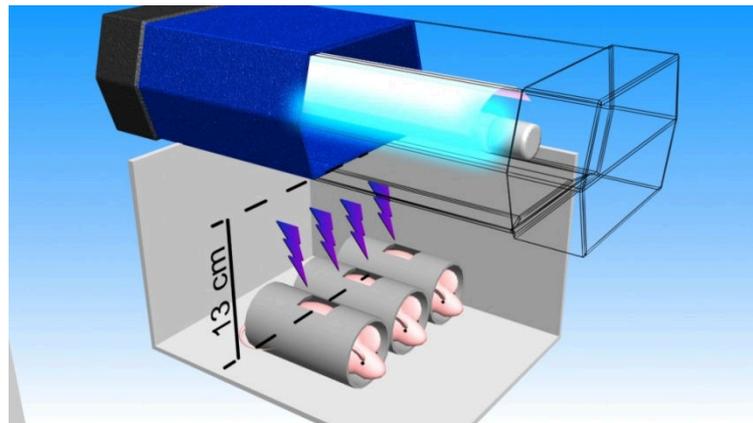


Figura 10 - Representação esquemática da montagem do experimento de Exposição única à UVB. Fonte: Elaborada pela autora

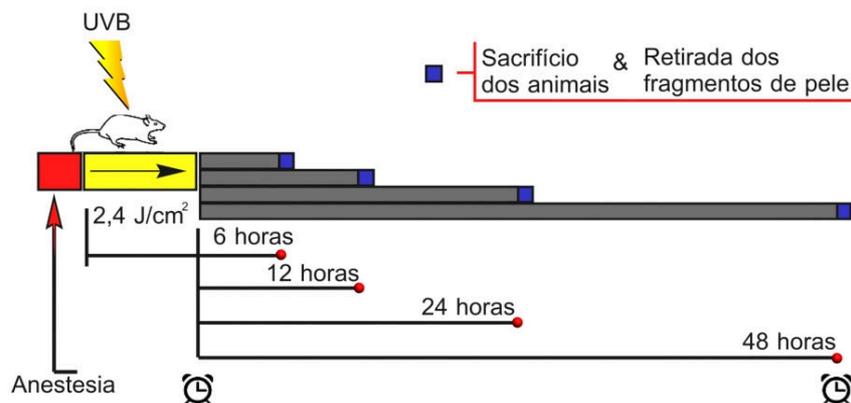


Figura 11 - Padronização do modelo de exposição única à UVB. Fonte: Elaborada pela autora

4.2.1.2 Avaliação do efeito de P1G10 sobre lesões induzidas pela radiação UVB

Nessa etapa, foram utilizados dois protocolos: i) modelo de indução de lesões por única exposição (dose única) à radiação UVB; ii) modelo de indução por exposições repetidas (doses múltiplas). Nos dois casos, foram estabelecidos 6 grupos, de forma aleatória, com 10 animais cada: um não irradiado (*Sham*), 5 irradiados sendo: Irradiado (UVB), Irradiado que recebeu o veículo gel de Natrosol® (*Item 4.1.6*) (Controle Veículo – ou grupo CV), e irradiados tratados com 0,1% P1G10 ou 1,0% de P1G10, ambos em gel de Natrosol®. Os tratamentos foram aplicados em 50 mg do gel contendo salina (CV) ou nos demais grupos contendo a mesma quantidade do gel com P1G10 (0,1;1,0%), conforme esquemas abaixo.

A) Esquema de exposição única à UVB

Os animais submetidos a esse esquema, foram irradiados com 2,4 J/cm² e imediatamente após, foram tratados com uma única aplicação (50mg) de gel de Natrosol® (grupo CV) ou com os tratamentos com P1G10 0,1 ou 1,0%. Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos da pele do dorso foram coletados para análises como descrito adiante (Figura 12).

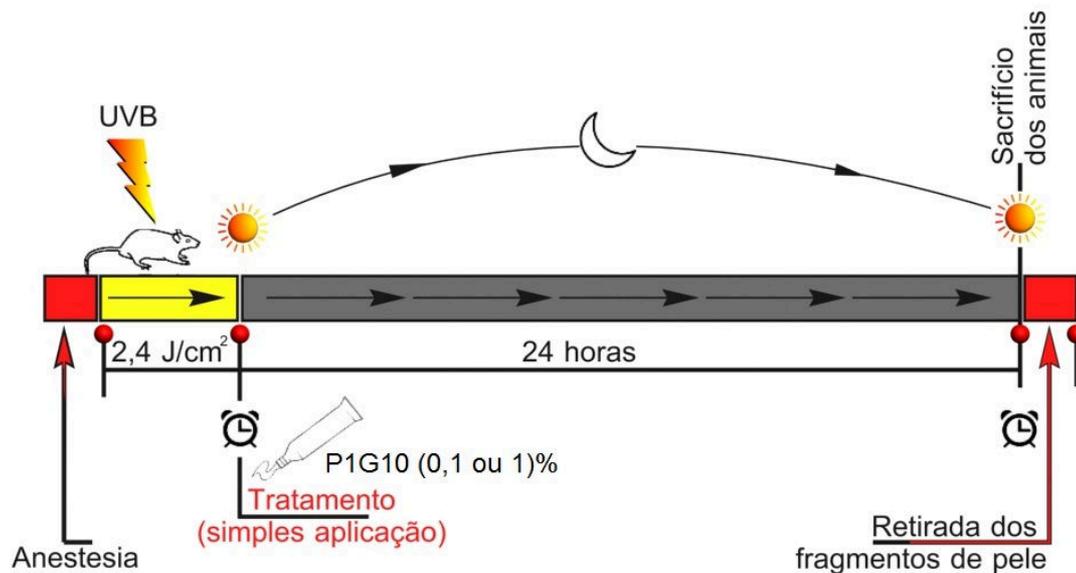


Figura 12 - Esquema de indução e tratamento de lesões por exposição única à radiação UVB. Fonte: Elaborada pela autora

B) Esquema de exposições repetidas à UVB

A exposição à doses múltiplas UVB seguiu o protocolo preconizado por FILIP et al. (2011). Para esse procedimento, foi confeccionada uma caixa com separadores com capacidade para 6 animais (Figura 13), a lâmpada ficou situada a 13 cm de distância do dorso dos animais, sendo os animais distribuídos, como citado anteriormente. Os animais receberam doses de UVB (240 mJ/cm^2) por 10 dias consecutivos, e, logo após cada exposição, esses receberam tratamento tópico 50 mg do gel contendo salina (CV) e nos demais grupos contendo a mesma quantidade do gel com P1G10 0,1 e 1,0%. (Figura 14). Após 24 h da última exposição, os animais foram eutanasiados, sendo coletados fragmentos de pele, lavados em solução PBS, como descrito adiante.

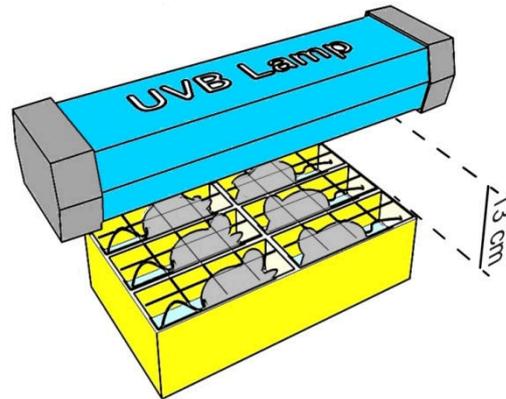


Figura 13 - Esquema da indução e tratamento de lesões por exposições repetidas à UVB. Representação esquemática da montagem do aparato experimental. Fonte: Elaborado pela autora

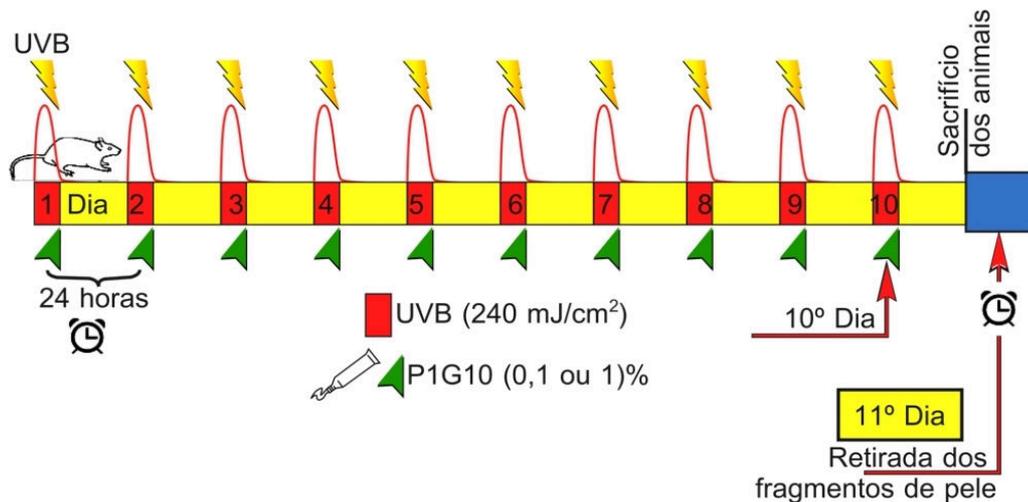


Figura 14 - Linha cronológica do experimento de Exposição de múltiplas doses de UVB. Fonte: Elaborado pela autora

4.2.1.3 Obtenção das amostras de pele

Após 24 h da última exposição à irradiação, os animais foram anestesiados com solução anestésica xilazina/ketamina (1:0,75, 0,1mL/100g de peso do animal) por via intraperitoneal (*i.p.*) e os fragmentos do dorso da pele (aproximadamente 3 x 2 cm) foram retirados com auxílio de bisturi e tesoura e lavados em tampão PBS. O tecido retirado foi dividido em 6 fragmentos, sendo que um desses fragmentos (padronizado) foi inserido em recipientes separados e devidamente identificados, contendo formol 10% tamponado para as análises histológicas. Os demais

fragmentos foram congelados em freezer -80°C para as demais análises, como descrito a seguir (Figura 15).

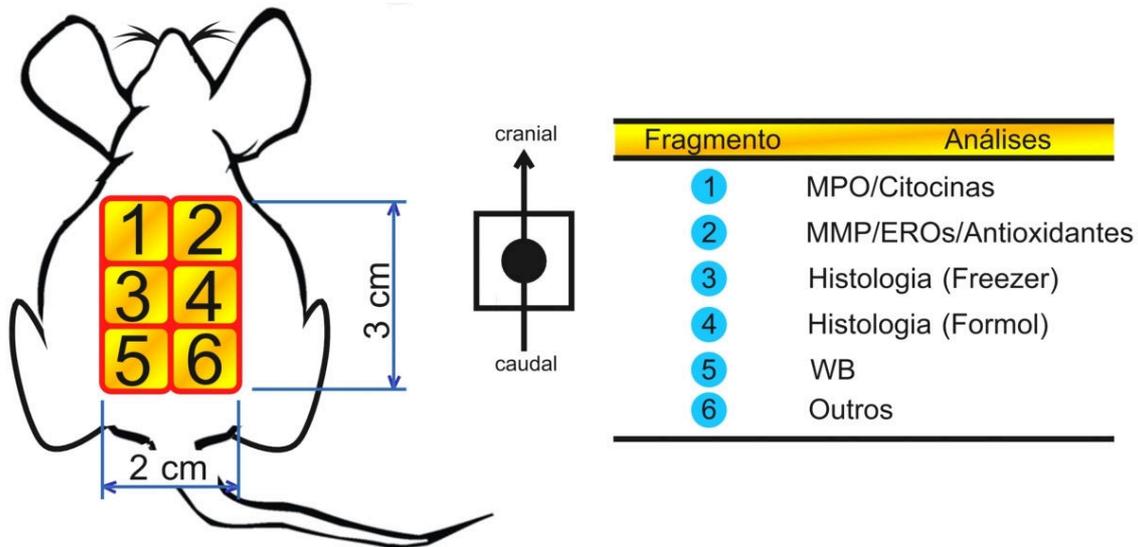


Figura 15 - Ilustração esquemática da padronização da coleta de amostras das lesões induzidas por UVB. A figura mostra a secção dos fragmentos e a orientação crânio-caudal, assim como a relação numérica dos fragmentos e suas respectivas análises. Sendo MPO (mieloperoxidase), MMP (metaloproteinase), EROs (espécies reativas de oxigênio), WB (Técnica *Western Blot*). Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1.4 Dosagem de fatores antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em pele de camundongos *Hairless*

Os fragmentos de pele coletados foram homogeneizados em tampão. O homogenato 1:10 (p/v) em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,5 foi obtido em trituração com nitrogênio líquido centrifugado a 13000 g durante 10 min a 4°C . O sobrenadante foi coletado para mensuração de fatores antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, zimografia e MDA, como medida da peroxidação lipídica. Cada sobrenadante foi dividido em três alíquotas e analisadas em duplicata.

Quantificação de Glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH no homogenato de pele foi determinado por fluorescência utilizando o o-ftalaldeído (OPT) (HISSIN & HILF, 1976). As amostras foram tratadas com solução de ácido tricloroacético (10%) e centrifugadas a 10000 rpm a 4°C. A solução de OPT (1mg/mL em metanol) foi adicionada ao sobrenadante coletado, previamente diluído ao tampão fosfato (0,1M, 0,1M EDTA e pH 8,0). Após 15 min de incubação a temperatura ambiente com a sonda, a fluorescência foi medida em Fluorímetro (Synergy 2, Biotek®) 350 nm de excitação e 420 nm de emissão. A concentração de GSH foi estimada a partir da curva de calibração utilizando GSH como padrão, e expressa como $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido.

Medida da catalase

A atividade de catalase (CAT) foi realizada com base na decomposição de H_2O_2 como descrito por SHANGARI & O'BRIEN (2006). A reação foi iniciada pela adição de 10 μL de sobrenadante, obtido, como descrito no *item 4.2.1.4*, adicionado 990 μL em tampão de fosfato de potássio 50mM (pH 7,0) contendo 7,5 mM de H_2O_2 . A taxa de decomposição de H_2O_2 foi monitorada por espectrofotometria em intervalos de 15 s durante 1 min, no comprimento de onda de 240 nm (25°C). A atividade da catalase foi calculada no *software* Microsoft Excel utilizando a fórmula $\Delta E/\text{min}$. Onde, ΔE é o valor da variação da absorbância entre a primeira e a quarta leitura. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína ($\Delta E/\text{min}/\mu\text{g}$), determinada pelo método de Bradford (1976) e expressa como percentagem do controle.

Medida da Superóxido Dismutase (SOD)

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade em catalisar a dismutação de radicais superóxidos ($\text{O}_2^{\cdot-}$), à H_2O_2 e O_2 , diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogallol (MADESH & BALASUBRAMANIAN, 1998). Trinta microlitros de homogenato (*item 4.2.1.4*) foi plaqueado em placa de 96 poços e acrescido de 99 μL de tampão fosfato, 6 μL de MTT (brometo de dimetiliazol-difeniltetrazolium) e 15 μL de pirogallol. Para o branco, o pirogallol foi substituído por tampão fosfato e para o amostra-padrão, a amostra foi substituída por tampão fosfato. Após cinco min de incubação a 37°C, a reação foi parada com 150 μL de DMSO (dimetilsulfóxido) e a absorbância foi lida a

570nm. Para o cálculo do resultado foi considerado que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a autooxidação de 50% de pirogallol do padrão. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína (U/ μ g proteína) e expressa como percentagem do controle.

Quantificação da Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da glutathione peroxidase (GPX) foi determinada de acordo com PAGLIA & VALENTINE (1967). Resumidamente, a solução da reação foi preparada em 580 μ L de tampão de fosfato (100 mM, pH 7,0) contendo EDTA 5 mM, 100 μ L de NADPH 8,4 mM, 10 μ L de glutathione redutase (100 UI/mg de proteína/mL), 10 μ L de NaN_3 1,125 M, 100 μ L de glutathione reduzida 0,15 M e 100 μ L da amostra. A reação enzimática foi iniciada por adição de 250 μ L de H_2O_2 (2,2 mM). A conversão de NADPH para NADP foi monitorada durante 4 min, em intervalos de 30 s no espectrofotômetro (Shimadzu®, Japão). Unidade de enzima foi determinada pela oxidação de 1,0 mol de NADPH por minuto e foi calculada com base na absorbância de NADPH em 340 nm. Os resultados foram normalizados pelo peso (mg) dos fragmentos de pele correspondente ao homogenato e, expressos como μ M/mg tecido.

4.2.1.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio – EROs nos fragmentos de pele dos camundongos *Hairless*

O protocolo foi realizado de acordo com SIQUEIRA et al (2004). Resumidamente, as dosagens foram realizadas utilizando a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich®+32, Wien, Austria). Nessa dosagem usou 20 μ L do homogenato de pele com 80 μ L de DCF-DA (125 μ M) a 37 °C durante 30 min e protegida da luz. A formação do derivado oxidado fluorescente (DCF) foi monitorada nos comprimentos de onda de 488 nm (excitação) e 525 nm (emissão), respectivamente, em um leitor de placas fluorescente (Synergy 2,

Biotek®). Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como porcentagem do controle não irradiado (*Sham*).

4.2.1.6 Medida da peroxidação lipídica (Tbars) nos fragmentos de pele dos camundongos *Hairless*

Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esse método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malonaldeídos - MDA e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de *Schiff*. A reação consistiu com a adição de 100 µl do homogenato transferidos para ependoffs identificados juntamente com 100 µl da solução (TBA + Hidroxitolueno Butilado - BHT) e 50 µl de ácido fosfórico (7%). Esta mistura foi aquecida em banho seco por 15' a 100°C. Imediatamente após aquecer no banho seco, a amostra foi colocada em gelo durante 10 min. Para interromper a reação foi adicionado 750 µl de butanol em cada amostra e homogeneizado no VORTEX. Após a centrifugação (2000 rpm a 4°C por 5 min), 250 µl do sobrenadante foi coletado e transferido para a placa de ELISA onde foi realizada a leitura nos comprimentos de onda de 532 nm e a 600 nm em espectrofotômetro (Shimadzu®, Japão). Os resultados foram expressos como concentração de MDA (µM/mg tecido) de cada amostra foi estimada a partir da curva de calibração utilizando a solução tetrametoxipropano (TMP), como padrão (OHKAWA et al., 1979).

4.2.1.7 Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) nos fragmentos de pele os camundongos

A dosagem de MPO se iniciou com adição da solução Tampão 1 a 4°C (ver *item 4.1.5.1*) (1,0mL/100mg de tecido de pele) aos fragmentos de pele, seguido de homogeneização (Homogeneizador de tecidos Politron®) por 30" (s) e centrifugação por 10 min a 10.000 rpm a 4°C. Osobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado solução de NaCl 0,2% p/v em água destilada (1,5mL/100mg de tecido), agitado em vortexpor 30 s e foi adicionado volume igual de solução contendo NaCl

1,6% e glicose 5% (1,5mL/100mg de tecido de pele). A solução foi homogeneizada e centrifugada a 4°C por 10 min a 10.000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se, ao sedimento, o Tampão 2 (*item 4.1.5.1*). Após nova homogeneização (homogeneizador de tecidos) seguida de centrifugação a 4°C por 10 min a 10.000 rpm, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de congelamento/descongelamento, em nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. Esse sobrenadante foi diluído em PBS previamente à análise, na razão 1:10 e a atividade de MPO foi mensurada pela adição de 25µL de tetrametilbenzidina 1,6 mM (TMB, Sigma), dissolvido em dimetilsulfoxido (DMSO, Merck) e 100 µL do substrato H₂O₂ na concentração de 0,002%, dissolvida em tampão fosfato (pH 5,4) (BARCELOS et al., 2009). A reação foi interrompida com adição de 100 µL de H₂SO₄ e quantificada colorimetricamente à 450 nm em leitor de microplaca (Shimadzu®, Japão). Os resultados obtidos (D.O/mg tecido) foram expressos por porcentagem .

4.2.1.8 Quantificação de nitrito em fragmentos de pele de camundongos *Hairless*

Para a quantificação de nitrito, os fragmentos de pele foram homogeneizados a 4°C, em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5, contendo KCl 30 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 5mM, β-mercaptoetanol 2% (v/v), sacarose 250 mM, fenil-metilfluoridosulfóxido (PMSF) 50 µg/mL, benzamidina 100 µM, antipaína 50 µM e leupetina 50µM, com auxílio de um homogeneizador de tecidos (Politron®). As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante coletado. O nitrito foi mensurado usando a reação de Griess (GREEN et.al., 1982), sendo a absorção mensurada em leitor de microplaca (Shimadzu®, Japão) no comprimento de onda de 545 nm. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A curva padrão para nitrito foi feita com nitrito de sódio em água destilada nas seguintes concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 e 1,56 µM. O limite de detecção do ensaio foi de 1,5 µmol/L em água destilada.

4.2.1.9 Ensaio imunoenzimático para dosagem de IL8, TNF- α e IL-1 β nos fragmentos de pele os camundongos *Hairless*

As amostras para os ensaios imunoenzimáticos foram preparadas a partir da homogeneização, com banho de gelo, dos fragmentos de pele em solução de extração de citocinas (*item 4.1.5.1*) na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido utilizando um homegeneizador de tecidos (Politron®). Em seguida centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min a 4°C, e o sobrenadante foi armazenado a -20°C. A concentração de citocinas (TNF- α , IL8 e IL-1 β) nos sobrenadantes (50 μ L) foi determinada usando kits de imunensaio (R & D Systems®, Abingdon, UK) seguindo seus protocolos do fabricante. A placa de microtitulação foi sensibilizada com 100 μ L/ poço de anticorpo primário (anti-camundongo) específico para a citocina a ser avaliada e incubada a 4°C overnight. A placa foi lavada 6 vezes com 400 μ L de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem). Em seguida foram adicionados à placa 200 μ L/ poço de PBS pH 7,4 com 1% BSA, seguido de incubação por 1 hora para bloquear os sítios de ligações inespecíficas. A placa foi novamente lavada (5 vezes) com Tampão de lavagem (*item 4.1.5.1*). Os padrões e as amostras diluídas em PBS pH 7,4 com 0,1% BSA e 0,05% Tween 20 (100 μ L/poço) foram adicionadas à placa e incubados a 4°C overnight. A placa foi lavada com o tampão de lavagem (5 vezes) e foram adicionados 100 μ L/ poço do anticorpo de detecção biotinizado a ser dosado. Após incubação por 2 h, a placa foi novamente lavada por 5 vezes com o tampão de lavagem, foram adicionados 100 μ L/poço do conjugado estreptavidina-peroxidase (1:200) e seguido de incubação por 20 min à temperatura ambiente. Após nova lavagem da placa (5 vezes), foram adicionados 100 μ L/ poço de OPD (ortofenilenodiamina) 0,5% diluído em tampão citrato 0,03% pH 5,0 contendo 0,02% de H₂O₂ 30 v/v. A placa foi incubada ao abrigo da luz por no máximo 30 min e a reação foi interrompida por adição de 50 μ L/ poço de H₂SO₄ 1M. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro a 492 nm (Shimadzu®, Japão). Todas as amostras foram avaliadas em duplicata e as incubações (exceto overnight) foram à temperatura ambiente. Uma curva-padrão, com sete pontos, foi construída usando diluições seriadas a partir de 1000 pg/mL a 15,62 pg/mL dos respectivos anticorpos (BARCELOS et al., 2009).

4.2.1.10 Ensaio zimografia

Para o ensaio de zimografia a concentração protéica do homogenato foi determinada pelo método de Bradford (1976). As zimografias foram executadas segundo protocolo previamente descrito (HU & BEETON, 2010) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 7,5 % contendo gelatina na concentração final de 0,1%. Trinta µg de proteína de cada amostra (descrita a obtenção no *item 4.2.1.4*) foram submetidas a 90 Volts por um tempo médio de 90 min. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes de 30 min em tampão de lavagem (*item 4.1.5.2*) para total remoção do SDS, seguido de incubação a 37°C em tampão de incubação (*item 4.1.5.2*) por 18 horas. A seguir, os géis foram corados com a solução corante de géis (*item 4.1.5.2*) e descorados (solução descorante – *item 4.1.5.2*). A atividade da gelatinase foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. A análise semiquantitativa foi feita usando o programa de análise de imagem ImageJ® e expressas por porcentagem.

4.2.1.11 Análise histológica

As amostras de pele fixadas em solução tamponada de formalina a 10% foram processadas como de rotina para inclusão em parafina, e cortadas em secções de 5 µm de espessura. As lâminas obtidas foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE) (BEHMER et al., 1976) para descrição e avaliação histomorfométrica, tricrômico de Gomori (GOMORI, 1950) para análises das fibras colágenas em microscopia óptica de luz convencional.

Determinação da espessura Derme/Hipoderme e Epiderme

Todos os cortes histológicos corados com H&E foram visualizados pela objetiva de 10X do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany) para a digitalização aleatória de 5 imagens através da microcâmara JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan). Em cada imagem foram feitas 5 medidas aleatórias para a obtenção da espessura média da derme/hipoderme e epiderme. As medidas foram feitas manualmente através de ferramentas do *software* KS300, contido no analisador de imagens Carl Zeiss, para o cálculo subsequente da espessura em µm. A metodologia empregada

para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por CALIARI (1997).

Análise quantitativa do infiltrado inflamatório

Os cortes histológicos foram visualizados pela objetiva de 40X para digitalização de 30 imagens através da microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan), perfazendo uma área total de $1,6 \times 10^6 \text{ mm}^2$ de hipoderme analisada em cada animal. Uma seqüência de algoritmos do programa KS300 software foi elaborada para o processamento das imagens, segmentação, definição das condições de morfometria e contagem dos núcleos (CALIARI, 1997). As técnicas de processamento de imagens foram aplicadas para evidenciar os núcleos das células. Através da segmentação, foram selecionados os pixels dos núcleos de todos os tipos celulares presentes na hipoderme e excluídos aqueles de glândulas, folículos e vasos sanguíneos do corte histológico. Mediante este processo, foi criada uma imagem binária e contados os núcleos de todos os tipos celulares presentes na hipoderme. A contagem obtida no grupo *Sham* foi considerada como o padrão normal de celularidade da hipoderme, sem infiltrado inflamatório. Já nos animais irradiados, foram contados os núcleos dos tipos celulares normalmente presentes na hipoderme e os núcleos dos leucócitos recrutados no processo inflamatório, permitindo a avaliação quantitativa da inflamação de acordo com FERREIRA-JUNIOR et al (2015).

Análises imunohistoquímica e morfométrica da proliferação celular e apoptose

Na análise imunohistoquímica, foi utilizada a técnica de estreptavidina-peroxidase, usando o Kit para imunohistoquímica (*Kit Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent*, HRP - Lab Vision, DAKO), sendo empregada recuperação antigênica usando solução de Retrieval pH 6,0 em calor úmido durante 20 min. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 h com o anticorpo primário (anti-PCNA – diluição de 1:200; anti-caspase 3 – diluição de 1:600), por 2 etapas subsequentes de 25 min de bloqueio da peroxidase endógena e por 15 min

na aplicação do soro de bloqueio, anticorpo secundário, e da estreptavidina peroxidase. O cromógeno utilizado foi o DAB, em incubação durante 10 min e foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Meyer por 1 min.

A taxa de proliferação de células epiteliais foi determinada utilizando o marcador anti-PCNA, sendo analisados 5 campos no aumento de 600x, em áreas de maior número de células marcadas positivamente na camada epidérmica. Um total de 1000 células entre marcadas negativa e positivamente foram contabilizadas. O índice de proliferação foi dado como porcentagem de células marcadas positivamente em relação ao total de células.

4.2.1.12 Western Blotting

O fragmento de pele foi homogeneizado com tampão de lise (50 μ L/100mg tecido – *item 4.1.5.3*) sobre gelo. A seguir, os lisados foram centrifugados a 13.000 x g/4°C e o sobrenadante recolhido e conservado a -80°C. A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Bradford (Sigma®).

Trinta μ g dos lisados proteicos foram fracionados em gel de poliacrilamida para a separação por eletroforese (SCHLICKEISER & PLEYER, 2007) utilizando-se o sistema Mini-Protean II Eletrophoresis Cell (Bio-Rad® Laboratories, Hercules CA, USA). Inicialmente, pelo período de 30 min a corrida foi realizada sob voltagem de 80V, após esse período, a voltagem foi alterada para 90V. Após a eletroforese, o gel foi incubado à temperatura ambiente durante 10 min com o tampão de transferência (*item 4.1.5.3*) sob lenta agitação. Concomitantemente, uma membrana de PVDF (Bio-Rad® Laboratories, Hercules CA, USA) de mesma dimensão do gel foi lavada por 1 min com metanol absoluto e depois incubada em tampão de transferência. As proteínas separadas foram transferidas para a membrana utilizando-se o sistema de transferência Trans-Blot turbo-Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). As membranas foram então coradas com Ponceau 0,5% em ácido tricloroacético 3% para verificar a eficiência da transferência e para confirmar a quantidade de proteínas em cada canaleta. Após a transferência, a membrana de PVDF foi incubada na solução de bloqueio (*item 4.1.5.3*) por 1 h. Depois, lavou-se a membrana seis vezes de 5 min em TTBS (*item 4.1.5.3*) seguindo-se a incubação à 4°C *overnight* com 5 mL dos anticorpos primários (ver Tabela 1). Ao final da

incubação, lavou-se 6 vezes a membrana por 5 min em TTBS, sendo posteriormente incubada por 1 h com 5 mL de anticorpo anti-IgG de coelho com peroxidase conjugada (diluído 1:10.000 em TTBS) nas mesmas condições anteriores. Lavou-se novamente a membrana por 6 vezes de 5 min em TTBS, e procedeu-se a revelação por quimioluminescência utilizando o Luminatta Forte (Invitrogen®) como revelador em Fotodocumentador ImageQuant® (GE Healthcare Life Sciences, USA).

Após a revelação, as membranas foram recuperadas pela incubação das mesmas por 10 min com solução comercial de *stripping buffer* (SEPPRO®, Sigma-Aldrich, USA). O procedimento de blot foi repetido, agora utilizando anticorpo anti-GAPDH (1:10000).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos experimentos de *Western blotting*

Ac específico para:	Fabricante	Concentração	Ac secundário
p-p38	Cell Signaling®	1:500	HRP Camundongo
p38 total	Cell Signaling®	1:500	HRP Coelho
p-Akt	Cell Signaling®	1:1000	HRP Coelho
Akt total	Cell Signaling®	1:2000	HRP Coelho
COX2	Abcam®	1:500	HRP Coelho
p-53	Abcam®	1:1000	HRP Coelho
p-JNK	Cell Signaling®	1:2000	HRP Coelho
JNK total	Cell Signaling®	1:2000	HRP Coelho
Caspase 3	Cell Signaling®	1:1000	HRP Coelho
GAPDH	Cell Signaling®	1:10.000	HRP Coelho

4.2.2 Avaliação in vitro

4.2.2.1 Avaliação da atividade antioxidante in vitro da amostra de P1G10

Atividade sequestrante do radical livre DPPH

A medida da capacidade sequestrante a ser determinada pelo método do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) baseia-se o princípio de que o DPPH, sendo um radical estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um

radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de um antioxidante e assim, adquire uma coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, que desaparece a medida que vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (MENSOR et al., 2001). Utilizou-se como padrão o ácido ascórbico. A mistura da reação foi constituída pela adição de 0,5mL do padrão e/ou amostra, 3,0 mL de etanol puro e 0,3mL do radical DPPH em solução de etanol 0,5 mM e incubada por 45 min, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O consumo do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) pelas diferentes concentrações da fração foi monitorada pelo decréscimo da absorbância. A atividade anti-radical foi determinada na forma de atividade antioxidante (AA), pela Equação 01:

$$AA(\%) = 100 - \left\{ \frac{[Aa - Ab]}{Ac} \right\} \quad (01)$$

Onde:

Aa= absorbância da amostra

Ab= absorbância do branco

Ac=absorbância do controle negativo

O controle negativo foi feito substituindo o volume do extrato por igual volume do solvente. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume do solvente. Os valores obtidos foram expressos por meio do EC50, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o radical DPPH inicial da reação. Portanto, foram calculados por regressão não linear de gráficos em que o eixo das abcissas representou a concentração da fração P1G10 e o eixo das ordenadas a atividade antioxidante (%), calculada segundo a equação 1.

4.2.2.2 Cultivo celular

Células de queratinócitos (HaCat), de origem humana, foram cultivadas em meio F12-Ham e DMEM (1:1) (*item 4.1.5.3*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), respectivamente. A linhagem foi cultivada em frascos de cultivo, em estufa incubadora a 37° C e 5% (v/v) de CO₂.

Ao atingirem aproximadamente 90% de confluência, procedeu-se à tripsinização da linhagem. Para isso, o meio de cultivo foi aspirado, as células foram lavadas com 2,0 mL de PBS/EDTA pH 7,4 (*item 4.1.5.3*), aspirando-o logo em seguida. Colocou-se 0,5 mL de solução de tripsina 0,25%. A tripsina foi inativada após completo desprendimento das células com 1,5 mL do meio F12-Ham e DMEM a 10 % (v/v) de FBS. Obteve-se, então, uma suspensão celular que, após contagem, foi ajustada à densidade celular apropriada para a realização dos experimentos.

4.2.2.3 Determinação do nível ótimo de irradiação UVB em cultura de queratinócitos

Para a determinação do nível ótimo da intensidade de UVB, as células HaCat foram semeadas em placas de poliestireno de 24 cavidades (1 x 10⁵ células/cavidade) com meio F12-Ham e DMEM (*item 4.1.5.3*) contendo FBS 10%. Após a incubação por 24 h, essas células foram lavadas com PBS e expostas a irradiação UVB com 500 µL de PBS. Assim a dose de irradiação variou entre 0 - 100 mJ/cm². Após a irradiação, as células receberam meio sem soro por 6, 12, 24 e 48 h.

4.2.2.4 Avaliação da citotoxicidade da radiação UVB ou P1G10 por ensaio de MTT

Previamente, queratinócitos foram cultivados em placas de 96 poços na densidade de 1 x 10⁴ células/poço e após a incubação por 24 h, as células foram lavadas com PBS e submetidas (ou não) à irradiação por UVB (30mJ/cm²). Imediatamente, após a irradiação, essas células foram tratadas com diferentes concentrações da fração P1G10 (0,1- 10 ng/mL) (ou não) em meio sem soro e incubadas por 24 h em estufa a 37° C e 5% (v/v) de CO₂.

Ensaio MTT

A viabilidade dos queratinócitos foi determinada pela capacidade da mitocôndria converter o sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5 difeniltertrazolium brometo (MTT) em insolúveis cristais de formazan, conforme descrito por MOSMAN (1983).

Nesse ensaio, 100 µL de 1mg/mL do reagente de MTT foi adicionado em cada poço e incubado por 4 h. Logo, após, o MTT não convertido foi removido e a quantidade de formazan formado nas células foi determinado pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO) e medido através da densidade ótica em comprimento de onda de 570 nm usando o leitor de microplacas (Shimadzu®, Japão).

4.2.2.5 Avaliação da formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Os níveis intracelulares de EROS em queratinócitos foram analisados pelas sondas sensíveis à oxidação. Assim, para avaliar a produção de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi usada a sonda fluorescente Dihidroetídeo (DHE 2,5µM, Calbiochem®). No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm) (SHARIKABAD et al., 2001). A oxidação do DHE é quantitativamente proporcional a concentração de $O_2^{\cdot-}$ na célula.

Para avaliar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) usou-se a sonda diacetato 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH-DA 5 µM, Sigma®). O DCFH-DA é um éster, não-fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, o DCFH-DA perde o grupo diacetato, pela ação de esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que pode ser oxidado pelo H_2O_2 formando o composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que por ser apolar fica aprisionado no interior da célula. Portanto, a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração de H_2O_2 na célula (HIRABAYASHI et al., 1985).

As células HaCat foram semeadas em placas de poliestireno de 24 cavidades (1×10^5 células/cavidade) com meio F12-Ham e DMEM contendo FBS 10%. Após a incubação por 24 h, essas células foram lavadas com PBS e expostas à radiação

UVB com 500 μ L de PBS. Após a irradiação, foram tratadas com diferentes concentrações da fração P1G10 (0,5 – 10 ng/mL) em meio sem soro e incubadas por 24 h em estufa a 37° C, 5% (v/v) de CO₂. Em seguida, foi removido o sobrenadante, essas células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio sem fenol e soro com as sondas DHE ou DCFH-DA por 30 min (a 37° C). Após esse período, foram transferidas para um tubo de poliestireno de 5mL e analisadas por citômetro de fluxo (FACSCAN® , BD). A aquisição dos dados foi feita por *software* CELLQuest™ e os dados analisados com auxílio do *software* Flowjo versão 7.6.5 (TreeStar®).

4.3 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como media \pm e.p.m. e analisados no programa *Graph Prism 5.0*®, usando análise de variância (One-way ANOVA) seguido do teste de *Student Newman Keuls*. Foram considerados significativos os resultados cujos valores de “p” foram inferiores a 0,05 ($p < 0,05$). A representação gráfica foi mostrado apenas significância estatística quando comparado o grupo UVB com o grupo *Sham* e os grupos que receberam P1G10 com o grupo Controle Veículo (CV).

5 RESULTADOS

Com o propósito de avaliar a atividade protetora de P1G10 frente a lesões induzidas por UVB, foi estudada sua ação em modelos de exposição aguda dose única e repetidas, e seus efeitos sobre parâmetros inflamatórios e antioxidantes, como mostrado nos resultados descritos a seguir.

5.1 Caracterização do modelo *in vivo* de exposição à UVB - dose única

5.1.1 Análise macroscópica

Uma única exposição a 2,4 J/cm² UVB promoveu a formação de uma lesão caracterizada por eritema e edema, na pele dos animais irradiados (Figura 16 A a E). Essas alterações foram observadas já nas primeiras 6 h, tendo acentuação do edema até 24 h e do eritema até 12 h após à exposição, e redução desses parâmetros em 48 h. (Tabela 2, Figura 16 A a E).

Tabela 2 - Avaliação macroscópica da pele de camundongos *Hairless* antes e após a exposição única à irradiação UVB.

Lesões macroscópicas	Tempo (h) de exposição após a irradiação UVB				
	0	6	12	24	48
Edema	-	+	+	+++	+
Eritema	-	+	+++	++	+

Nota: Os animais foram expostos a 2,4 J/cm² de UVB. A avaliação da pele foi feita antes (0h) e 6, 12, 24 e 48 h, após a exposição. (-) ausente; (+) leve; (++) moderado; (+++) intenso.

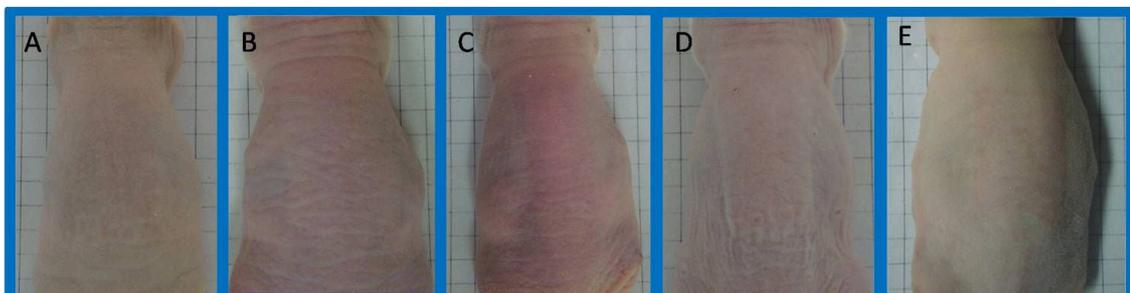


Figura 16 - Evolução temporal dos efeitos da exposição à radiação UVB sobre a pele de camundongos *Hairless*. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (2,4J/cm²) e as lesões observadas até 48 horas após a irradiação. Imagens das lesões antes (A) e após 6, 12, 24 e 48 h (B-E) após a exposição à UVB.

5.1.2 Análise histológica

A Figura 17 mostra fotomicrografias de cortes corados por HE, de fragmentos de pele de camundongos *Hairless* sem ou com lesões induzidas por UVB, após 6, 12, 24 e 48 h da exposição. Na Figura 17A é mostrado o aspecto da pele não-lesada, onde se observa a integridade da epiderme composta por 2 ou 3 camadas, com moderado depósito de queratina. Seguindo a descrição histopatológica, a derme apresenta intacta com fibras colágenas maduras, moderada população de fibroblastos e mastócitos (aproximadamente, 10 por campo, além de folículos pilosos (2 a 3 por campo) e anexos epidérmicos encontrados na derme superficial até a hipoderme, com rara presença de linfócitos e neutrófilos (Figuras18).

Após a irradiação foram observadas alterações na epiderme, derme e hipoderme ao longo da cinética realizada. Na epiderme, 6 h (Figura 17 B) após a irradiação, as células se apresentavam “balonosas” (aumentada de volume) com presença de microvacúolos intracitoplasmáticos, compatível com degeneração hidrópica, além de células em apoptose (5 células por campo). Comparativamente, 12 h após a exposição (Figura 17C), a epiderme apresentou células epiteliais já anucleadas e intensamente eosinofílicas (>90%), cuja arquitetura tissular é compatível com uma necrose de coagulação. Essas características, também, foram observadas no tempo de 24 e 48 h (Figura 17 D e E) após a irradiação.

Na derme, após 6 h de exposição (Figura 18 B), já é observado um aumento discreto da espessura desta camada com fibras colágenas espessas, presença moderada de degranulação mastocitária, no entanto, sem alteração dos folículos pilosos e anexos. Além dessas alterações, no tempo de 12 h (Figura 17 C) é observada moderada destruição das fibras colágenas e hialinose, além da redução de folículos e anexos (1 a 2 por campo), com rara presença de leucócitos e mastócitos. Após 24 e 48 h (Figura 18 D e E) de exposição, os danos à derme se somam, apresentando fibras colágenas ainda mais desorganizadas, com maior redução de folículos pilosos, discreta presença de infiltrado leucocitário, porém com preservação dos anexos epidérmicos.

Ademais, as alterações na hipoderme foram observadas a partir de 12 h após a irradiação UVB, sendo apresentada intensa destruição de membrana celular,

eosinofilia, compatível com o processo de esteatonecrose e redução de número de bulbos foliculares. Em 24 h, os bulbos foliculares foram moderadamente observados, assim como o infiltrado leucocitário com predominância de neutrófilos, que se intensificou em 48 h (observado também na derme profunda).

As medidas da espessura derme-hipoderme de todos os grupos foram analisadas por morfometria, como mostrado na Figura 18 (A-F). Na Figura 18 F, observa-se um aumento significativo da espessura apenas no tempo de 24 h ($752,10 \pm 73,56 \mu\text{m}$), quando comparado ao *Sham* ($445,00 \pm 18,21 \mu\text{m}$, $p < 0,01$, ANOVA com pós teste *Newman Keuls*), seguido de redução desse parâmetro no tempo de 48 h

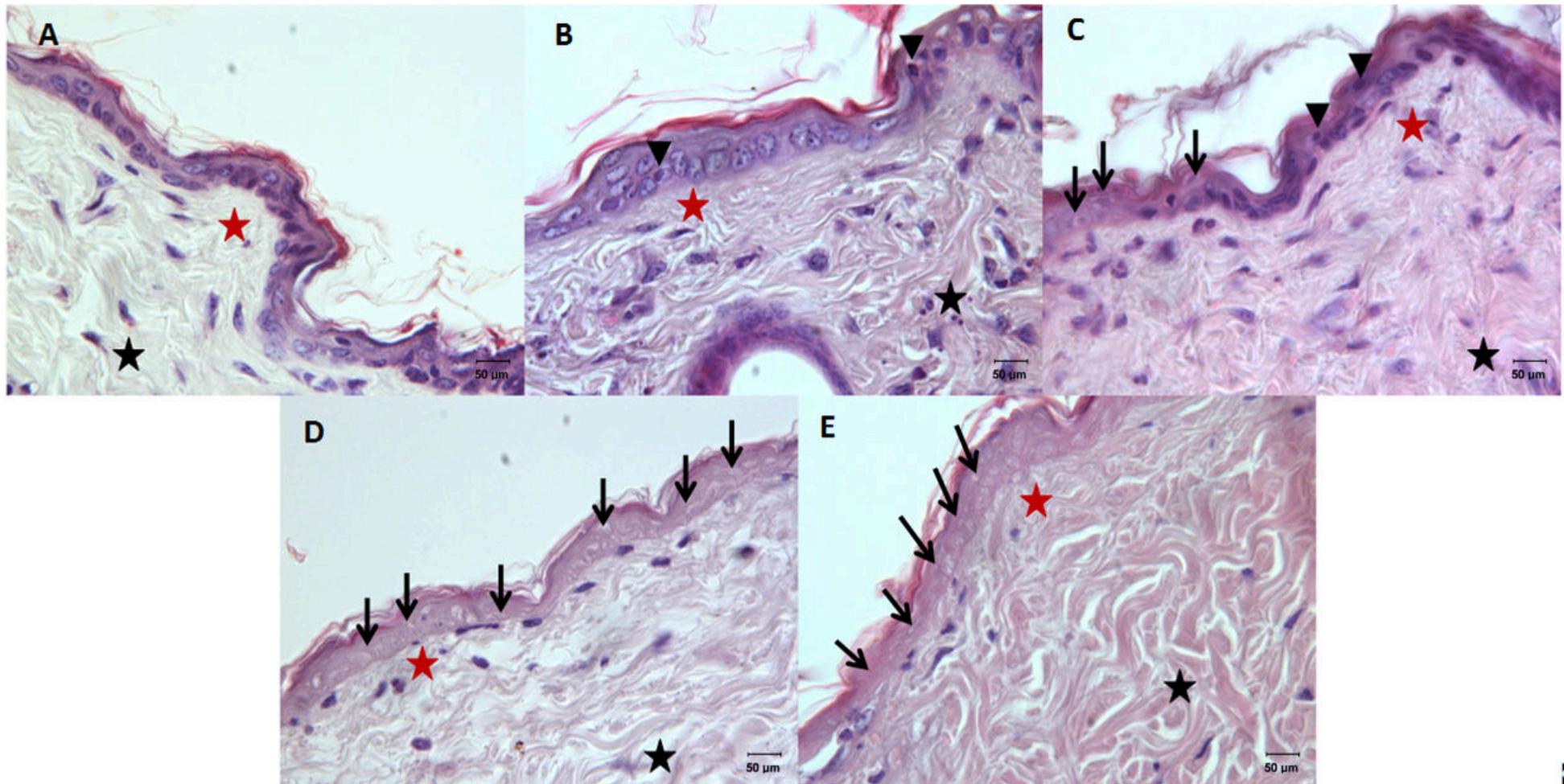


Figura 17 - Fotomicrografias de cortes histológicos corados por H&E da pele do dorso dos animais *Hairless* após a exposição à UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) e fragmentos das lesões produzidas foram coletados após 6 h-48 h após a exposição. . As imagens representam os grupos: (A) Sham; (B) 6 h; (C) 12 h; (D) 24 h e (E) 48 h. Cabeças de seta: células em apoptose; setas pretas: células anucleadas; estrela vermelha: derme superficial; estrela preta: derme profunda. Objetiva de 40x.

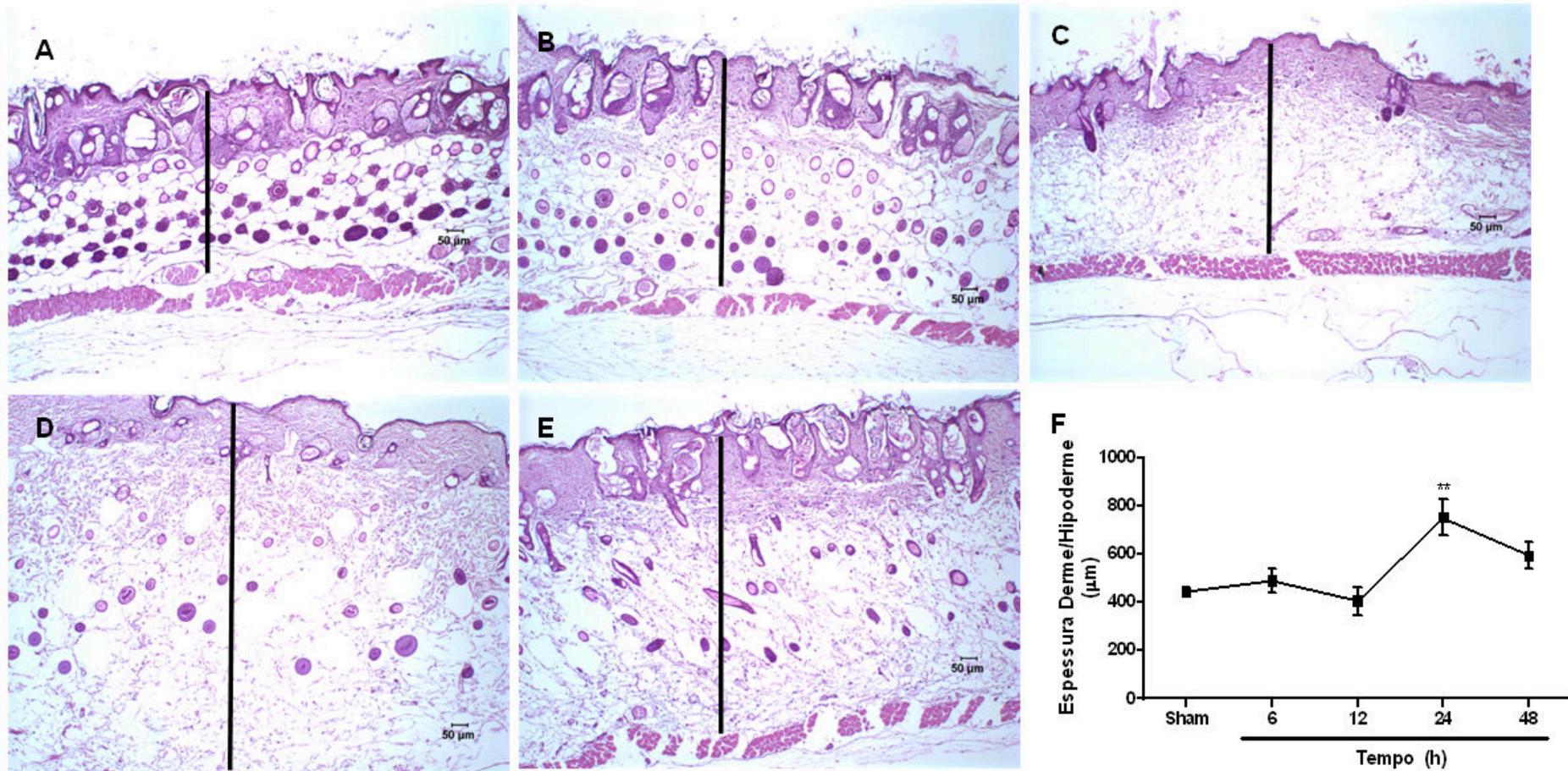


Figura 18 - Análise morfométrica de cortes histológicos corados por H&E de pele do dorso dos animais *Hairless* submetidos a irradiação por UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) e fragmentos das lesões produzidas foram coletados após 6 h-48 h,. As imagens (Objetiva de 10X) representam os grupos: (A) Sham; (B) 6 h; (C) 12 h; (D) 24 h e (E) 48 h e (F) Medida morfométrica da espessura Derme/Hipoderme da cinética. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (μm), comparados com o grupo Sham (** $p < 0,01$, ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

5.1.2.1 Avaliação de parâmetros inflamatórios

Os resultados da avaliação macroscópica e histológica mostraram os indícios da participação do processo inflamatório nas lesões produzidas pela exposição à radiação UVB. Para avaliar o recrutamento de neutrófilos, mensurou-se os níveis da enzima mieloperoxidase (MPO). Na Figura 19, observa-se que houve um aumento significativo dos níveis de MPO a partir de 6 h ($129,00 \pm 12,40$ % $p < 0,001$) após a irradiação, com aumento significativo após 12 h ($177,00 \pm 19,23$ %, $p < 0,001$) e mantendo-se crescente até 48 h ($286,70 \pm 33,43$ % $p < 0,001$), em relação ao grupo *Sham* ($95,19 \pm 7,29$ %, ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

Os níveis da citocina pró-inflamatória, TNF- α também foram mensurados. Como mostrado na Figura 20, verifica-se um aumento significativo de TNF- α apenas no tempo de 12 h ($4,67 \pm 0,70$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido) após a irradiação, quando comparado com o grupo *Sham* ($1,26 \pm 0,37$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido, $p < 0,001$, ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

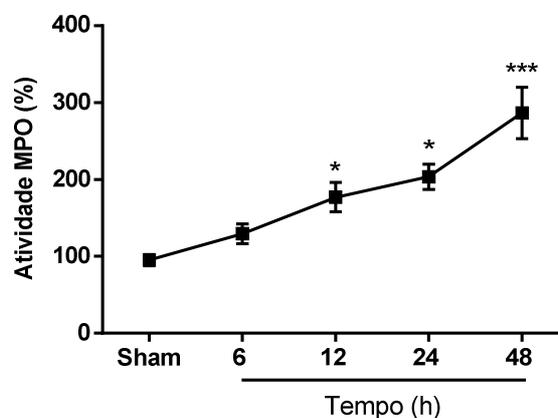


Figura 19 - Medida da atividade de Mieloperoxidase (MPO) em pele de camundongos *Hairless* após a exposição à UVB . Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) e após 6 h - 48 h foram eutanasiados e fragmentos de pele removidos para análise. O gráfico apresenta a dosagem de MPO em pele nos tempos de 6, 12, 24 e 48 h após a irradiação. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), comparados com o grupo *Sham* (* $p < 0,05$ ou *** $p < 0,001$ ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

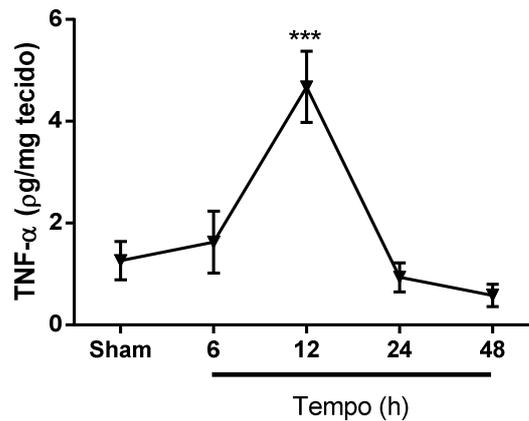


Figura 20 - Medida dos níveis de TNF- α em pele de camundongos *Hairless*, após a irradiação com UVB Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (2,4J/cm²) e após 6 h - 48 h foram eutanasiados e fragmentos de pele removidos para dosagem de TNF- α por ELISA. O gráfico representa a concentração de TNF- α em 6, 12, 24 e 48 h após a irradiação. Os resultados obtidos estão apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (pg/mg tecido), comparados com o grupo Sham (***) $p < 0,001$, ANOVA com pós teste Newman Keuls).

5.1.3 Avaliação do sistema oxidante/antioxidante

Com objetivo de avaliar a influência da radiação UVB sobre o sistema oxidante/antioxidante foram avaliadas a produção indireta de óxido nítrico (níveis de nitrito), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH).

No modelo proposto, observou-se que a radiação UVB promoveu uma diminuição significativa dos níveis de nitrito, nas primeiras 6 ($1,11 \pm 0,16 \mu\text{M}$) e 12 h ($0,28 \pm 0,0 \mu\text{M}$ vs $4,32 \pm 0,61 \mu\text{M}$ Sham, $p < 0,05$). Em contraste, no tempo de 24 h houve elevação significativa dos níveis de nitrito ($10,05 \pm 0,88$ vs $4,32 \pm 0,61 \mu\text{M}$ Sham, $p < 0,001$), com retorno aos níveis basais em 48 h (Figura 21).

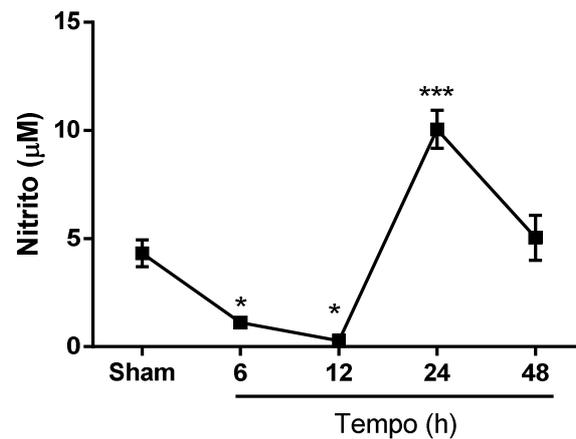


Figura 21 - Evolução temporal dos níveis de nitrito em pele de camundongos *Hairless*, após a exposição à radiação UVB Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4 \text{ J/cm}^2$) e após 6, 12, 24 e 48 h foram eutanasiados e fragmentos de pele foram coletados para análise de nitrito, nesses tempos. Os resultados obtidos são apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (μM), comparados com o grupo *Sham* (* $p < 0,05$ ou *** $p < 0,001$ ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

Os resultados das determinações de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos estão apresentadas na Figura 22 A radiação UVB promoveu um aumento significativo da atividade da CAT (Figura 22A) ($259,20 \pm 39,42 \%$ vs $100,00 \pm 30,21\%$ *Sham*, $p < 0,01$) observado no tempo de 24h, e na atividade de SOD, (Figura 22B), porém no tempo de 12 h ($235,80 \pm 30,43 \%$ vs $113,90 \pm 8,53\%$ *Sham*, $p < 0,01$). Em seguida, após 24h, os valores da atividade de SOD se apresentaram reduzidos, significativamente ($64,05 \pm 5,14 \%$ vs $113,90 \pm 8,53\%$, *Sham*, $p < 0,05$). Em contrapartida, (Figura 22C) observou-se uma redução dos níveis de GSH logo após a irradiação ($62,19 \pm 4,97$ vs $198,10 \pm 23,07 \text{ mM}/\mu\text{g}$ tecido *sham*, $p < 0,01$), seguida de um aumento dos níveis a partir de 12 h, porém com valores ainda reduzidos, significativamente, ($129,50 \pm 6,33 \text{ mM}/\mu\text{g}$ tecido, $p < 0,05$) quando comparado ao *Sham* ($198,10 \pm 23,07 \text{ mM}/\mu\text{g}$ tecido).

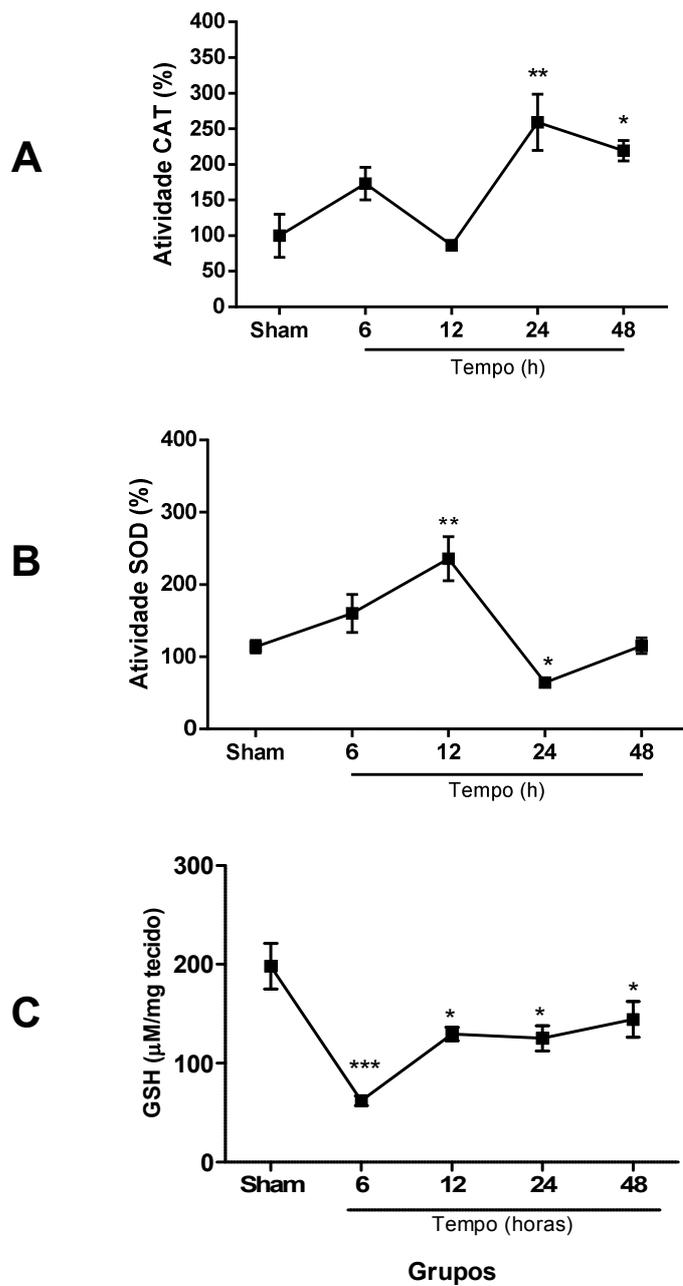


Figura 22 - Evolução temporal da atividade e níveis de fatores antioxidantes na pele de animais submetidos a radiação UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (2,4J/cm²) e após 6, 12, 24 e 48 h foram eutanasiados para coleta de fragmentos de pele para análise dos componentes do sistema antioxidante, nesses tempos. Os gráficos apresentam as avaliações das atividades de fatores do sistema antioxidante da pele em 6, 12, 24 e 48 h após a irradiação. (A) Atividade da catalase. (B) Atividade de SOD (C) Níveis de GSH. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (% ou μ M/mg tecido), comparados com o grupo Sham (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

Diante dos resultados expostos, observou-se que as maiores alterações nos parâmetros analisados (avaliação macroscópica e histológica, dosagem de MPO, TNF- α , produção de nitrito e atividade do sistema antioxidante) ocorreram no tempo de 24 h após a irradiação. Sendo assim, estabelecemos esse tempo para avaliar a atividade protetora da fração proteolítica P1G10, nesse modelo de exposição única à radiação UVB.

5.2 Avaliação do efeito de P1G10 na exposição à radiação UVB - dose única

5.2.1 Avaliação *in vivo*

5.2.1.1 Análise macroscópica

As observações macroscópicas, após 24 h de exposição à UVB, revalidam as alterações encontradas na padronização deste modelo (Figura 23). Os grupos irradiados (UVB e CV) apresentaram características semelhantes quanto à intensidade do edema e eritema, apontando um aumento destes parâmetros em relação ao grupo *Sham* (Tabela 03). Em contrapartida, se observa que os grupos tratados com P1G10 0,1 ou 1,0 % apresentaram eritema e edema leves e/ou ausentes (Figura 23D e E).

Tabela 3 Avaliação macroscópica da pele de camundongos *Hairless* tratados ou não com P1G10, após a exposição repetida à radiação UVB.

Lesões macroscópicas	Grupos experimentais				
	Sham	UVB	UVB+CN	0,1	1,0
Edema	-	+++	+++	+	+
Eritema	-	++	++	+	-

Nota: Os animais foram tratados com o veículo gel de natrosol (CV) ou P1G10 a 0,1 ou 1,0% após exposição única à 2,4 J/cm² de UVB. A avaliação da pele foi feita 24 h, após a exposição. *Sham*: grupo não lesionado, (-) ausente; (+) leve; (++) moderado; (+++) intenso.

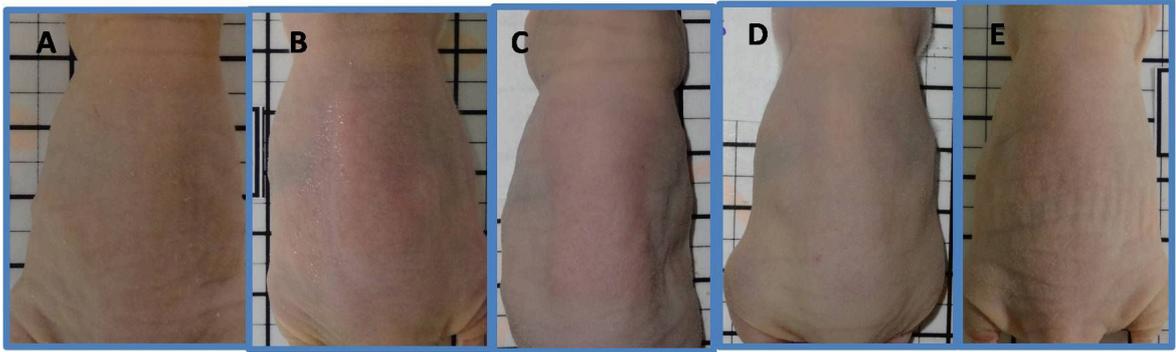


Figura 23 - Efeito do tratamento com P1G10 em lesões de pele produzidas pela exposição à radiação UVB Camundongos *Hairless* foram tratados com o veículo gel de natrosol (CV) ou P1G10 a 0,1 ou 1,0% após exposição única a 2,4 J/cm² de UVB. A avaliação da pele foi feita 24 h, após a exposição. Imagens do dorso dos animais *Hairless* não lesionados – *Sham* (A), e lesionados pela radiação (B) UVB; (C) UVB + CV; (D) UVB+ 0,1%P1G10 e (E) UVB+ 1,0% P1G10.

5.2.1.2 Análise histológica

A Figura 24 mostra a análise histológica de fragmentos de pele de animais irradiados ou não com UVB. Na Figura 24A, é mostrado o aspecto da pele não lesionada (grupo *Sham*), evidenciando o epitélio pavimentoso, íntegro, composto por 2 ou 3 camadas, com moderado depósito de queratina. Observa-se, também, a derme intacta com fibras colágenas maduras, moderada população de fibroblastos e mastócitos (aproximadamente, 10 por campo), além de folículos pilosos (2 a 3 por campo) e anexos epidérmicos evidenciados na derme superficial até a hipoderme, esta com rara presença de leucócitos.

De maneira semelhante ao observado na padronização, 24 h após a irradiação, a epiderme apresentava células eosinofílicas anucleadas ou com acentuados núcleos em picnose (acima 95%) e vacuolizadas, tal alteração compatível com uma necrose de coagulação. Nessa camada, também, se observou a presença discreta de queratina. Essas alterações da epiderme, também, foram encontradas nos grupos que receberam o veículo (CV) e 0,1% P1G10 (24 D). No entanto, o grupo que recebeu 1,0% de P1G10 apresentou menor espessura da epiderme, e redução de células anucleadas ou com núcleos picnóticos (menor que 80%).

Alterações da derme foram constatadas após à UVB, como aumento da medida da espessura, apresentando moderada desorganização das fibras colágenas, intensamente eosinofílicas, compatíveis com hialinose, além do aumento da celularidade (fibroblastos, macrófagos e neutrófilos) na derme superficial. Na derme profunda se observou fibras colágenas espessas e redução dos anexos foliculares, além da presença moderada de leucócitos, predominantemente, de polimorfonucleares. Nos demais grupos analisados, também, foram encontradas tais características, tanto na derme superficial quanto na profunda, exceto no grupo 1,0% de P1G10. Nesse grupo observou-se discreta desorganização das fibras colágenas e hialinose na derme superficial, sem alterações na derme profunda, presença discreta do aumento de celularidade, predominantemente, fibroblastos.

Por sua vez, a avaliação da hipoderme revela intensa destruição de células adiposas com área de eosinofilia compatível com uma esteatonecrose, além de uma moderada hiperemia, infiltrado inflamatório (polimorfonucleares) e ausência de bulbos foliculares. Tais alterações foram apresentadas tanto no grupo UVB como no grupo CV. Já nos grupos tratados com P1G10, observa-se hiperemia e infiltrado inflamatório discretos, além de menor destruição dos adipócitos.

Diante das alterações observadas foram realizadas medidas morfométricas, importantes para melhor caracterizar os efeitos do tratamento com a fração proteolítica, P1G10, sobre as lesões promovidas pela UVB.

Análise morfométrica: Medida Derme-Hipoderme

Na Figura 24B, observa-se que a exposição à radiação promoveu um aumento significativo na espessura da derme-hipoderme, atingindo um valor 2 vezes maior ($615,80 \pm 46,28 \mu\text{m}$) em relação ao grupo que não-irradiado – *Sham* ($300,60 \pm 72,48 \mu\text{m}$, $p < 0,01$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*). Nos animais tratados com ambas as concentrações de P1G10 (Figura 24 D e E), verifica-se uma menor espessura (0,1% - $369,20 \pm 43,24 \mu\text{m}$, $p < 0,01$ e 1,0% - $421,50 \pm 31,86 \mu\text{m}$, $p < 0,05$) em relação ao grupo CV ($646,70 \pm 57,83 \mu\text{m}$), e que não foi significativamente diferente do grupo *Sham* (Figura 24A).

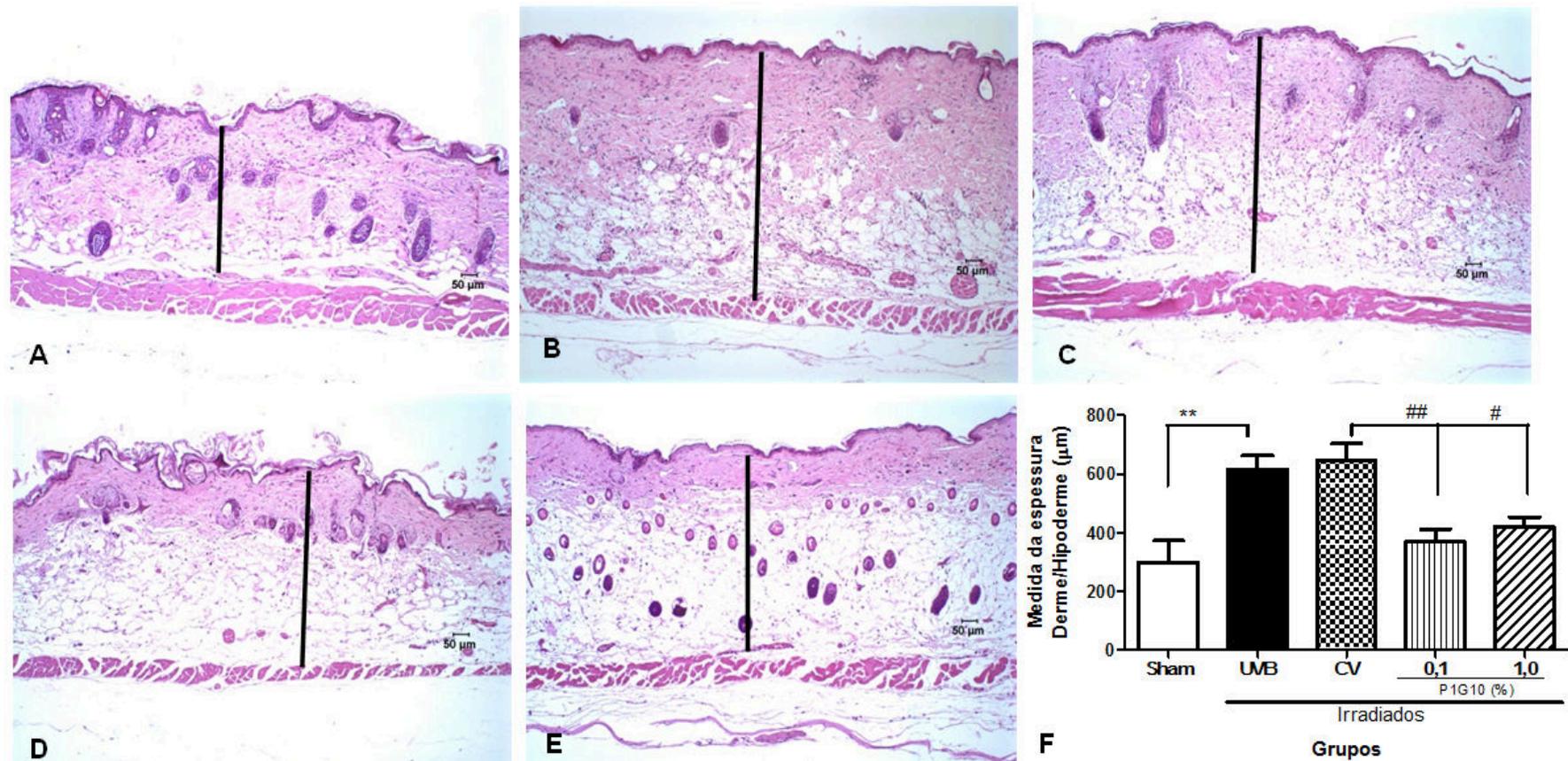


Figura 24 - Análise morfométrica da Derme-hipoderme da pele do dorso dos animais *Hairless* tratados com P1G10 após a irradiação aguda por UVB Camundongos *Hairless* foram expostos à radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) (B) ou não (A) e tratados com veículo gel Natrosol® (C) (CV) e P1G10 0,1 (D) e 1,0% (E). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e incluídos em parafina e corados por HE. F) O gráfico apresenta a medida da espessura Derme-hipoderme dos grupos analisados na imagem real com subsequente criação de uma imagem binária e posterior processamento digital. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (μm), ** $p < 0,01$ indica a diferença estatística quando comparados com o grupo UVB e ## $p < 0,01$ ou # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*). Objetiva de 10x.

Medida da celularidade e Depósito de fibras colágenas

Como mostrado na Figura 25B, a exposição ao UVB aumentou significativamente a celularidade da hipoderme dos animais irradiados (grupo UVB - $87,50 \pm 6,62$ núcleos/campo) em relação ao grupo não-irradiado (*Sham* - $41,24 \pm 4,41$ núcleos/campo – $p < 0,01$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*). Por sua vez, o tratamento com P1G10 1,0% ($58,13 \pm 5,20$ núcleos/campo, $p < 0,05$) impediu esse aumento, como indicado pela diferença significativa do número de núcleos/campo em relação ao grupo CV ($92,03 \pm 7,72$ núcleos/campo) (Figura 25C, D e E),

Com objetivo de verificar a organização e preservação das fibras colágenas após a irradiação, os cortes de fragmentos de pele foram corados com o tricrômico de Gomori (Figura 26). Nota-se que nos grupo UVB e CV (Figura 26B e C, respectivamente), as fibras apresentam-se mais desorganizadas e com coloração menos intensa, em relação ao grupo não irradiado (*Sham* – Figura 26A) tanto na derme superficial, como na profunda. Nos grupos tratados com P1G10 0,1 e 1,0% (Figura 26 D e E, respectivamente), se observa fibras mais orientadas, e com coloração mais intensa em relação aos grupos UVB e CV, indicando uma preservação da integridade dessas camadas com o tratamento. As alterações na intensidade da coloração das fibras colágenas foram medidas por uma análise semi-quantitativa, sendo verificado que, no grupo irradiado a intensidade de coloração foi menor na derme superficial ($51,85 \pm 7,4$ %, $p < 0,01$) (Figura 27 A) e profunda ($70,64 \pm 2,69$ %, $p < 0,05$) (Figura 27B) em relação ao grupo *Sham* ($100,00 \pm 9,09$ %). Em contrapartida, ao analisar a derme superficial, os grupos tratados apresentaram maior intensidade de coloração tanto no grupo tratado com P1G10 0,1% ($100,00 \pm 11,11$ %, $p < 0,01$) quanto no grupo 1,0% ($90,0 \pm 0,30$ %, $p < 0,05$), em relação o grupo CV ($53,33 \pm 8,88$ %). Similarmente na derme profunda, observou-se maior intensidade de coloração em ambos os grupos tratados com P1G10 ($96,97 \pm 7,66$ %, $p < 0,05$ para 0,1% e $106,8 \pm 2,27$ % $p < 0,05$ para 1,0%) em relação ao grupo CV ($68,48 \pm 4,24$ %).

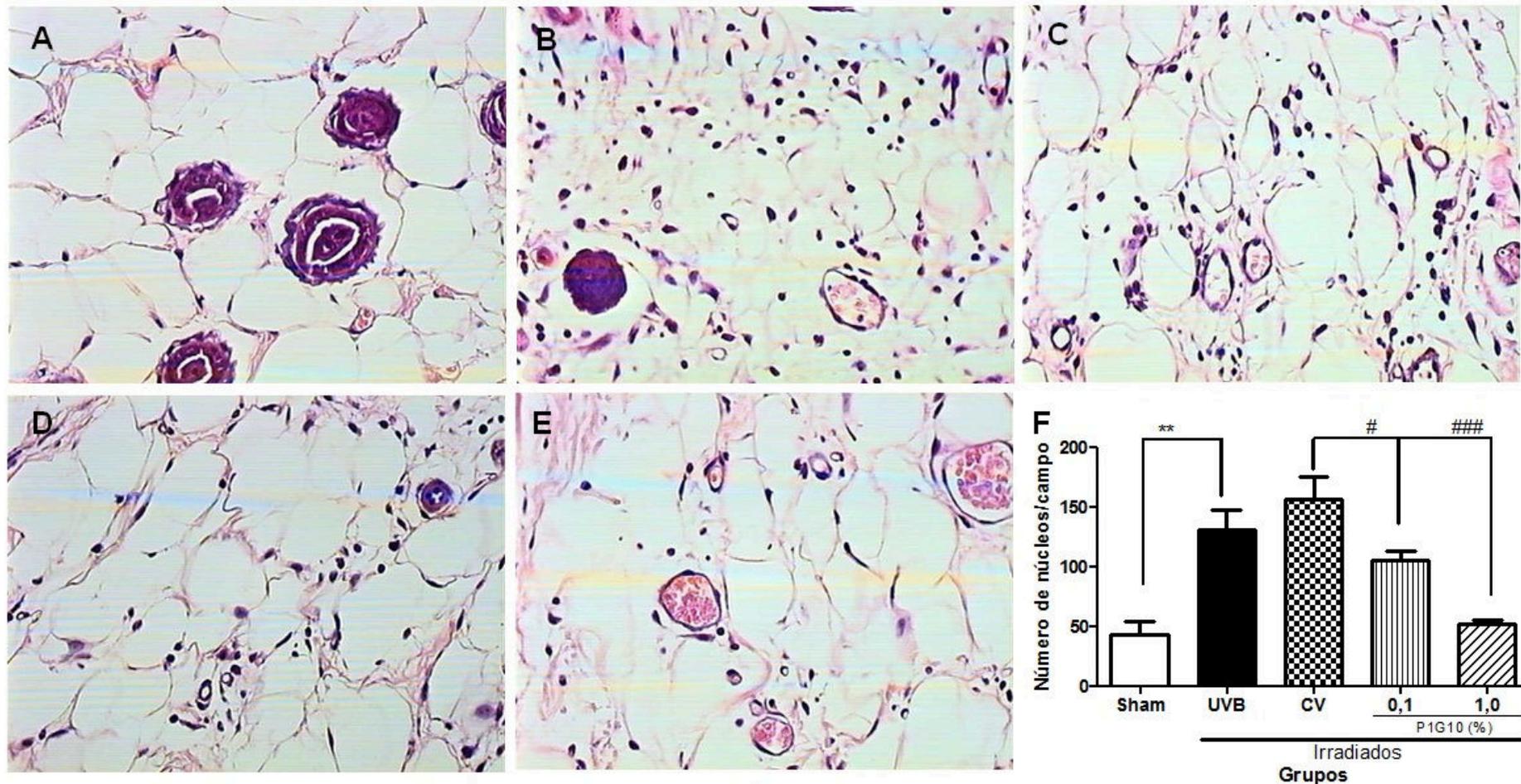


Figura 25 - Análise morfométrica da celularidade da hipoderme na pele do dorso dos animais *Hairless* tratados com P1G10 após a irradiação aguda por UVB . Camundongos *Hairless* foram expostos à radiação UVB (2,4J/cm²) (B) ou não (A) e tratados com gel Natrosol® (C) (UVB+CV) e P1G10 0,1 (D) e 1,0% (E). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e incluídos em parafina e corados por HE. F) O gráfico apresenta o resultado da quantificação dos núcleos na hipoderme na imagem real com subsequente criação de uma imagem binária e posterior processamento digital. Objetiva de 100x. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média do número de células/campo, *** $p < 0,001$ indica a diferença estatística quando comparados com o grupo UVB e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

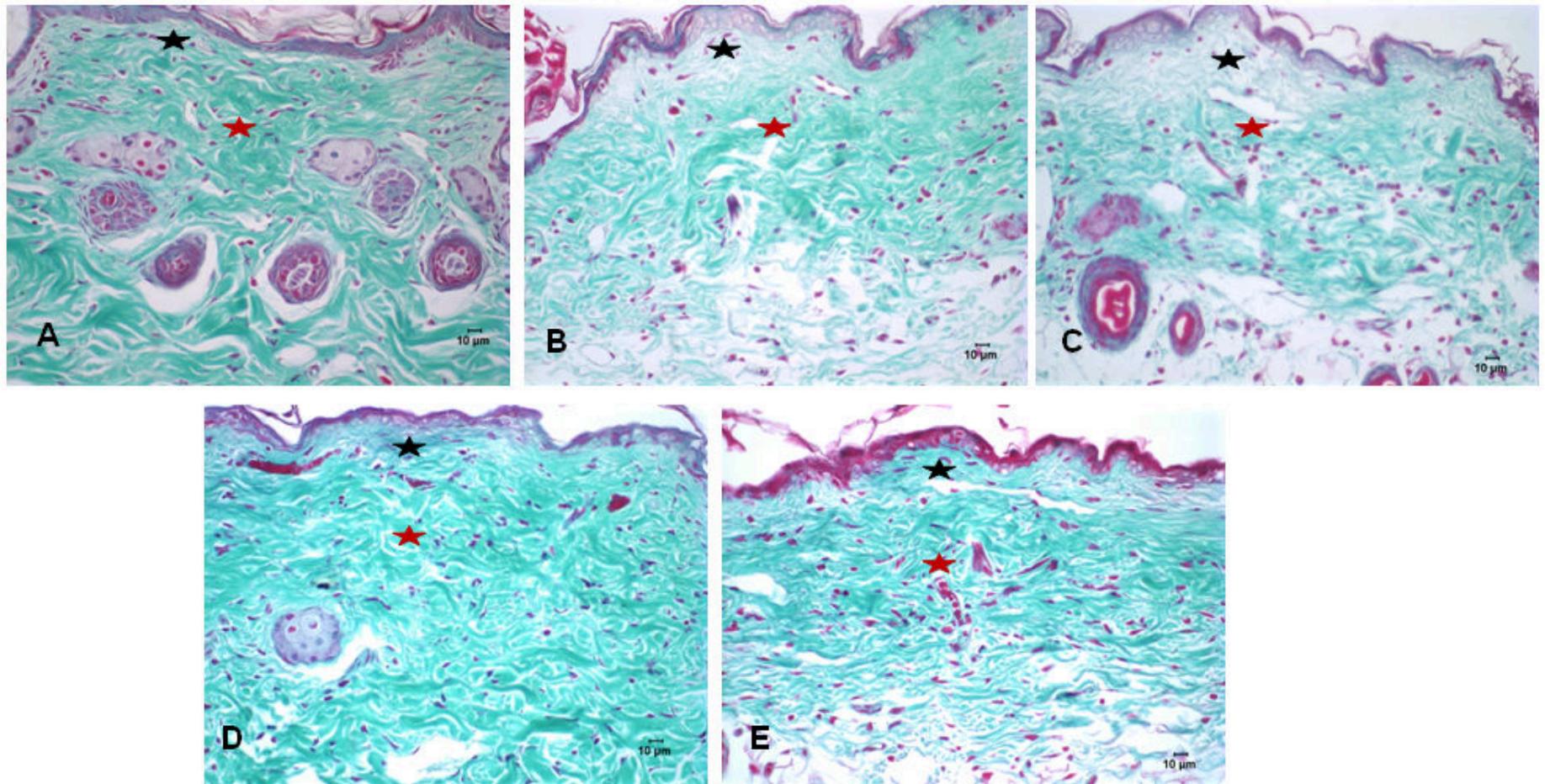


Figura 26 - Fotomicrografias na pele do dorso dos animais *Hairless* tratados com P1G10 após a irradiação aguda à UVB corados com tricrômico de Gomori. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) (B) ou não (A) e tratados com gel Natrosol® (C) CV e P1G10 0,1 (D) e 1,0% (E). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e incluídos em parafina e corados por tricômio de Gomori. . estrela preta: derme superficial; estrela vermelha: derme profunda. Objetiva de 20x.

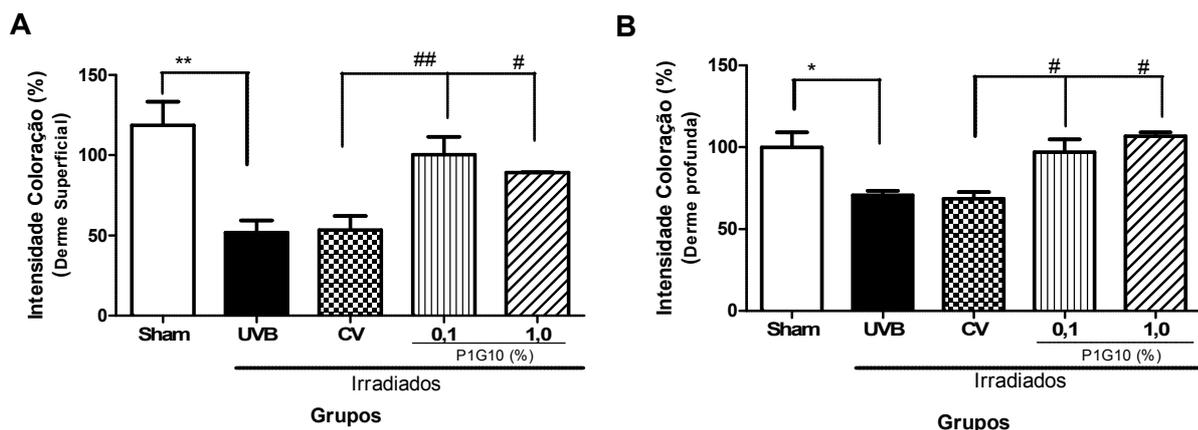


Figura 27- Análise semi-quantitativa mostrando o efeito de P1G10 sobre a organização e preservação das fibras colágenas em fragmentos de pele após a irradiação por UVB Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) e tratados com gel Natrosol®, (CN), P1G10 (0,1 e 1,0%) e após 24 h, foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados. A organização e preservação das fibras colágenas é medida através da mensuração semi-quantitativa da intensidade de coloração da derme superficial ou profunda. A) Derme superficial. (B) Derme profunda. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ indica a diferença estatística quando comparados com o grupo UVB e ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*). Objetiva de 20x.

5.2.1.3 Avaliação de parâmetros inflamatórios

Para compreender o efeito de P1G10 sobre a resposta inflamatória induzida por UVB, foram dosadas as citocinas TNF- α , IL1 β e IL8, e mensurada a atividade de MPO, como avaliação da infiltração neutrofílica, em fragmentos de pele obtidos após a exposição e tratamento.

Na Figura 28, verifica-se que houve um aumento significativo da atividade de MPO na pele de animais expostos à UVB ($173,00 \pm 33,93$ %) em relação ao grupo Sham ($94,70 \pm 6,80$ %, $p < 0,05$ ANOVA, pós teste *Newman-Keuls*). O tratamento tópico com P1G10 1,0 % reduziu significativamente a atividade de MPO ($88,65 \pm 10,57$ %, $p < 0,05$) em relação ao grupo CV ($152,2 \pm 12,84$ %).

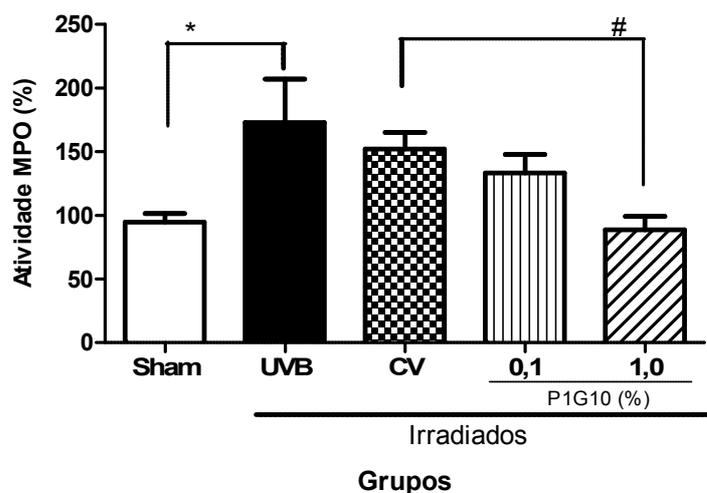


Figura 28 - Efeito de P1G10 sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em camundongos *Hairless* após dose única de UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos à radiação UVB ($2,4 \text{ J/cm}^2$) e tratados com veículo gel Natrosol® (CV), P1G10 (0,1 e 1,0%). Os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram coletados para determinação da atividade de MPO. Os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%). * $p < 0,05$ indica a diferença estatística quando comparados com o grupo UVB e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

Conforme mencionado anteriormente, na padronização desse modelo experimental, após 24 h de exposição não se observam alterações nos níveis de TNF- α . No entanto, nos grupos tratados com P1G10, os níveis dessa citocina se encontram reduzidos, sendo significativa a diferença do grupo que recebeu 1,0 % ($0,91 \pm 0,10 \text{ pg/mg tecido}$) quando comparado com o grupo CV ($1,36 \pm 0,07 \text{ pg/mg tecido}$, $p < 0,05$, ANOVA, pós teste *Newman-Keuls*) (Figura 29A).

A Figura 29B mostra que a exposição ao UVB induz um aumento, significativo, da produção de citocina IL1 β em relação ao grupo *Sham* ($2,58 \pm 0,16$ vs $0,84 \pm 0,26 \text{ pg/mg tecido}$, respectivamente, $p < 0,01$). De forma interessante, o tratamento com P1G10 1,0% reduz os níveis dessa citocina ($1,56 \pm 0,21 \text{ pg/mg tecido}$) quando comparado com o grupo CV ($2,30 \pm 0,21 \text{ pg/mg tecido}$, $p < 0,05$).

Com relação IL8 (Figura 29C), a radiação também aumentou os níveis dessa citocina, como evidenciado na comparação do grupo UVB ($1,58 \pm 0,23 \text{ pg/mg tecido}$) com o *Sham* ($0,81 \pm 0,15 \text{ pg/mg tecido}$, $p < 0,05$). Entretanto, o tratamento com a fração, em quaisquer das concentrações testadas, não alterou os níveis de IL8.

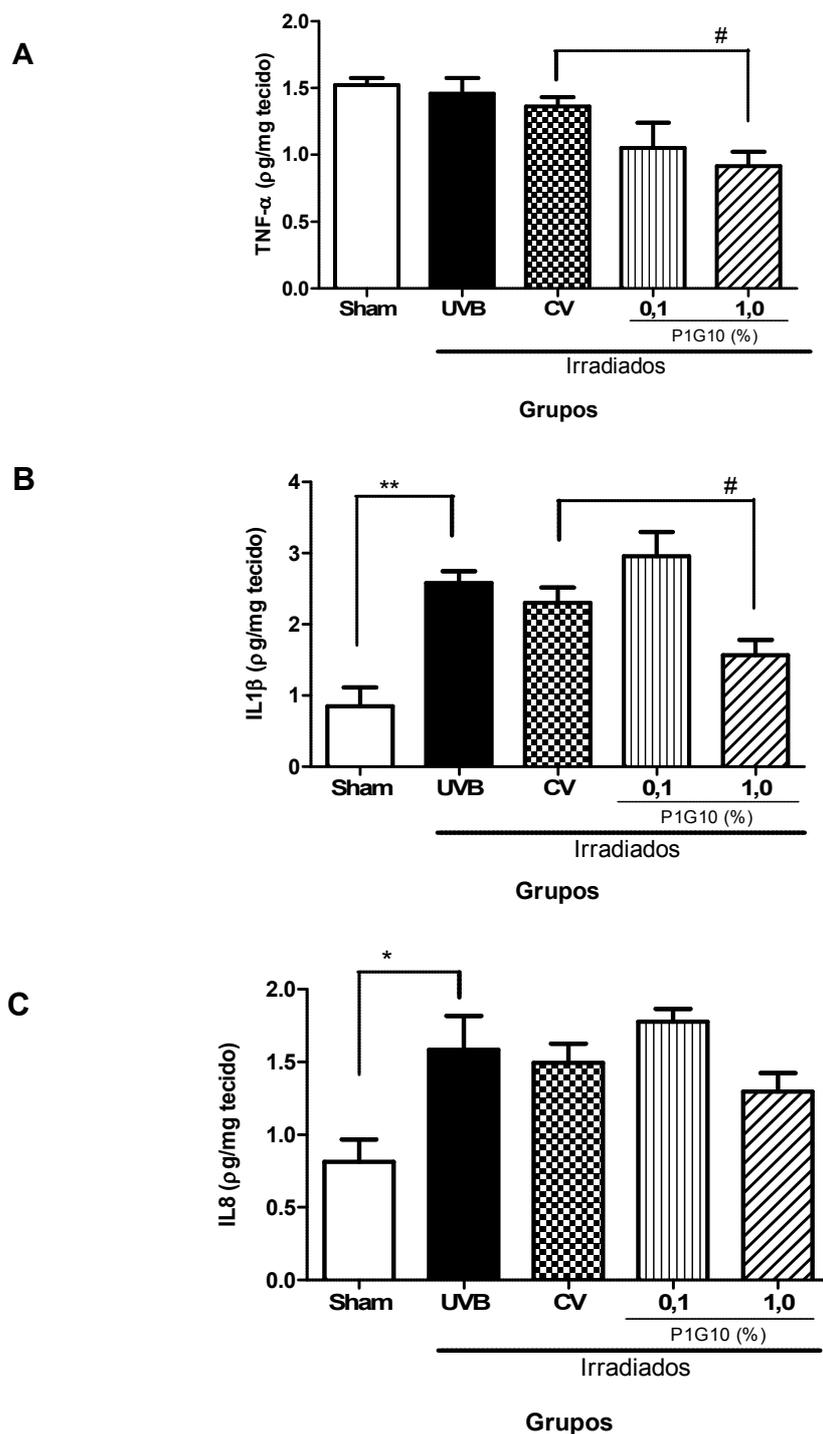


Figura 29 - Efeito de P1G10 sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos *Hairless* após a irradiação com UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos à radiação UVB ($2,4 \text{ J}/\text{cm}^2$) e tratados com gel Natrosol® (CN), P1G10 (0,1 e 1,0%). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e processados para mensuração dos níveis das citocinas TNF- α , IL1 β , IL8 por ELISA. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica a diferença estatística quando comparados com o grupo UVB e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste Newman Keuls).

5.2.1.4 Atividade de Metaloproteinase-9 (MMP-9)

A atividade de MMP-9 foi mensurada por zimografia, como mostra a Figura 30A. Pela análise do gel, verifica-se que a exposição à radiação UVB promoveu um aumento da atividade dessa enzima, evidenciada pela maior densidade da banda de 92 KDa, em relação ao grupo não irradiado (*Sham*). A quantificação densitométrica (Figura 30B) mostrou níveis de atividade de $247,60 \pm 19,40\%$, significativamente, maiores que no grupo *Sham* ($103,20 \pm 10,46 \%$, $p < 0,001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*). Por sua vez, o tratamento com P1G10 0,1% ($125,30 \pm 14,53 \%$) e 1,0% ($146,40 \pm 13,92 \%$) reduziram a atividade de MMP-9 em relação ao grupo CV ($197,00 \pm 6,44$ $p < 0,05$), como também é evidenciado pela menor densidade das bandas de 92 KDa (Figura 30A)

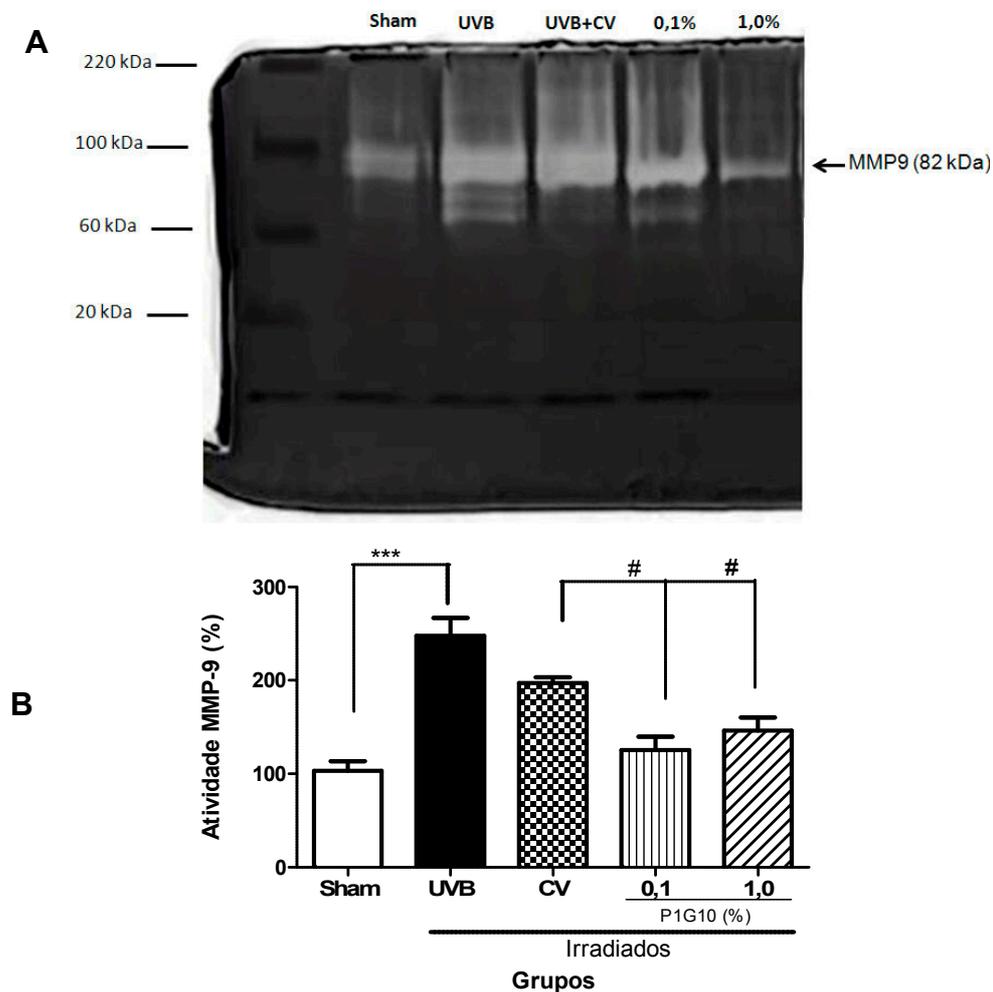


Figura 30- Efeito de P1G10 sobre a atividade de MMP9 em fragmentos de pele após a irradiação com UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4 \text{ J/cm}^2$) e imediatamente tratados com veículo gel Natrosol® (CV), P1G10 (0,1 e 1,0%). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e processados para análise zimográfica da atividade de MMP-9. (A) Zimograma mostrando os halos de atividade de MMP-9 ativa (92 kDa). (B) Atividade de MMP-9, medida por densitometria no programa ImageJ. O gráfico representa a porcentagem da atividade da gelatinase após a irradiação. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%). *** $p < 0,001$ indica a diferença estatística quando comparados com o grupo UVB e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

5.2.1.5 Perfil do sistema oxidante/antioxidante

Para avaliar o efeito de P1G10 sobre o sistema oxidante/antioxidante, foram avaliadas a produção de EROS e de MDA, como medida da lipoperoxidação em

fragmentos de pele. Como mostrado na Figura 31A, a irradiação promoveu um aumento significativo na produção das EROS, em relação aos animais não-irradiados (*Sham*) ($316,20 \pm 63,40$ vs $100,00 \pm 5,91$ %, respectivamente, ANOVA, pós teste *Newman-Keuls*, $p < 0,01$). Em contrapartida, os tratamentos com P1G10 a 0,1% ($162,00 \pm 5,79$ %, $p < 0,01$) ou 1,0% ($130,60 \pm 10,90$ % $p < 0,001$) promoveram uma redução significativa na produção de EROS, em relação ao grupo CV ($339,30 \pm 52,66$ %).

A análise de MDA é mostrada na Figura 31B, onde é evidenciado que a irradiação aumentou significativamente seus níveis, em relação ao grupo *Sham* (UVB - $3,93 \pm 0,51$ vs *Sham* - $0,79 \pm 0,49$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, ANOVA, pós teste *Newman-Keuls* $p < 0,01$). Por sua vez, o tratamento com P1G10 1,0% reduziu significativamente os níveis desse composto, em relação ao grupo CV ($2,02 \pm 0,29$ vs $4,19 \pm 0,39$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, respectivamente, $p < 0,05$).

Com relação à atividade de SOD, observou-se que a irradiação promoveu uma redução significativa da atividade dessa enzima, em relação ao grupo *Sham* ($70,38 \pm 3,30$ % vs $110,00 \pm 8,69$ %, respectivamente, ANOVA, pós teste *Newman-Keuls*, $p < 0,01$). Em contrapartida, o tratamento com P1G10 0,1% impediu a diminuição da atividade de SOD ($112,50 \pm 16,6$ %) quando comparado com o grupo CV ($68,60 \pm 5,25$ %, $p < 0,05$) (FIGURA 32A).

Os níveis de GSH também são depletados pela ação da radiação UVB ($118,20 \pm 7,38$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido), como visto pela comparação com o grupo não lesionado (*Sham* $169,50 \pm 18,12$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, $p < 0,01$) (Figura 32B). O tratamento tópico com P1G10 preveniu a depleção de GSH ($194,20 \pm 14,49$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) em relação ao grupo CV ($120,30 \pm 2,84$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, $p < 0,01$). De maneira semelhante, a UVB promoveu a redução da atividade da enzima GPx ($31,69 \pm 5,85$ vs $63,02 \pm 6,59$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido *Sham*, $p < 0,05$) (Figura 32C), porém apenas o tratamento com P1G10 1,0% foi capaz de inibir significativamente a redução dos níveis dessa enzima pela radiação ($65,13 \pm 8,73$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, $p < 0,05$) em relação ao grupo CV ($29,18 \pm 5,79$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido).

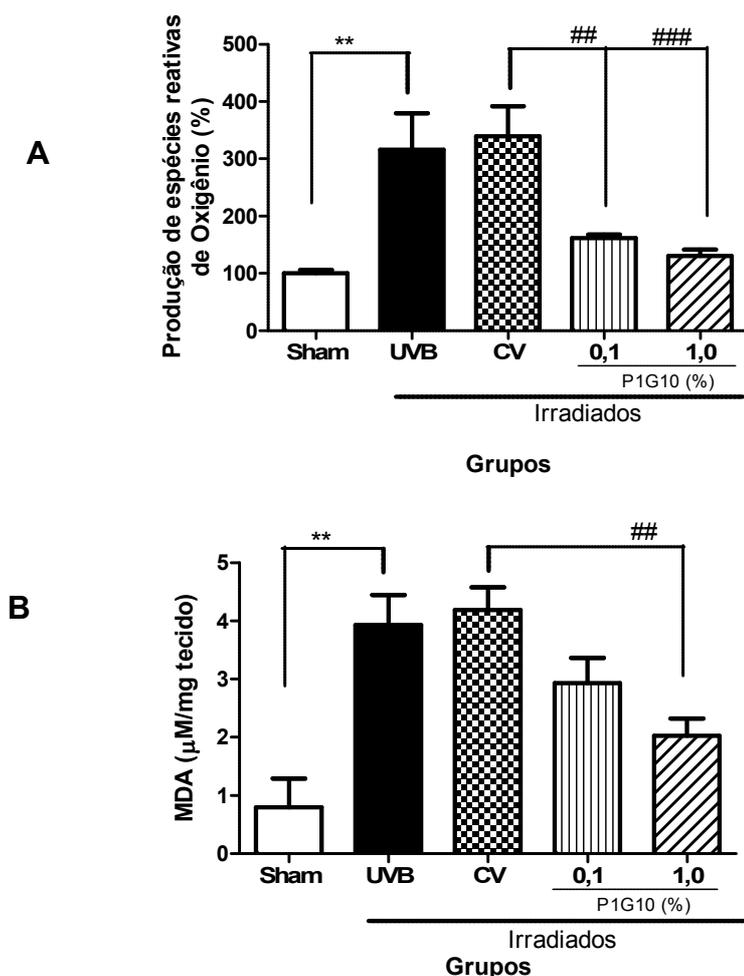


Figura 31- Efeito de P1G10 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e produtos de lipoperoxidação na pele de animais irradiados com UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos à radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) e imediatamente tratados com veículo gel Natrosol® (CV) ou P1G10 (0,1 e 1,0%). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram coletados para análises. A) Produção de EROS. B) Peroxidação lipídica (MDA). Os resultados obtidos são apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (% e $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, respectivamente), ** $p < 0,01$ indica a diferença estatística quando comparados com o grupo UVB e ### $p < 0,001$ e ## $p < 0,01$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

A Figura 32D mostra o aumento significativo da CAT após a irradiação com UVB ($167,50 \pm 17,33$ vs $78,61 \pm 4,36$ % *Sham* ANOVA, pós teste *Newman-Keuls*, $p < 0,05$). Os tratamentos com P1G10 0,1 ou 1,0% promoveram aumento dos níveis de CAT, mas apenas o tratamento com 1,0 % elevou significativamente os níveis da CAT ($251,90 \pm 26,84$ %) quando comparado com o grupo CV ($149,90 \pm 26,87$ %, $p < 0,05$).

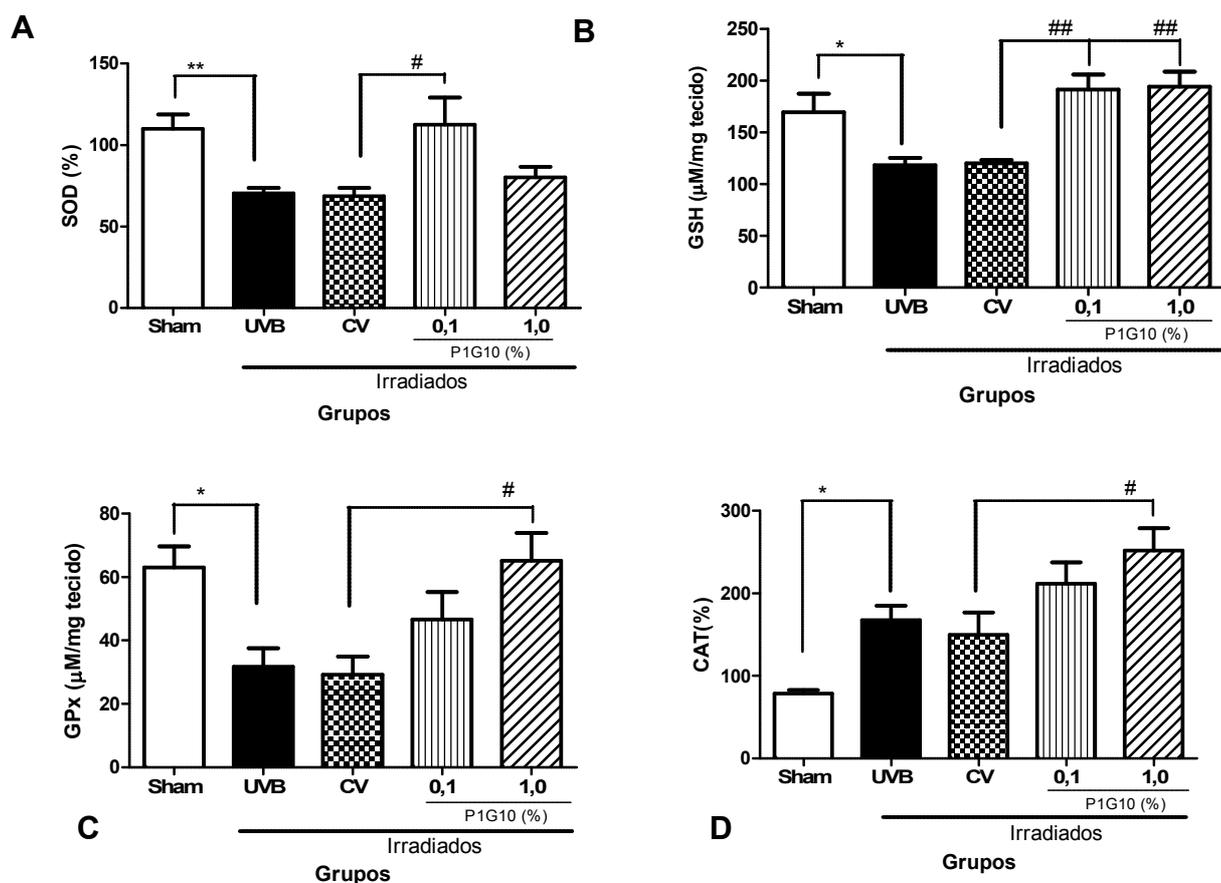


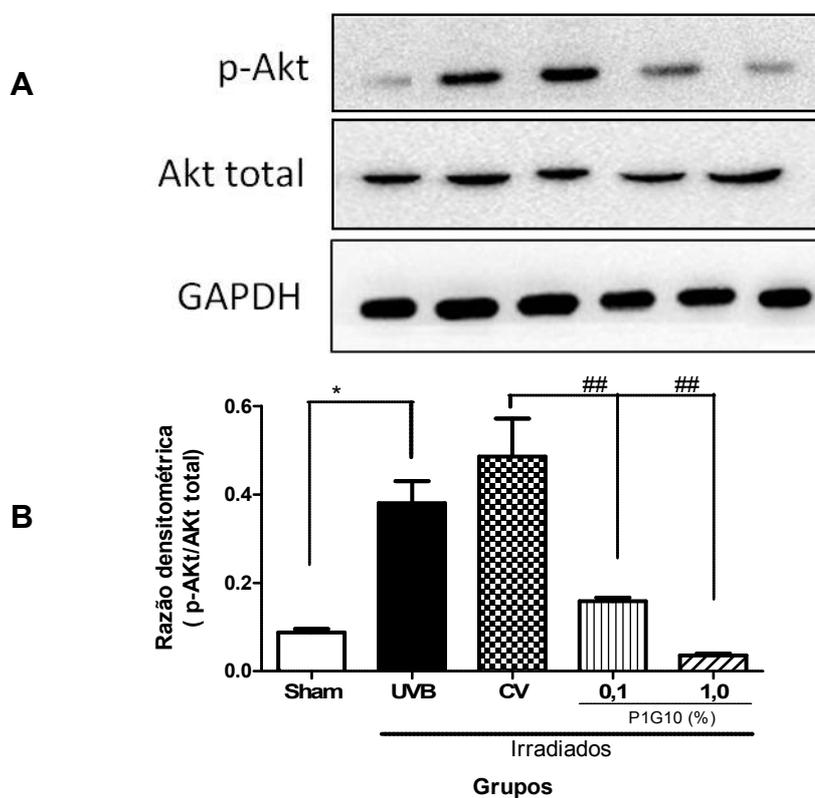
Figura 32 - Efeito de P1G10 sobre enzimas do sistema antioxidante em fragmentos de pele de animais irradiados com UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) e imediatamente tratados com gel Natrosol®, (CN) ou P1G10 (0,1 e 1,0%). Após 24 h, foram eutanasiados e fragmentos de pele foram coletados para análises. A) SOD, B) GSH, C) GPx e D) Catalase. Os resultados obtidos são apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores ($\mu\text{M}/\text{mg}$ para GSH, $\mu\text{M}/\text{mg}$ para GPx e % para SOD e CAT), ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ indica a diferença estatística quando comparados com o grupo UVB e ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

5.2.1.6 Expressão de proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização celular

Com o objetivo de verificar vias de sinalização celular que são alteradas pela radiação e seu comportamento quando do tratamento com P1G10, a expressão e fosforilação das proteínas Akt, p53, caspase 3 e da enzima COX2 foram avaliadas por *Western Blotting*. A análise quantitativa das proteínas fosforiladas foram normalizadas em relação à proteína total.

Proteína Akt

Na Figura 33A e B, verifica-se que a fosforilação da proteína Akt é aumentada significativamente pela exposição à UVB ($0,38 \pm 0,04$), quando comparado com o controle *Sham* ($0,08 \pm 0,00$, $p < 0,05$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*). Por sua vez, o tratamento com P1G10 inibiu a fosforilação de Akt, como mostrado, pela redução significativa da razão densitométrica nos grupos tratados com 0,1% ($0,15 \pm 0,00$) e 1,0% de P1G10 ($0,03 \pm 0,00$, $p < 0,01$), em relação ao grupo CV ($0,48 \pm 0,08$).



.Figura 33 - Efeito de P1G10 sobre a fosforilação de Akt em pele de camundongos *Hairless* expostos à UVB Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) e tratados com gel Natrosol® (CN), ou P1G10 (0,1 e 1,0%). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e processados para análise. (A) Western blotting da forma fosforilada de Akt (pAkt) e Akt total. (B) Análise densitométrica. Foram aplicados $30 \mu\text{g}$ do lisado celular em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting foram desenvolvidos como descrito em SCHLICKEISER & PLEYER (2007). A análise densitométrica foi realizada pelo software ImageQuant e os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), e * $p < 0,05$ indica a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ## $p < 0,01$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*). .

Enzima COX-2

A expressão de COX-2 também foi alterada pela exposição à UVB, como pode ser observado na Figura 34A. A radiação promoveu um aumento significativo da expressão de COX-2 ($0,48 \pm 0,12$) em relação ao *Sham* ($0,05 \pm 0,02$ - $p < 0,01$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*). Por sua vez, o tratamento com P1G10 diminuiu, significativamente, a expressão de COX2 em ambas as concentrações estudadas ($0,06 \pm 0,02$ (0,1%) e $0,08 \pm 0,03$ (1,0%), $p < 0,01$) em relação ao grupo CV ($0,58 \pm 0,09$) (Figura 34B).

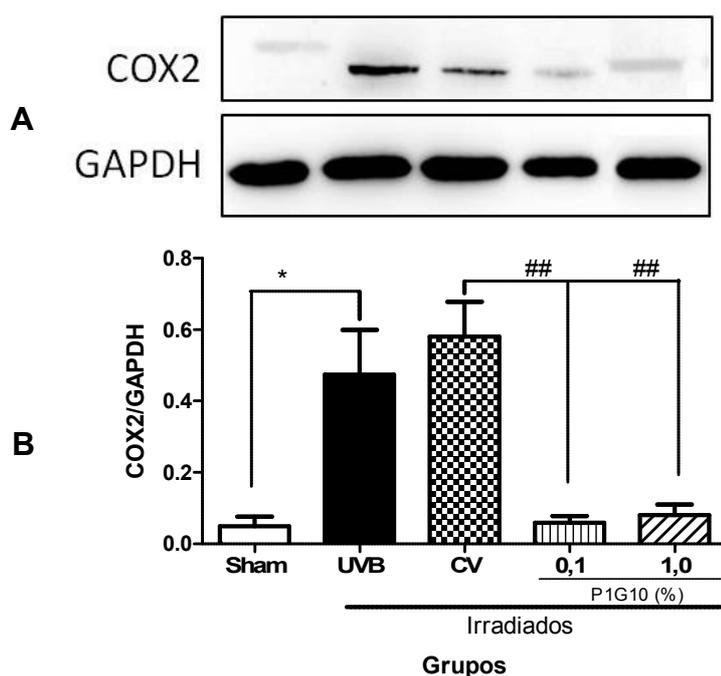


Figura 34 - Efeito de P1G10 sobre a expressão de COX-2 em pele de camundongos *Hairless* expostos à UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4 \text{ J/cm}^2$) e tratados com gel Natrosol® (CN) ou, P1G10 (0,1 e 1,0%). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados. (A) Western blotting para COX-2 e GAPDH. (B) Análise densitométrica. Foram aplicados $30 \mu\text{g}$ do lisado celular em cada canaleta e as eletroforeses e *western blotting* foram desenvolvidos como descrito em SCHLICKEISER & PLEYER (2007). A análise densitométrica foi realizada pelo software ImageQuant e os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), e * $p < 0,05$ indica a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ## $p < 0,01$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

Proteína p53

A exposição da pele à UVB promoveu uma redução, estatisticamente não significativa, da expressão da proteína p53 no grupo UVB comparado com o grupo *Sham* (Figura 35A e B). No entanto, o tratamento com P1G10 1,0% aumentou a

expressão de p53, significativamente ($1,12 \pm 0,16$) em relação ao grupo CV ($0,08 \pm 0,02$ - $p < 0,01$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*).

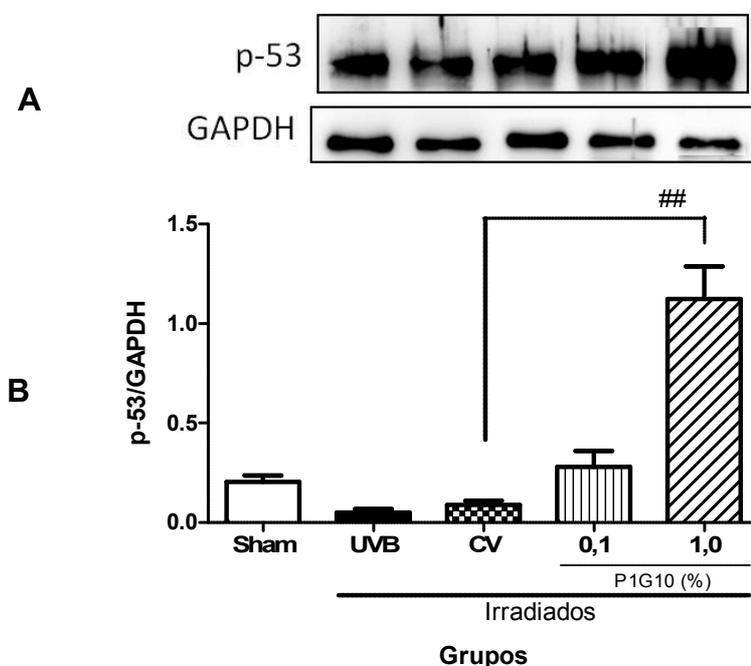


Figura 35 - Efeito de P1G10 sobre a expressão da proteína p53 em pele de camundongos *Hairless* expostos à UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($2,4 \text{ J/cm}^2$) e tratados com gel Natrosol® (CN) ou P1G10 (0,1 e 1,0%). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados. (A) Western blotting para p53 e GAPDH. (B) Análise densitométrica. Foram aplicados $30 \mu\text{g}$ do lisado celular em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting foram desenvolvidos como descrito em SCHLICKEISER & PLEYER (2007). A análise densitométrica foi realizada pelo software ImageQuant e os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), e $^{##}p < 0,01$ indica a diferença estatística quando comparado com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

Caspase 3

Com relação à caspase 3, verificou-se que a irradiação aumentou significativamente a sua expressão ($0,86 \pm 0,04$) em relação ao grupo *Sham* ($0,10 \pm 0,05$, $p < 0,001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*). O tratamento com P1G10 reduziu a expressão da proteína nos grupos 0,1% ($0,60 \pm 0,04$ - $p < 0,05$) e 1,0% ($0,37 \pm 0,01$ - $p < 0,01$) em relação ao grupo CV ($0,8 \pm 0,08$). (Figura 36A e B)

No intuito de confirmar a presença da expressão de caspase 3 em células da epiderme, cortes histológicos dos fragmentos de pele foram marcados com o anticorpo anti-caspase 3 para uma análise imunohistoquímica qualitativa. A Figura 37A mostra uma fotomicrografia representativa da pele do animal não-irradiado (*Sham*), onde nota-se uma discreta marcação de, aproximadamente, 5% dos queratinócitos. A irradiação por UVB induziu uma maior expressão de caspase 3, atingindo aproximadamente 70% dos queratinócitos presentes da epiderme lesada (Figura 37B). Esse perfil também foi observado tanto no grupo que recebeu o veículo (CV) (Figura 37C) como àquele que recebeu 0,1% de P1G10 (Figura 37 D) após a exposição. Confirmando os resultados obtidos pelo *Western blot*, o tratamento com 1,0% P1G10 reduziu a expressão de caspase 3, sendo observada, em torno de, 40% das células imunomarcadas (Figura 37E).

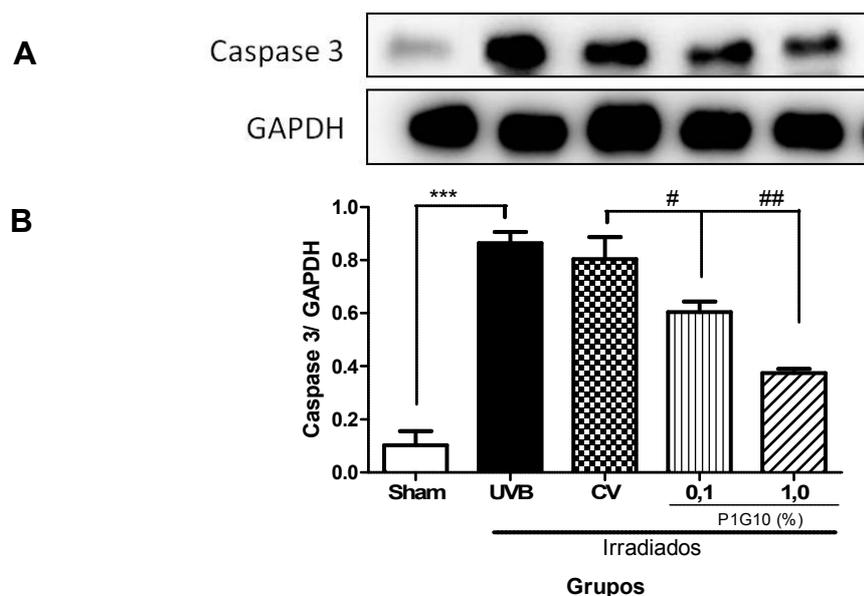


Figura 36 - Efeito de P1G10 sobre a expressão de caspase 3 em pele de camundongos *Hairless* expostos à UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (2,4 J/cm²) e tratados com gel Natrosol®, (CN), P1G10 (0,1 e 1,0%). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados para análise. (A) Western blotting. (B) Análise densitométrica. Foram aplicados 30 µg do lisado celular em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting foram desenvolvidos como descrito em SCHLICKEISER & PLEYER (2007). A análise densitométrica foi realizada pelo software ImageQuant e os resultados obtidos foram apresentados como médias ± erro padrão da média dos valores (%), e ***p<0,001 indica a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ##p<0,01 e #p<0,05 comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

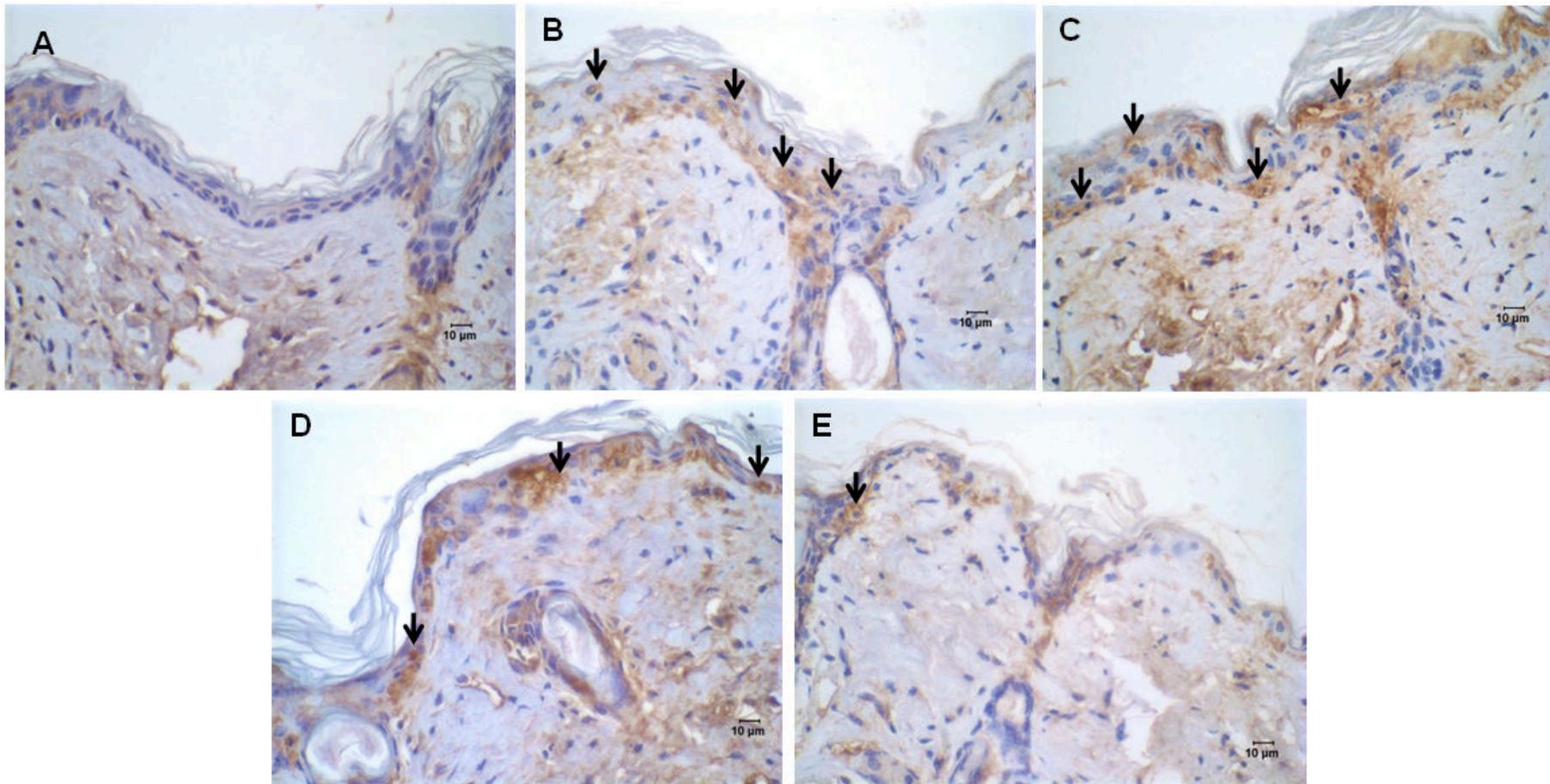


Figura 37 - Fotomicrografias da epiderme dos animais *Hairless*, tratados com P1G10 após à UVB, marcadas com o anticorpo anti-caspase3 Camundongos *Hairless* foram expostos à radiação UVB ($2,4\text{J}/\text{cm}^2$) (B) ou não (A) e tratados com gel Natrosol® (C) (UVB+CV) e P1G10 0,1 (D) e 1,0% (E). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e incluídos em parafina e marcadas com o anticorpo anti-caspase 3. Objetiva de 60x.

5.2.2 Avaliação in vitro

Primeiramente, avaliamos a atividade antioxidante de P1G10 através do ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) e, em seguida, determinamos os níveis ideais de energia da radiação UVB em cultura de células queratinócitos (linhagem *HaCat*). No modelo *in vitro* de exposição de dose única à UVB, verificamos a participação das células queratinócitos (linhagem *HaCat*) na produção de EROs induzidos por UVB e a ação de P1G10 sobre esse efeito.

5.2.2.1 Avaliação da atividade antioxidante da amostra de P1G10

Atividade sequestrante do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH)

A atividade antioxidante de P1G10 foi avaliada pela redução do radical livre DPPH. Na Figura 38 são mostrados os valores em percentual da inibição do radical frente à exposição a P1G10 (6,25 – 100,00 µg/mL), considerando o controle positivo, ácido ascórbico (A. Asc.), como 100% de atividade. A concentração máxima testada da fração (100,00 µg/mL) apresentou 80% da atividade do controle positivo. Por análise de regressão linear, foi determinada a concentração eficaz para sequestrar 50% dos radicais presentes em solução (EC_{50}) como sendo de 20,35 µg/mL.

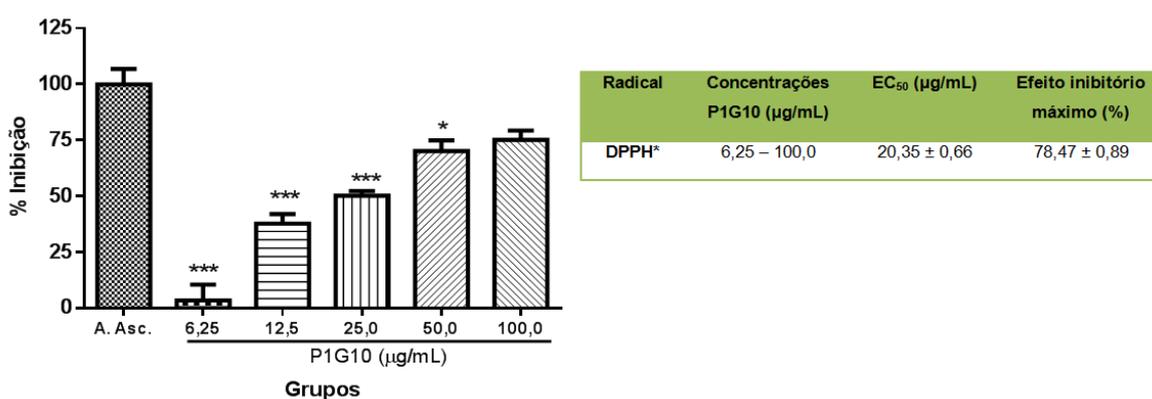


Figura 38 - Efeito da fração P1G10 sobre a atividade sequestrante do radical livre DPPH. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), comparados com o Controle positivo – A.Asc. (** $p < 0,001$ ou $p < 0,05$, ANOVA com pós teste Bonferroni).

5.2.2.2 Avaliação da citotoxicidade da radiação UVB em cultura de queratinócitos

Para avaliar a citotoxicidade da radiação UVB, queratinócitos humanos (*HaCat*) foram submetidas a vários níveis de energia (0 – 100 mJ/cm²) e a viabilidade celular foi

avaliada pelo ensaio de MTT. De acordo com os resultados obtidos, a exposição no tempo 24 h e a energia irradiada acima de 30 mJ/cm² diminui, acentuadamente, a viabilidade dos queratinócitos, portanto, observou-se maior grau de lesão às células (Figura 39). Diante disso, foi determinado para os demais experimentos o uso da dose de energia 30mJ/cm² e o tempo de 24h.

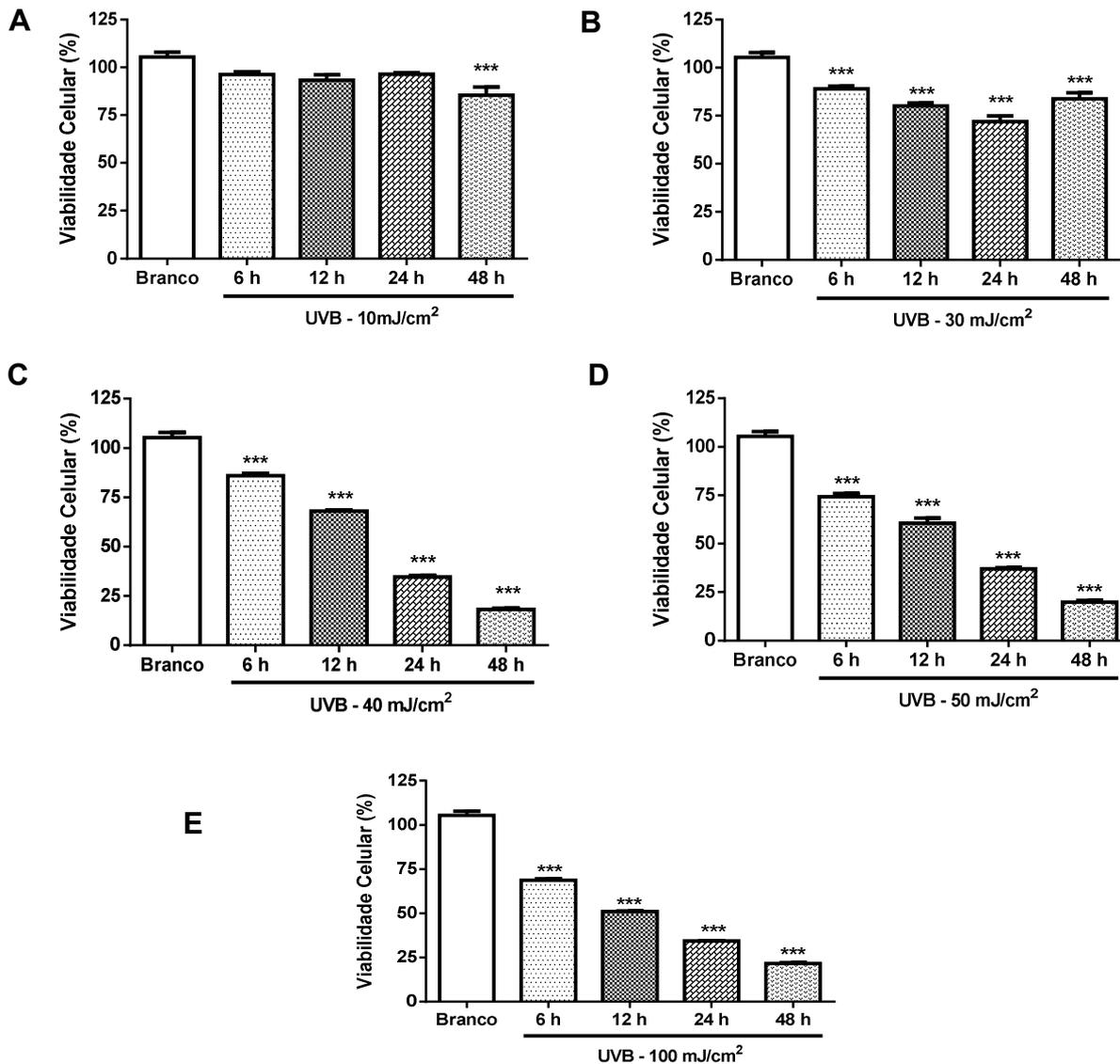


Figura 39 - Avaliação da viabilidade de queratinócitos HaCat após exposição à radiação UVB

Células HaCat (1×10^4 cel/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços e expostas a diferentes níveis de energia UVB (10-100 mJ/cm²) e após 6, 12, 24 e 48 h, a viabilidade celular foi medida pela metabolização do MTT. A) 10mJ/cm²; B) 30mJ/cm²; C) 40mJ/cm²; D) 50mJ/cm² e E) 100mJ/cm². Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), comparados com o grupo não irradiado - Branco (***) $p < 0,001$, ANOVA com pós teste Bonferroni).

5.2.2.3 Avaliação da citotoxicidade de P1G10 em cultura de queratinócitos

Para determinar a concentração de P1G10 a ser utilizada nos ensaios de avaliação de sua atividade antioxidante contra EROs produzidas pela UVB, em cultura de queratinócitos, foi realizado o teste de viabilidade pelo MTT. As concentrações entre 0,1 a 10 ng/mL da protease foram, previamente, determinadas em ensaios realizados pelo grupo de pesquisa e que não apresentaram toxicidade. Após 48 h de tratamento verificou-se que concentrações de P1G10 acima de 40 µg/mL diminuem significativamente a viabilidade celular. A concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC₅₀) foi calculada por regressão linear como 46,83 µg/mL (Figura 40).

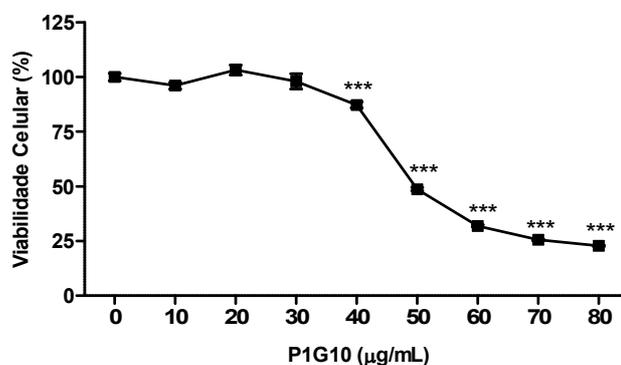


Figura 40 - Viabilidade celular frente ao tratamento com P1G10 através do ensaio MTT. Células *HaCat* foram cultivadas em placas de 96 poços com densidade 1×10^4 células/poço, após a incubação por 24 horas, essas células foram tratadas com P1G10 (10-80 µg/mL) e incubadas por 48 horas. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio MTT à 570nm. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%) comparados com o grupo que não recebeu P1G10 (ANOVA com *pós teste Bonferroni*).

A fim de avaliar um possível efeito protetor de P1G10 contra a toxicidade da radiação UVB, células *HaCat* foram tratadas com a fração (0,1 a 10 ng/mL) e submetidas a radiação de 30 mJ/cm². A viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio de MTT (Figura 41). Os resultados mostram que 10 ng/mL de P1G10 aumentam a viabilidade celular quando comparada ao grupo apenas irradiado ($87,30 \pm 2,46$ vs $71,98 \pm 1,99$ respectivamente, ANOVA *pos teste Newman-Keuls*, $p < 0,05$).

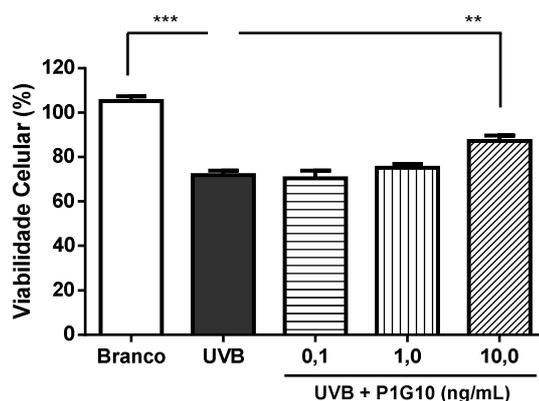


Figura 41 - Avaliação *in vitro* do efeito de P1G10 sobre a viabilidade celular de queratinócitos *HaCat* expostos a radiação UVB. Células *HaCat* foram cultivadas em placas de 96 poços com densidade 1×10^4 células/poço, após a incubação por 24 horas, as células foram lavadas com PBS, expostas (ou não) à radiação UVB ($30\text{mJ}/\text{cm}^2$) e tratadas com P1G10 (0,1-10,0 ng/mL) por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio MTT. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média, comparados com o grupo UVB (** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$, ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

5.2.2.4 Avaliação do efeito de P1G10 na eliminação de EROS intracelular

Para avaliar a eficiência de P1G10 na eliminação de EROS intracelulares, usou-se sondas fluorescentes para determinar os radicais peróxido de hidrogênio (DCFH-DA) e ânion superóxido (DHE), através do citômetro de fluxo, em células *HaCat* expostas à UVB.

A radiação promoveu o aumento significativo da formação intracelular de peróxido de hidrogênio ($100,00 \pm 6,75$ % vs $9,98 \pm 3,43$ Branco, ANOVA pos test Newman-Keuls, $p < 0,05$), ver Figura 42A. O tratamento, com 10 ng/mL de P1G10, reduziu, significativamente, a intensidade de fluorescência DCF quando comparado com o grupo UVB ($69,49 \pm 2,02$ % vs $100,00 \pm 6,75$ %, respectivamente, $p < 0,05$).

Adicionalmente, observou-se que a radiação também promoveu o aumento de ânions superóxidos ($100,00 \pm 12,46$ % vs $53,56 \pm 7,55$ Branco, $p < 0,05$) Figura 42B. No entanto, o tratamento com P1G10 inibiu, significativamente, o aumento intracelular do radical (ANOVA, $p < 0,05$).

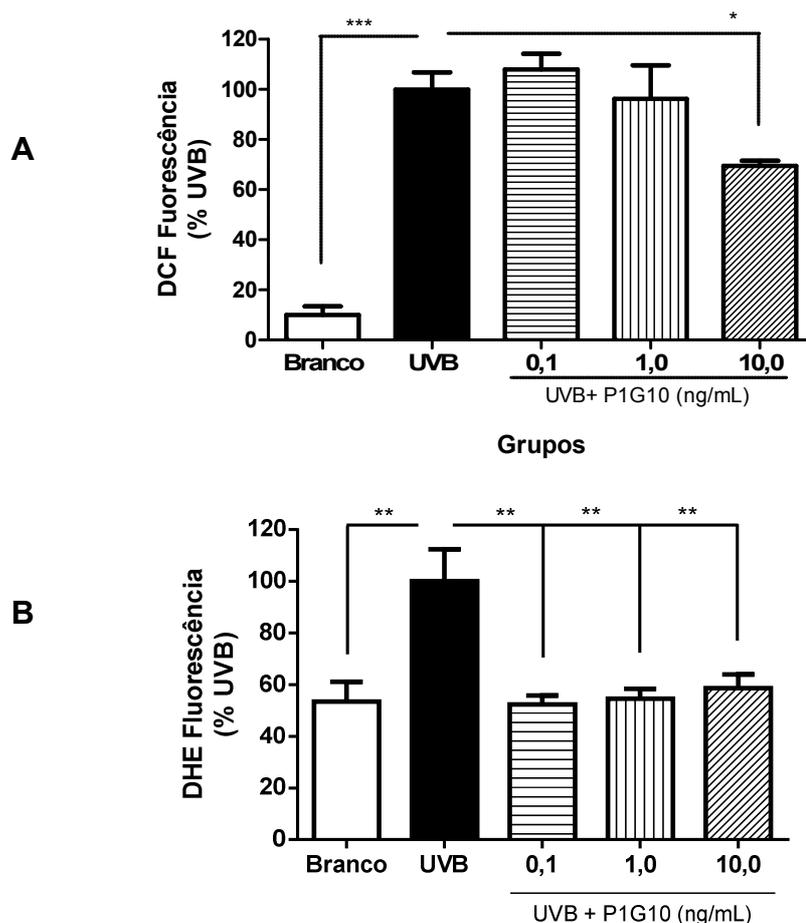


Figura 42 - Efeito de P1G10 na produção de EROS induzidos por radiação

UVB. Células *HaCat* foram semeadas em placas de poliestireno de 24 cavidades (1×10^5 células/cavidade) com meio F12-Ham e DMEM+FBS 10%. Após a incubação por 24 h, essas células foram lavadas com PBS, expostas a irradiação UVB, tratadas com P1G10 (0,1 – 10 ng/mL) e incubadas por 24 h. Após esse período, foram tripsinizadas e ressuspendidas em meio sem fenol e soro com as sondas A) DCFH-DA e B) DHE. A análise foi através do citômetro de fluxo (FACSCAN®, BD), a aquisição dos dados foram através do software CELLQuest™. Os dados foram analisados com auxílio do software Flowjo versão 7.6.5 (TreeStar®). Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), comparados com o grupo UVB (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$, ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

5.3 Avaliação do efeito de P1G10 sobre o modelo *in vivo* de exposição de múltiplas doses

A partir dos resultados obtidos com o tratamento das lesões induzidas por única exposição ao UVB, passamos a avaliação dos efeitos de P1G10 em lesões promovidas por doses múltiplas de UVB através do protocolo descrito por FILIP et al (2011).

5.3.1 Avaliação macroscópica

A análise macroscópica das lesões mostrou que, após 10 dias consecutivos de exposição, a pele dos animais controles (UVB e CV) apresentou-se hiperemiada, áspera e com intensa pigmentação marron claro (Figura 43B e C) comparando com o grupo que não recebeu a irradiação (*Sham* – Figura 43A). Nos animais que receberam o tratamento tópico e diário com P1G10, verificou-se uma menor intensidade dessas alterações, como mostrado na Figura 43D e E.

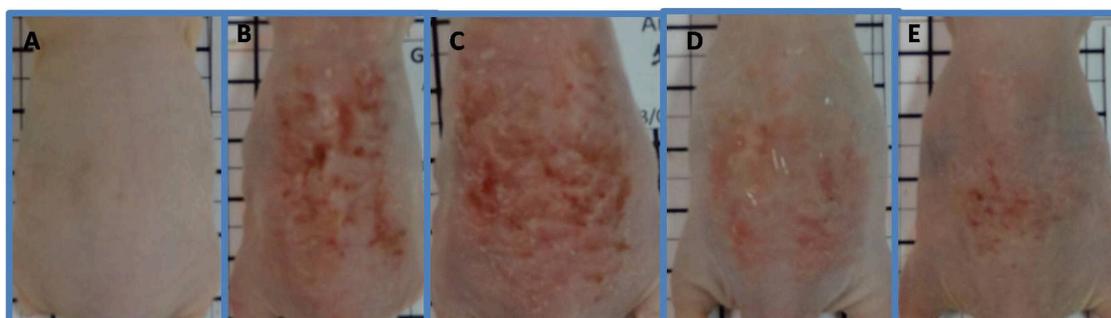


Figura 43 - Efeito de P1G10 sobre peles expostas múltiplas doses de UVB por 10 dias consecutivos.

. (A) *Sham*; (B) UVB; (C) UVB+CV; (D) UVB+ 0,1%P1G10 e (E) UVB+ 1,0% P1G10.

5.3.2 Análise histológica

Na análise histológica da pele do animal que não recebeu irradiação (*Sham*) apresentou perfil histológico normal já descrito, anteriormente, no *item* 2.2.2. Após doses repetidas da radiação, os grupos UVB e Controle Veículo (CV) apresentavam epiderme intensamente espessa com aproximadamente 6 a 7 camadas com células de núcleos volumosos e citoplasmas amplos e eosinofílicos. Em adição, observou-se presença, discreta, de células em apoptose (< 5%), além de um aumento moderado de queratina na camada córnea e lesões erosivas com completa necrose do epitélio (Figuras 44B e C). Em contrapartida, os grupos que receberam P1G10 exibiram discreto aumento da espessura da epiderme, com células de núcleos discretamente volumosos e citoplasmas amplos e eosinofílicos. Além disso, apresentavam discreto número de células em apoptose (aproximadamente 10%). Nesses grupos também, observou-se presença moderada de queratina e raras áreas erosivas na epiderme (Figuras 44D e E).

Na derme superficial a irradiação com doses múltiplas promoveu discreta dispersão das fibras colágenas, sendo observada moderada organização dessas fibras e celularidade, predominantemente fibroblastos, apresentando núcleos volumosos (Figura 45B). Tais alterações também foram observadas no grupo CV (Figura 45C). Já nos grupos tratados com P1G10 não se observou alteração nas fibras colágenas, apenas no grupo 1,0% verificou-se além de células fibroblastos, também a presença de neutrófilos (Figura 45E). Ademais, os animais do grupo UVB e CV apresentaram a derme profunda organizada com grande número de anexos epidérmicos, ausência de dispersão das fibras colágenas, moderada celularidade com presença de células fibroblastos, mononucleares e polimorfonucleares, no entanto, os grupos que receberam P1G10 apresentaram discreto aumento de celularidade (linfócitos e neutrófilos) (Figura 47).

Em seguida, a avaliação da hipoderme, dos grupos UVB e CV, revela discreta infiltração inflamatória, predominantemente, linfocitária e discreta presença de bulbos foliculares. Por outro lado, com tratamento de P1G10, a camada hipoderme apresentou moderada presença de bulbos foliculares, porém sem alteração aparente.

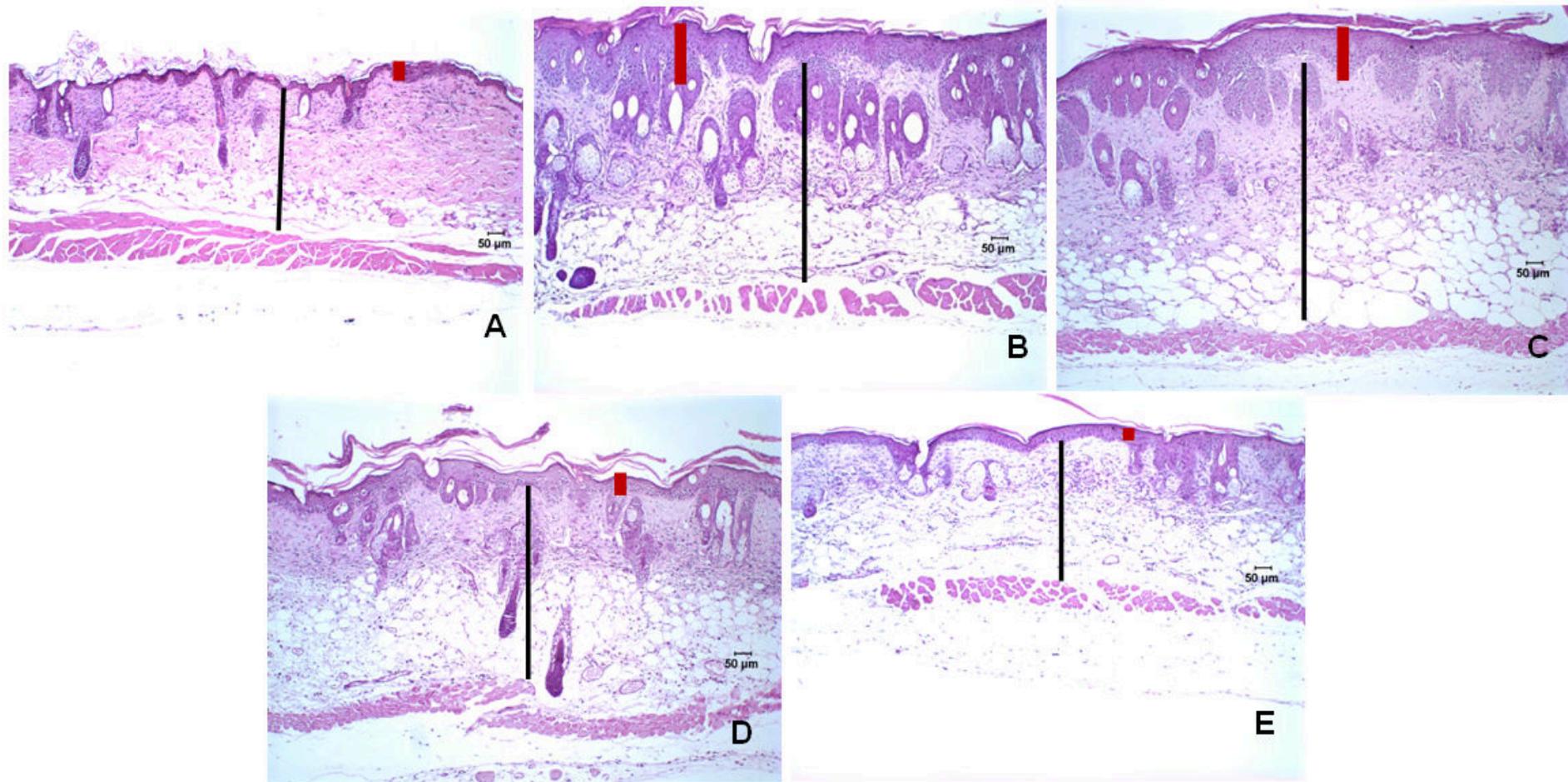


Figura 44 - Fotomicrografias dos fragmentos de pele do dorso dos animais *Hairless* tratados com P1G10 e após doses múltiplas de UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (240 mJ/cm^2) (B) ou não (A) e tratados com gel Natrosol® (C) (UVB+CV) e P1G10 0,1 (D) e 1,0% (E), por 10 dias consecutivos. Após 24 h da última exposição e tratamento, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e incluídos em parafina e corados por HE. Objetiva de 10x. Traço vermelho: indica a espessura da epiderme; Traço preto: indica a espessura Derme/Hipoderme.

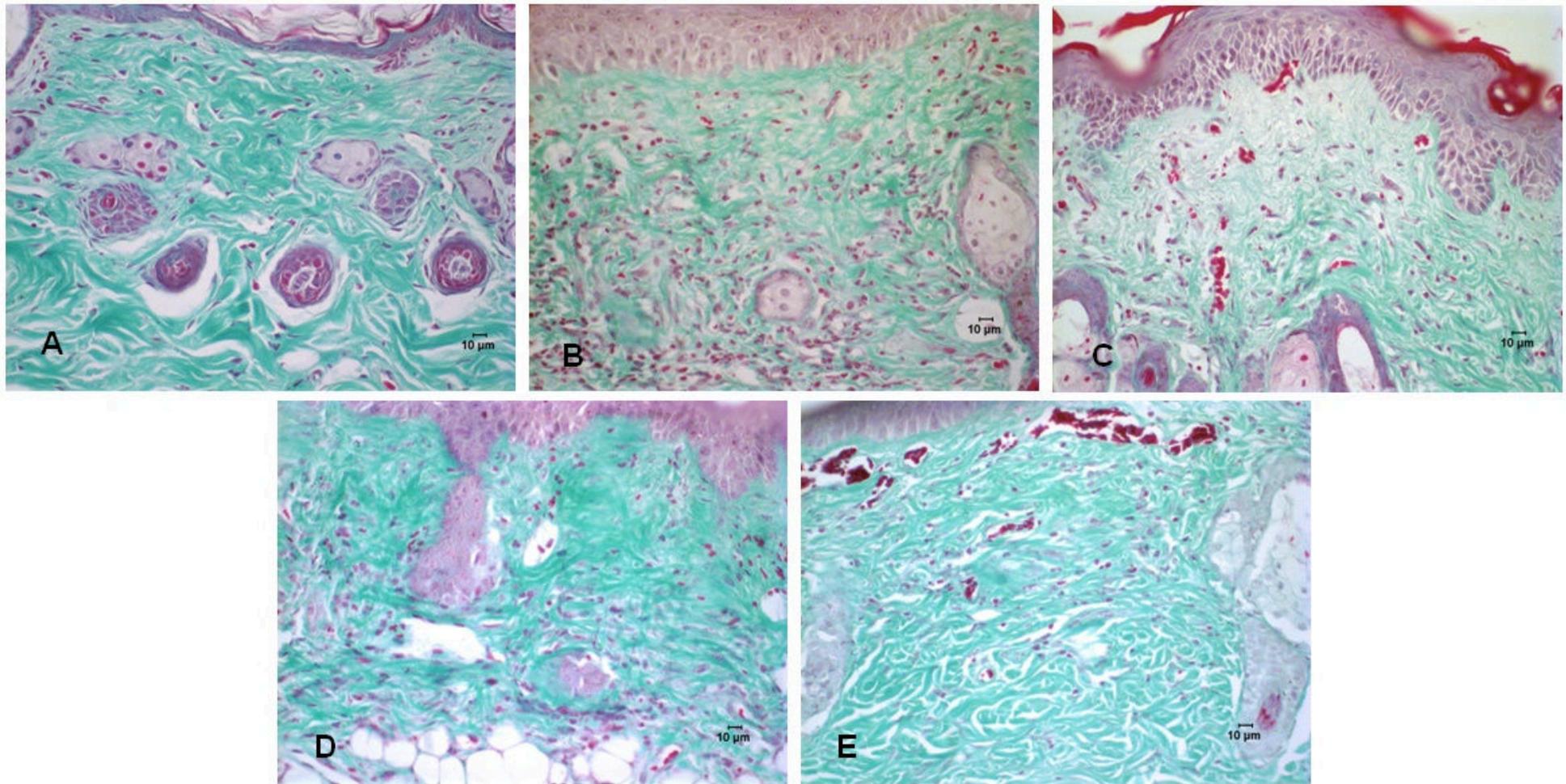


Figura 45 - Fotomicrografias na pele do dorso dos animais *Hairless* tratados com P1G10 por 10 dias consecutivos à UVB e corados com tricrômico de Gomori. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (240 mJ/cm^2) (B) ou não (A) e tratados com veículo gel Natrosol® (C) (UVB+CV) e P1G10 0,1 (D) e 1,0% (E) por 10 dias consecutivos. Após 24 h da última exposição e tratamento, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e incluídos em parafina e corados por tricômio de Gomori. Objetiva de 40x..

Análise morfométrica: Medida da Epiderme e Derme-hipoderme

A exposição à doses múltiplas de UVB promoveu um aumento significativo da espessura da epiderme ($158,40 \pm 16,39 \mu\text{m}$) em relação ao grupo não irradiado, *Sham* ($17,99 \pm 1,17 \mu\text{m}$, $p < 0,001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*) (Figuras 44A e B; Figura 46). Essa alteração apresentada pelo grupo UVB mostra um processo hiperplásico, caracterizado por uma lesão de hiperqueratose paraceratótica. Os grupos tratados com P1G10 0,1% ($87,50 \pm 11,41 \mu\text{m}$) e 1,0% ($64,18 \pm 5,45 \mu\text{m}$) apresentaram a espessura da epiderme reduzida quando comparada com o grupo CV ($171,80 \pm 7,92 \mu\text{m}$, $p < 0,001$) (Figuras 44 C, D e E; Figura 46).

Outra medida morfométrica realizada nesse modelo experimental, foi a medida da espessura Derme-hipoderme (Figuras 44A e B; Figura 46) que após doses múltiplas de UVB apresentou com maior espessura ($409,00 \pm 8,92 \mu\text{m}$) em relação ao *Sham* ($223,80 \pm 33,04 \mu\text{m}$, $p < 0,001$). Pela análise da Derme-hipoderme tratada com P1G10 (Figura 44D e E; Figura 46), observa-se que ambas concentrações foram capazes de reduzir a espessura do tecido (0,1% - $320,20 \pm 19,37 \mu\text{m}$, $p < 0,05$; 1,0% - $82,40 \pm 18,97 \mu\text{m}$, $p < 0,001$) em relação ao grupo CV ($420,80 \pm 30,38 \mu\text{m}$).

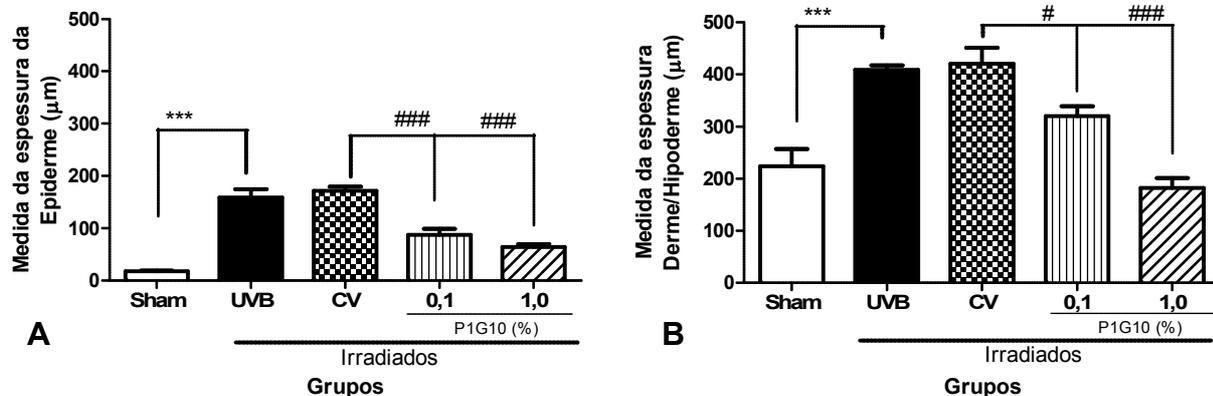


Figura 46 - Medida morfométrica da Epiderme e Derme/hipoderme da pele do dorso dos animais *Hairless* tratados com P1G10 após doses repetidas de UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos à radiação UVB (240 mJ/cm^2) ou não e tratados com gel Natrosol® (UVB+CN) e P1G10 0,1 e 1,0% por 10 dias consecutivos. Após 24 h da última exposição e tratamento, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e incluídos em parafina e corados por HE. Os gráficos apresentam (A) Medida da espessura Epiderme e (B) Medida da espessura Derme-hipoderme dos grupos analisados na imagem real com subsequente criação de uma imagem binária e posterior processamento digital. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (μM), *** $p < 0,001$ indica a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ### $p < 0,001$ e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*). Aumento de 10x..

Análise morfométrica: Medida da celularidade

Verificamos, morfometricamente, a celularidade da camada hipoderme, através da técnica de coloração HE. No presente modelo ocorreu um aumento, significativo, da celularidade após a irradiação ($131,80 \pm 16,80$ núcleos/campo) ao comparar com o grupo *Sham* ($43,80 \pm 10,93$ núcleos/campo, $p < 0,01$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*), ver Figuras 47A, B e F. Esse perfil foi alterado na presença do tratamento com P1G10, uma vez que se observou uma redução da celularidade, sendo significativa nos grupos 0,1% ($106,30 \pm 19,57$ núcleos/campo, $p < 0,05$) e 1,0 % P1G10 ($61,26 \pm 8,50$ núcleos/campo, $p < 0,001$) em relação ao grupo CV ($157,10 \pm 16,80$ núcleos/campo) (Figuras 47C, D, E e F).

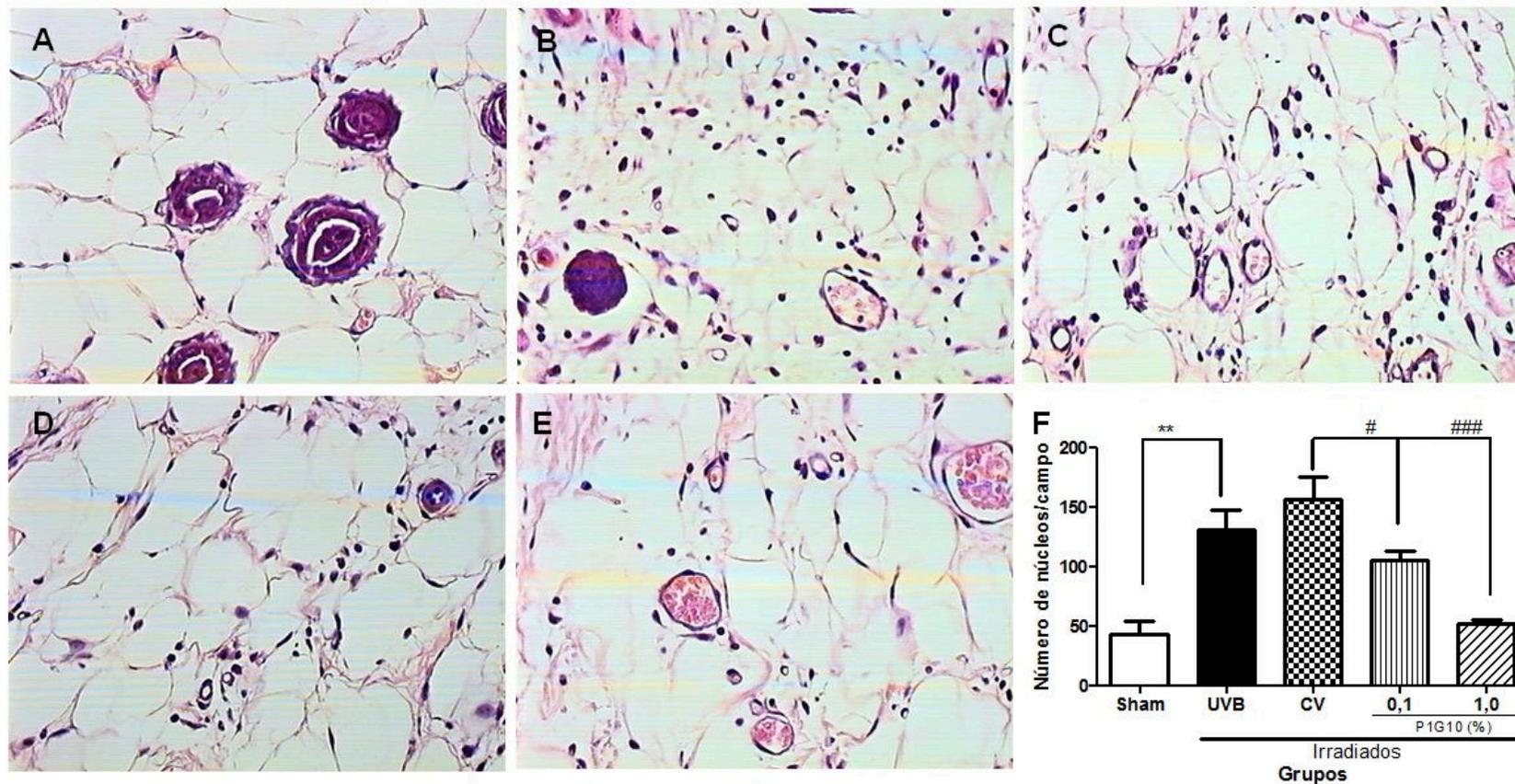


Figura 47 - Análise morfométrica da celularidade da hipoderme na pele do dorso dos animais *Hairless* tratados com P1G10 após doses múltiplas de UVB Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (240 mJ/cm^2) (B) ou não (A) e tratados com veículo gel Natrosol® (C) (UVB+CV) e P1G10 0,1 (D) e 1,0% (E), após 24 horas os animais foram sacrificados e fragmentos de pele foram retirados e incluídos em parafina e corados por HE. F) O gráfico apresenta o resultado da quantificação dos núcleos na hipoderme na imagem real com subsequente criação de uma imagem binária e posterior processamento digital. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (μM), ** $p < 0,01$ indica a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ### $p < 0,001$ e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*). Objetiva de 100x.

Análise imunohistoquímica da expressão de PCNA

Para avaliar o efeito da fração P1G10 sobre a proliferação celular *in vivo*, cortes dos fragmentos de pele irradiados, ou não, foram marcados com o anticorpo anti-PCNA, um marcador de proliferação celular. A Figura 48B mostra que a irradiação por UVB induziu um aumento do número de células imunomarcadas para PCNA quando comparado com o grupo *Sham* ($31,33 \pm 3,13$ % vs $12,00 \pm 4,43$ %, respectivamente, $p < 0,001$ - ANOVA, pós-teste *Student-Newman-Keuls*) (Figura 48F). O tratamento com P1G10 0,1% ($14,17 \pm 0,95$ %) e 1,0% ($11,50 \pm 1,57$ %) reduziram o número de células imunomarcadas em relação ao grupo CV ($28,17 \pm 1,38$ %, $p < 0,001$), ver Figuras 48 C, D e E.

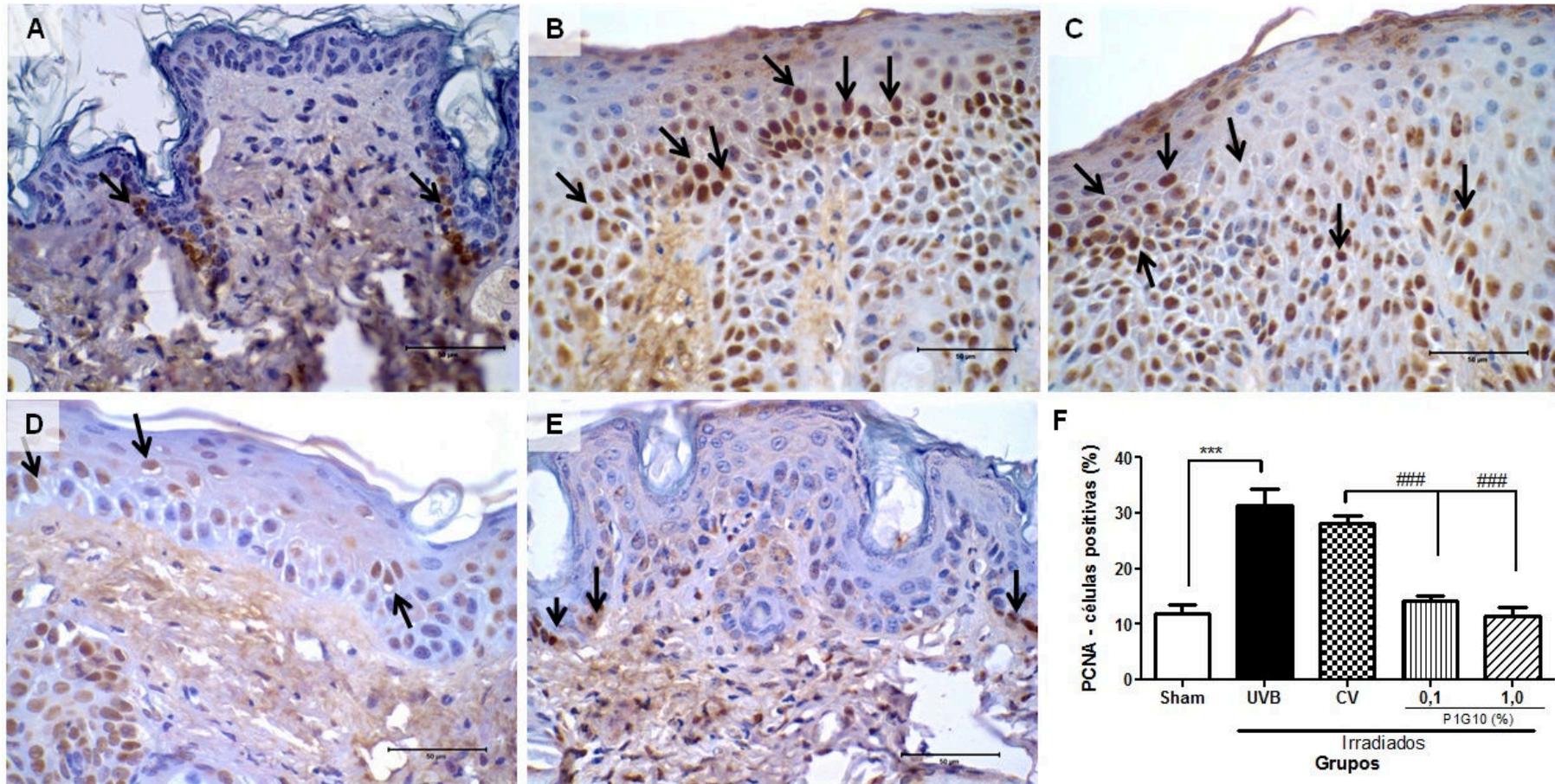


Figura 48 - Fotomicrografias da epiderme dos animais *Hairless*, tratados com P1G10 após doses repetidas à UVB, marcadas com o anticorpo anti-PCNA. Camundongos *Hairless* foram expostos à radiação UVB (24J/cm²) (B) ou não (A) e tratados com gel Natrosol® (C) (UVB+CV) e P1G10 0,1 (D) e 1,0% (E). Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados e incluídos em parafina e marcadas com o anticorpo anti-PCNA. F) O gráfico apresenta a porcentagem do número de células imunomarcadas em relação ao número total de células por campo. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), *** $p < 0,001$ indica a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ### $p < 0,001$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*). Objetiva de 60x.

5.3.3 Avaliação de parâmetros inflamatórios

A Figura 49A exibe o resultado da análise dos níveis da citocina TNF- α após a exposição à doses múltiplas de UVB. A irradiação aumenta, significativamente, os níveis de TNF- α ($7,28 \pm 1,03$ μg /mg tecido) em relação ao grupo *Sham* ($3,75 \pm 0,81$ μg /mg tecido, $p < 0,01$, ANOVA, pós teste *Newman-Keuls*). Esse perfil é revertido na presença de P1G10, ou seja, observou-se redução dos níveis dessa citocina tanto para 0,1% ($3,92 \pm 0,39$ μg /mg tecido, $p < 0,05$) quanto 1,0% P1G10 ($2,00 \pm 0,57$ μg /mg tecido, $p < 0,01$) em relação ao grupo CV ($7,39 \pm 1,45$).

Resultado similar foi observado na dosagem de IL-1 β , onde a a exposição de múltiplas de UVB, estimulou a síntese de IL-1 β ($44,98 \pm 12,44$ μg /mg tecido) em relação ao grupo *Sham* ($1,37 \pm 0,07$ μg /mg tecido, $p < 0,01$) (Figura 49B). No entanto, os grupos tratados com P1G10 mantiveram reduzidos, significativamente, os níveis de IL-1 β , tanto em 0,1% ($3,85 \pm 1,03$ μg /mg tecido, $p < 0,01$) quanto em 1,0% P1G10 ($5,2 \pm 1,05$ μg /mg tecido, $p < 0,01$) em relação ao grupo CV ($43,00 \pm 10,47$ μg /mg tecido) .

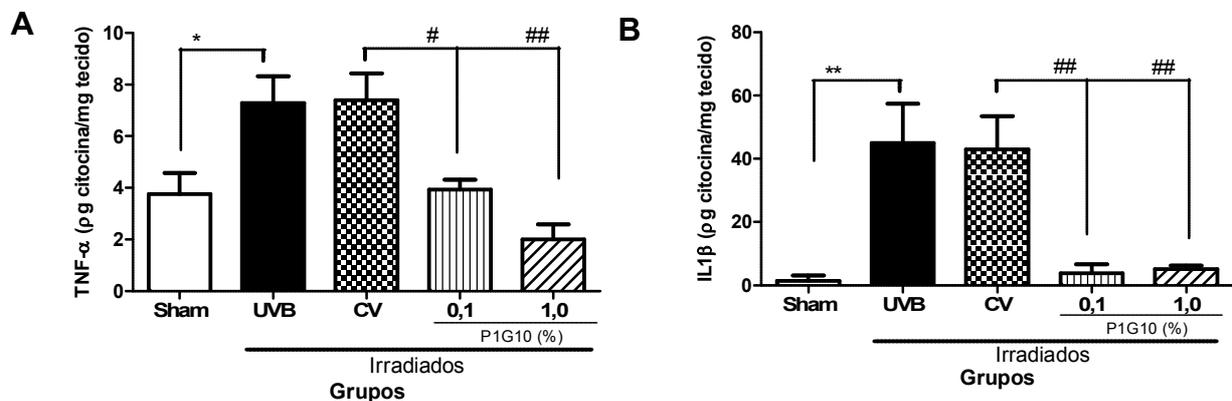


Figura 49 - Efeito de P1G10 sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos *Hairless* após múltiplas doses de UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($240 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) e tratados com veículo gel Natrosol® (CV), P1G10 (0,1 e 1,0%), por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados e fragmentos de pele foram retirados para dosagem dos níveis das citocinas (A) TNF- α e (B) IL1 β por ELISA. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido), e ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ indicam a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

5.3.4 Atividade de Metaloproteinase-9 (MMP-9)

Conforme a Figura 50, a irradiação UVB aumentou a ativação de pro-MMP9 ($100,00 \pm 14,88 \%$, $p < 0,001$) como da sua forma ativa MMP-9 ($120,50 \pm 25,88 \%$, $p < 0,01$) em relação ao *Sham* ($8,79 \pm 2,38 \%$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*). Todavia, o tratamento com P1G10 reduziu a atividade da forma latente de MMP-9 (Figura 50B), sendo 0,1% apresentando valores 1,8 vezes menor ($50,40 \pm 8,60 \%$) e 1,0% P1G10 1,5 vezes menor ($61,91 \pm 8,88$) em relação ao grupo CV ($91,15 \pm 8,24 \%$, $p < 0,05$). Nesse sentido, ao avaliar a participação da fração proteolítica na inibição de MMP-9, na sua forma ativa (Figura 50C), o tratamento reduziu atividade da enzima, sendo a concentração de 1,0% apresentou valores significativos ($40,24 \pm 8,30 \%$, $p < 0,05$) em relação ao grupo CV ($141,4 \pm 27,72 \%$).

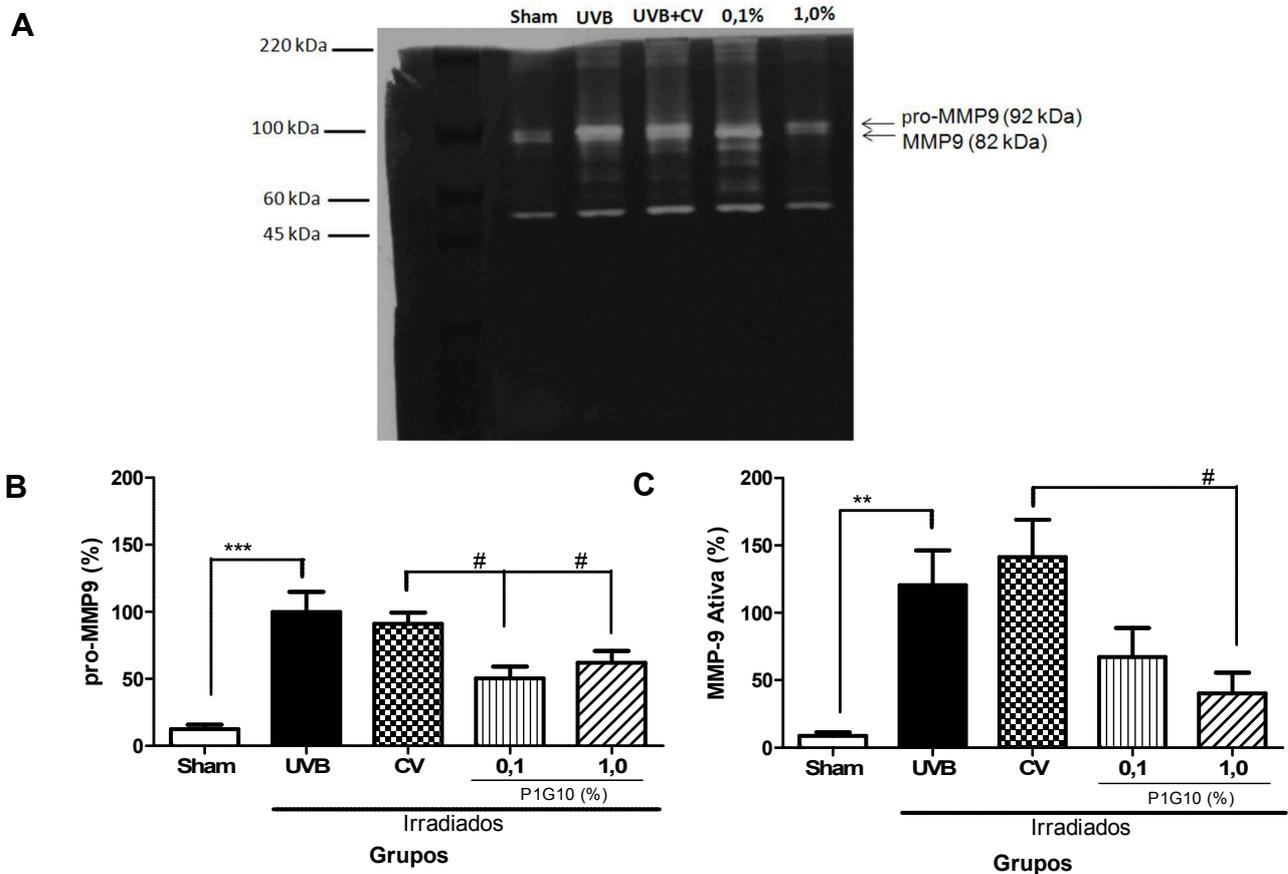


Figura 50 - Efeito de P1G10 sobre a atividade de MMP9 em fragmentos de pele após múltiplas doses de UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (240 mJ/cm²) e tratados com veículo gel Natrosol®, (CV), P1G10 (0,1 e 1,0%) por 10 Dias consecutivos. Os animais foram eutanaziados e fragmentos de pele foram retirados para a determinação da atividade de MMP-9 por zimografia. A) Zimograma mostrando os halos de atividade de pro-MMP-9 e MMP-9 (92 kDa e 82 kDa, respectivamente). B) Atividade de pro-MMP-9 e C) Atividade de MMP-9 medida por densitometria no programa ImageQuant®. O gráfico representa a porcentagem da atividade da gelatinase após a irradiação. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), e *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ indicam a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

5.3.5 Perfil do sistema oxidante/antioxidante

Assim como realizado para o esquema de dose única, o dano oxidativo foi avaliado através das mensurações nos fragmentos de pele da produção de EROS e de MDA. Como esperado, a exposição à múltiplas doses de UVB aumentou os níveis de EROS (147,20 \pm 9,51 %) em relação ao *Sham* (87,49 \pm 13,21 %, ANOVA, pós teste *Newman-Keuls*, $p < 0,01$) e foi observada uma redução desses valores nos

animais tratados com P1G10 nas concentrações de 0,1% ($85,45 \pm 12,38 \%$) e 1,0% ($74,32 \pm 8,24 \%$) em relação ao grupo CV ($139,10 \pm 12,69 \%$, $p < 0,01$) (Figura 51A)

Os níveis de MDA se mostraram elevados, significativamente, após as doses múltiplas de UVB ($0,60 \pm 0,09 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) em relação ao grupo *Sham* ($0,13 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, $p < 0,05$), entretanto, o tratamento com P1G10 não alterou esse parâmetro (Figura 51B).

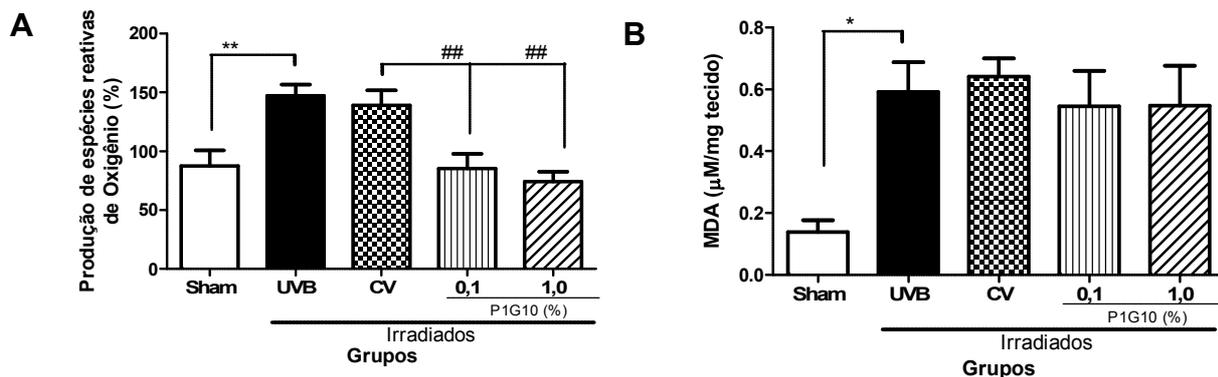


Figura 51 - Efeito de P1G10 no estresse oxidativo em fragmentos de pele, após múltiplas doses de UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($240 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) e tratados com veículo gel Natrosol®, (CV), P1G10 (0,1 e 1,0%) diariamente por 10 dias consecutivos. Após 24 h da última exposição e tratamento, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados para as análises. A) Produção de EROS. B) Peroxidação lipídica (MDA). Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (% e $\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, respectivamente), e $**p < 0,01$ e $*p < 0,05$ indicam a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e $##p < 0,01$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

Com relação a atividade da SOD, não se observou alterações significativas nos grupos UVB e CV em relação ao grupo *Sham* (ANOVA, pós teste *Newman-Keuls*, $p > 0,05$). Em adição, em ambos os grupos tratados com a fração proteolítica, também, não foram observadas alterações na atividade dessa enzima (Figura 52A).

No entanto, a UVB promoveu o aumento dos níveis de GSH ($298,10 \pm 26,41 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) comparativamente ao *Sham* ($141,10 \pm 37,03 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, $p < 0,05$) (Figura 52B). Os animais tratados com as concentrações de P1G10 permaneceram inalterados os níveis da proteína ($249,40 \pm 22,44 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, $p > 0,05$) em relação ao grupo CV ($286,50 \pm 34,97 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido). Por outro lado, UVB reduziu, significativamente, a atividade GPx ($77,64 \pm 10,50 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) em relação ao *Sham* ($127,40 \pm 5,15 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, $p < 0,01$). A análise dos grupos tratados, mostraram que os níveis de GPx permaneceram altos em ambas concentrações de

P1G10, tanto em 0,1% ($127,70 \pm 11,26 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, $p < 0,01$), quanto 1,0% ($146,90 \pm 11,63 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido, $p < 0,001$) em relação ao grupo CV ($80,40 \pm 7,19 \mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) (Figura 52C).

Além disso, verificou-se que doses repetidas da radiação, também, ativam a enzima catalase, ou seja, observou-se um aumento da sua atividade ($175,8\% \pm 12,04$) em relação ao grupo *Sham* ($75,46 \pm 14,3 \%$, $p < 0,05$) (Figura 52D). O tratamento tópico com P1G10 obteve um acréscimo no aumento da atividade da catalase nas concentrações de 0,1% ($246,80 \pm 21,75 \%$, $p < 0,05$) e 1,0% P1G10 ($265,30 \pm 34,79 \%$, $p < 0,05$) em relação ao grupo CV ($163,60 \pm 23,22 \%$).

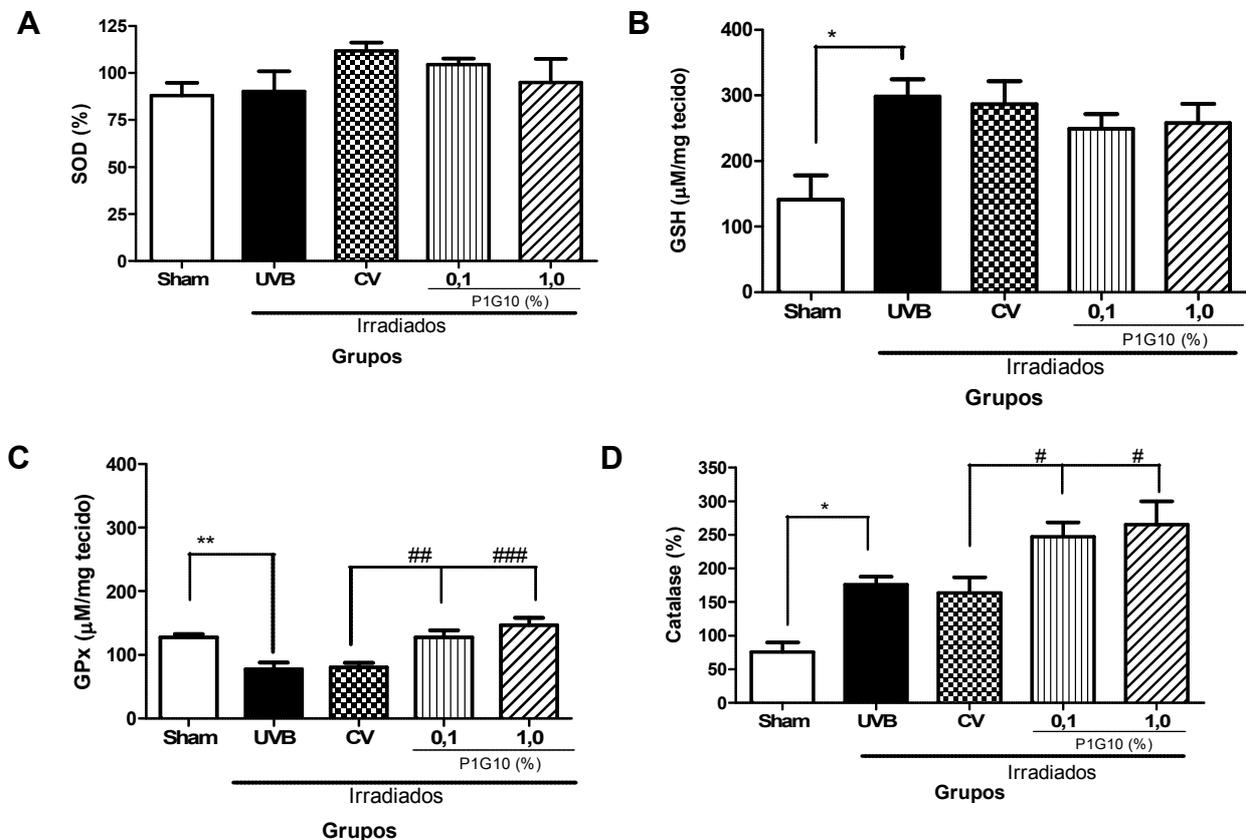


Figura 52 - Efeito de P1G10 no sistema antioxidante em fragmentos de pele, após doses múltiplas de UVB e tratados com P1G10 por 10 dias consecutivos. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (240 mJ/cm²) e tratados com veículo gel Natrosol® (CV), P1G10 (0,1 e 1,0%) por 10 dias consecutivos. Após 24 h da última exposição e tratamento, os animais foram eutanaziados e fragmentos de pele foram retirados para análises. A) SOD, B) GSH, C) GPx e D) Catalase. Os resultados obtidos foram apresentados como médias ± erro padrão da média dos valores (µM/mg para GSH, µM/mg para GPx e % para SOD e CAT), e **p<0,01 e *p<0,05 indicam a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ####p<0,001, ##p<0,01 e #p<0,05 comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste Newman Keuls).

5.3.6 Expressão de proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização celular

Proteínas p38 e JNK MAP quinases

Para avaliar a participação da via das MAP quinases nos efeitos mediados por P1G10 foi realizada a quantificação da fosforilação de p38 e JNK MAP quinases. A análise quantitativa da proteína fosforilada foi normalizada em relação a proteína total

Na Figura 53, é possível verificar que a exposição a UVB aumentou significativamente os níveis de fosforilação de p38 MAP quinase ($4,98 \pm 0,80$) ao comparar com o grupo *Sham* ($1,67 \pm 0,17$ $p < 0,05$ - ANOVA seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*). O tratamento com P1G10 reduziu a fosforilação de p38 e foi estatisticamente significativa no grupo que recebeu 1,0% ($1,88 \pm 0,09$, $p < 0,05$) em relação ao grupo CV ($5,16 \pm 1,19$).

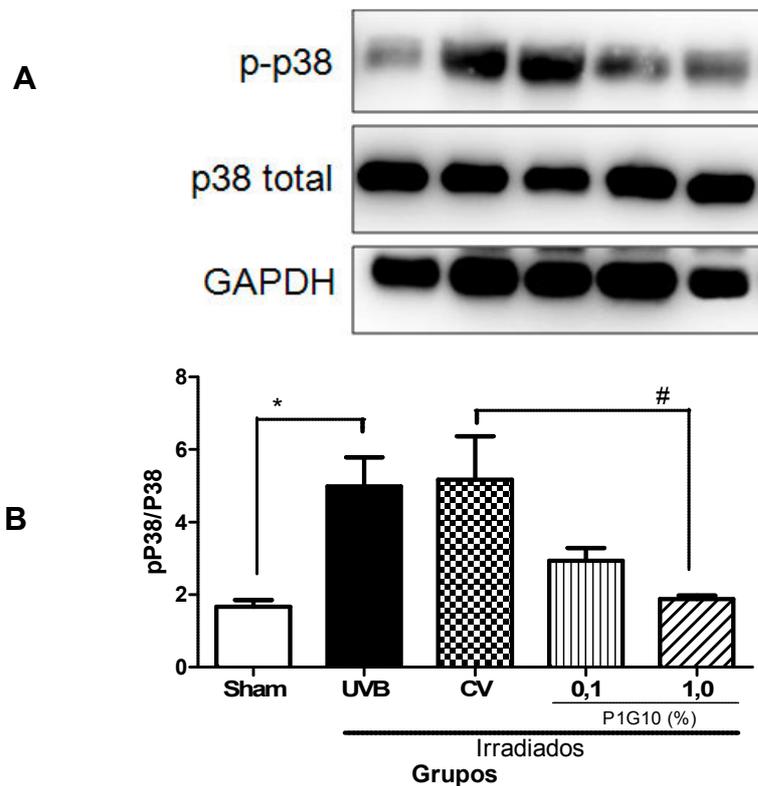


Figura 53 - Efeito de P1G10 sobre a fosforilação de p38 MAPK em pele de camundongos *Hairless* expostos à doses repetidas de UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB (240 mJ/cm^2) e tratados com veículo gel Natrosol®, (CV), P1G10 (0,1 e 1,0%) por 10 dias consecutivos. Após 24h da última exposição e tratamento, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados para análise. (A) Western blotting. (B) Análise densitométrica. Foram aplicados $30 \mu\text{g}$ do lisado celular em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting foram desenvolvidos como descrito em SCHLICKEISER & PLEYER (2007). A análise densitométrica foi realizada pelo software ImageQuant e os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (razão pP38/P38), * $p < 0,05$ indicam a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*)...

Além de p38, a fosforilação de JNK MAP quinase também foi alterada pela exposição repetida à radiação UVB. Na Figura 54, verifica-se que no grupo UVB, os

níveis de pJNK foram significativamente maiores em relação ao *Sham* ($0,87 \pm 0,07$ vs $0,22 \pm 0,05$, $p < 0,001$, respectivamente). O tratamento tópico com P1G10 diminuiu a fosforilação da proteína JNK tanto na concentração de 0,1% ($0,49 \pm 0,05$, $p < 0,01$), quanto de 1,0% P1G10 ($0,46 \pm 0,05$, $p < 0,01$) em relação ao grupo CV ($0,18 \pm 0,09$).

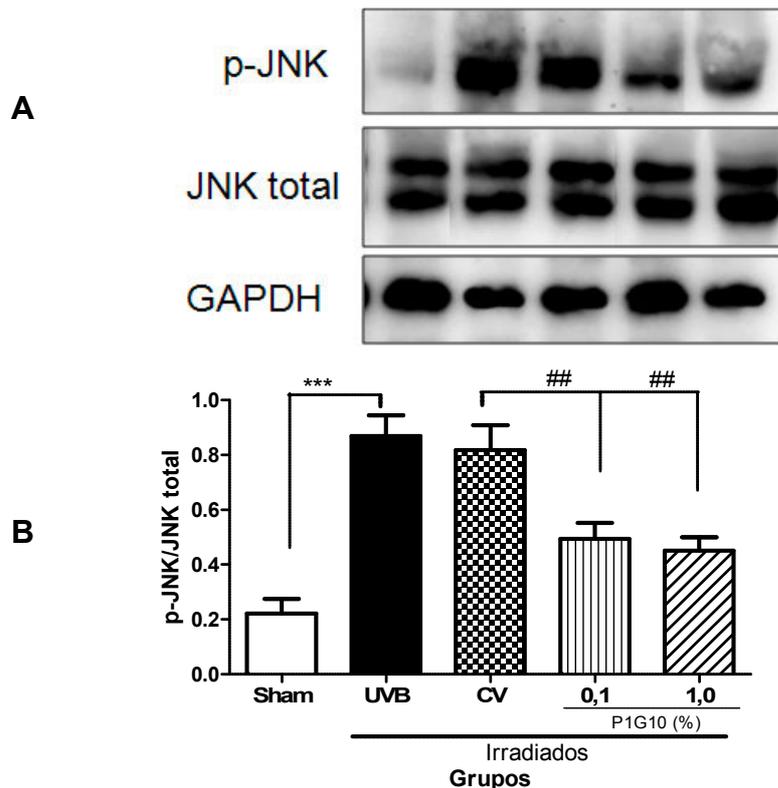


Figura 54 - Efeito de P1G10 sobre a fosforilação de JNK em pele de camundongos *Hairless* expostos à doses repetidas de UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos à radiação UVB (240 mJ/cm^2) e tratados com veículo gel Natrosol®, (CV), P1G10 (0,1 e 1,0%), por 10 dias consecutivos. Após 24 h da última exposição e tratamento, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados. (A) Western blotting. (B) Análise densitométrica. Foram aplicados $30 \mu\text{g}$ do lisado celular em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting foram desenvolvidos como descrito em SCHLICKEISER & PLEYER (2007). A análise densitométrica foi realizada pelo software ImageQuant e os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média dos valores (%), e *** $p < 0,001$ indicam a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ## $p < 0,01$ comparados com o grupo CV (ANOVA com pós teste *Newman Keuls*).

Proteína AKT

A exposição repetida à UVB induz a fosforilação de AKT na pele dos animais ($0,77 \pm 0,03$) comparado ao grupo *Sham* ($0,61 \pm 0,03$, $p < 0,05$). Em relação à CV ($0,75 \pm 0,02$) o tratamento com a fração nas duas concentrações (0,1 % - $0,58 \pm 0,02$, $p < 0,05$; 1,0% - ($0,55 \pm 0,03$, $p < 0,01$) reduziu a fosforilação de AKT conforme mostrado na Figura 55.

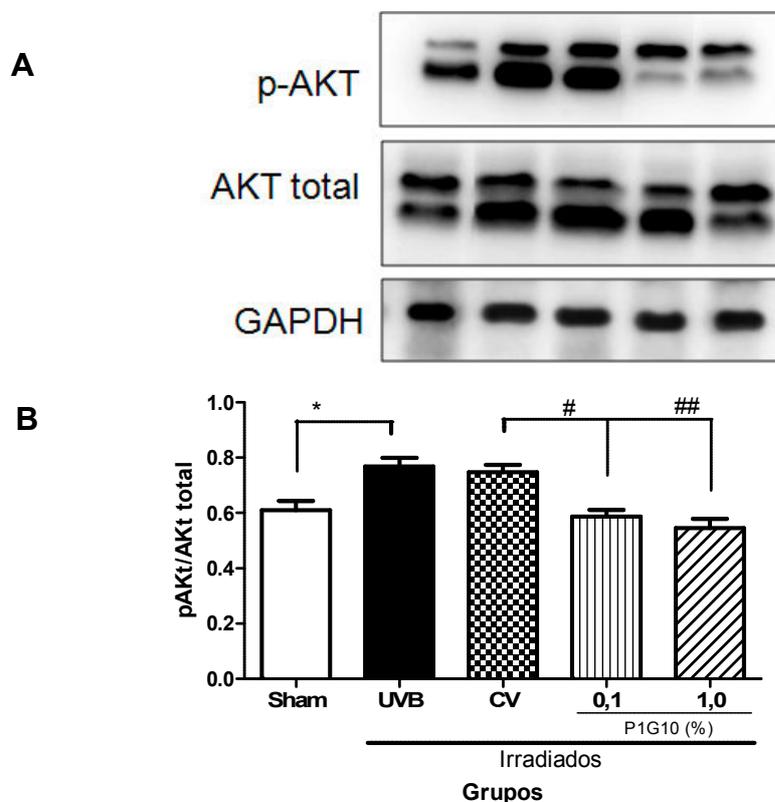


Figura 55 - Efeito de P1G10 sobre a fosforilação de AKT em pele de camundongos *Hairless* expostos à doses repetidas de UVB. Camundongos *Hairless* foram expostos a radiação UVB ($0,41 \text{ J/cm}^2$) e tratados com gel Natrosol® (CN), P1G10 (0,1 e 1,0%), por 10 dias consecutivos. Após 24 h, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pele foram retirados. (A) Western blotting. (B) Análise densitométrica. Foram aplicados $30 \mu\text{g}$ do lisado celular em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting foram desenvolvidos como descrito em SCHLICKEISER & PLEYER (2007). A análise densitométrica foi realizada pelo software ImageQuant e os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm erro padrão da média da razão pAKt/Akt total. * $p < 0,05$ indicam a diferença estatística quando comparado com o grupo UVB e ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ comparados com o grupo CV (ANOVA com *post teste Newman Keuls*).

6 DISCUSSÃO

A exposição à radiação UVB é um dos principais fatores de risco responsável por distúrbios dermatológicos (CHOI et al., 2014), que apresenta, como consequência, produção excessiva de radicais livres, depleção do sistema antioxidante e inflamação (HUR et al., 2010; FILIP et al., 2011). O presente trabalho mostra o efeito protetor da fração proteolítica, P1G10, contra as lesões induzidas pela radiação UVB, através dos modelos padronizados de exposição aguda de única e de múltiplas doses. Assim, investigamos o efeito antioxidante de P1G10 através da prevenção da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e depleção do sistema antioxidante, bem como o efeito anti-inflamatório mediante à regulação da produção de citocinas inflamatórias e componentes da inflamação.

6.1 Caracterização do Modelo de Exposição Aguda à UVB – Dose Única

Os modelos de exposição aguda à UVB são, atualmente, utilizados para identificar, avaliar e priorizar agentes químicos e produtos naturais quanto à capacidade de prevenir os danos causados pela UV e, conseqüentemente, a carcinogênese (STEELE & LUBET, 2010). Considerando que há na literatura diversos protocolos experimentais com diferentes doses de UVB, propusemos caracterizar e padronizar um modelo experimental de dose única que atendesse ao objetivo do nosso trabalho na produção de uma lesão, em camundongos *Hairless*, semelhante à uma queimadura solar. Estudos conduzidos por CASAGRANDE et al (2006) realizaram experimentos, *in vivo*, com diferentes doses de irradiação UVB (0,61- 3,69 J/cm²) e obtiveram resultados significativos a partir da dose 1,23 J/cm². A dose de 2,46 J/cm², em particular, apresentou dados expressivos em diferentes análises propostas, incluindo aumento, significativo, dos níveis de mieloperoxidase (MPO) e depleção glutatônica reduzida (GSH), após 6 h de exposição. Diante do exposto, definimos a dose de 2,4 J/cm², como a dose que poderia ser capaz de obter uma lesão cutânea macroscópica e mensurável. Portanto, para a caracterização deste modelo animal, as alterações macroscópicas da pele foram analisadas em diferentes tempos após exposição, bem como os eventos microscópicos e bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo e processo inflamatório, induzidos por UVB. Os experimentos e análises dos parâmetros

bioquímicos exigiram uma quantidade amostral acima de 8 animais por grupo, possivelmente, devido às variações ambientais e experimentais que parecem ter influência nesse modelo.

De acordo com RHODES et al (2009) a exposição aguda à UV produz na pele uma queimadura solar, definida como uma resposta inflamatória que, visualmente, evidencia um eritema (vermelhidão), sendo o pico máximo de vasodilatação observada em 24 h, e histologicamente, há uma infiltração de neutrófilos e linfócitos entre 24 a 48 h. Observamos, macroscopicamente, a formação do eritema na pele dos camundongos *Hairless* a partir de 6 h após à exposição única à UVB, que se acentuou nos tempos de 12 e 24 h (Figura 16). O eritema, induzido por UV, é resultado da vasodilatação da pele como resposta inicial ao processo inflamatório (revisto por CLYDESDALE et al., 2001). KIMURA & DOI (1998) relatam que o uso de $0,5 \text{ J/cm}^2$ de UVB promove uma reação eritematosa, em cachorros sem pêlo, após 24 h, e observaram em 48 h o seu valor máximo. Vários trabalhos demonstram que UVB induz sensibilidade e, conseqüentemente, a irritação cutânea através de mediadores inflamatórios. Contudo, nesse modelo experimental, parece que a histamina não possui envolvimento direto com o esse processo, e os autores sugerem uma participação importante da prostaglandina na formação do eritema e edema (LOGAN & WILHELM, 1966; SCHAWAR, 2002; PILAI et al., 2005; BLACK et al., 2008).

A irritação cutânea é acompanhada pela formação de um inchaço (edema) a partir de 6 h após à exposição, no entanto, observamos que a pele dos animais se apresentava mais edematosa no tempo de 24 h, como mostrado na Figura 16. Essa caracterização macroscópica, eritema e edema, mostra o tempo de 24 h como um período importante para análise, nesse modelo. Estudos conduzidos por IVAN et al (2014), utilizando dose de UVB $4,14 \text{ J/cm}^2$, mostraram o aumento do edema, no tempo de 15 h, sendo essa caracterização realizada através de uma medida dos pesos das peles dos animais, após o sacrifício. Além das observações realizadas sobre o eritema e edema cutâneos, outros parâmetros inflamatórios como, a presença de células inflamatórias e produção de citocinas pró-inflamatórias, foram adotados para caracterizar a inflamação induzida por UVB, em nosso modelo experimental.

UVB induz lesões inflamatórias conduzidas por aumento de infiltrado de células responsáveis em sintetizar e secretar enzimas pró-oxidantes e pró-inflamatórias, como MPO (PAL et al., 2015). O presente trabalho mostra que UVB promove um aumento de MPO tempo-dependente, com valores foram, significativamente, maiores no tempo de 48 h. A atividade da enzima MPO é, geralmente, usada como medida do conteúdo total de infiltrado de neutrófilos, encontrados na pele inflamada, após a irradiação (CAMPOS et al., 2011; IVAN et al., 2014). Esses dados foram confirmados através das análises histopatológicas, em fragmentos de pele, que revelaram infiltrado leucocitário a partir de 24 h que se intensificou em 48 h após à exposição. Além disso, a análise mostrou que o aumento de leucócitos foi, predominantemente, de células neutrofílicas, compatível com o aumento da atividade de MPO. O recrutamento de neutrófilos é mediado por citocinas pró-inflamatórias que podem ser liberadas em resposta ao aumento de EROs, induzidos por UVB (PUPE et al., 2003). No entanto, RHODES et al (2009) sugerem que, durante uma queimadura solar em pele humana, os mediadores lipídicos provenientes da hidrólise de fosfolipídeos da membrana, induzida por UVB, como eicosanóides derivados de ciclooxigenases (COXs) e lipooxigenases (LOXs) são compostos responsáveis pela infiltração de leucócitos e o aumento do eritema, logo, nas primeiras horas após a radiação UV.

O presente trabalho mostrou que a radiação UVB promoveu aumento da citocina pró-inflamatória TNF- α , conforme mostrado na Figura 20. Essa observação foi constatada já nas primeiras horas após a exposição, apresentando níveis significativos da citocina no tempo de 12 h e retomando os seus valores basais no tempo de 24 h. Similarmente, RAMACHANDRAN & PRASAD (2012) obtiveram um aumento dos níveis de TNF- α , em cultura de fibroblastos humanos, após 4 h da exposição à UVB. A super-regulação dessa citocina seria uma resposta precoce dos queratinócitos frente à UVB, uma vez que tanto TNF- α e IL1 β são citocinas que se encontram armazenadas na camada córnea da epiderme. Além disso, UVB induz o aumento da expressão gênica de TNF- α tanto em queratinócitos quanto em fibroblastos dérmicos, após 1,5 h da radiação (PILAI et al., 2005; BASHIR et al., 2009). Estudos prévios conduzidos por SCHWARZ et al (2002) relataram que TNF- α desempenha um importante papel no efeito inflamatório induzido por UV, pois está envolvida na formação de queratinócitos apoptóticos. O aumento dos níveis de

citocinas pró-inflamatórias, também, podem ocorrer diretamente por aumento de radicais livres e ativação de fatores de transcrição nuclear, como NFκB (PUPE et al., 2003).

Esse processo inflamatório contribui para a intensificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênios (ERNs), como ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilas ($OH^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) e óxido nítrico (NO^{\cdot}). Assim, o perfil oxidante do presente modelo experimental foi determinado pela medida indireta de NO^{\cdot} (dosagem de nitrito) pelo método de Griess. SUR et al (2002) relatam que muitos estudos têm reportado o papel de NO^{\cdot} como citotóxico e mediador inflamatório na pele. Estudos realizados por FILIP et al (2013) mostraram que, em cultura de queratinócitos irradiados por UVB, a ativação de enzima NO-sintase induzível (iNOS) citosólica acompanha o aumento dos níveis de produção de NO^{\cdot} , após 24 h de exposição. A Figura 21 mostra que nas primeiras 12 h, após a irradiação, UVB reduziu, significativamente, os níveis basais de nitrito, no entanto, observamos um aumento, significativo, desses níveis no tempo de 24 h após a exposição, em relação ao controle. Similarmente, TERRA et al (2012) avaliaram os níveis de NO^{\cdot} , em pele camundongos irradiados, através do método de cromatografia líquida e uso de inibidores para enzima NO-sintase constitutiva (cNOS) e iNOS. Os resultados mostraram que o aumento de NO^{\cdot} ocorre, somente, 24 h após a exposição e sugeriram que o NO^{\cdot} desempenha, nesse tempo, um papel importante na peroxidação lipídica induzida por UVB. O radical NO^{\cdot} pode reagir com $O_2^{\cdot-}$ e formar $ONOO^{\cdot-}$, composto oxidante e muito reativo e capaz de induzir muitos processos fisiopatológicos, incluindo lipoperoxidação da membrana plasmática e indução de apoptose (GONZALES et al., 2005). Diante desses eventos promovidos por UVB, a atuação do sistema de defesa antioxidante é imprescindível para impedir a formação do estresse oxidativo, no entanto, se o aumento de radicais livres exceder a capacidade redoxi da célula, conseqüentemente, poderá comprometer esse mecanismo antioxidante da pele (XU & FISHER, 2005).

Com intuito de determinar o perfil do sistema de defesa antioxidante da pele, após a radiação UVB, verificamos os níveis de SOD, GSH e CAT nos homogenatos de pele, como mostrado na Figura 22. O presente trabalho mostrou, considerando o aumento de SOD e CAT, que a radiação UVB ativa o sistema antioxidante

enzimático. Nossos resultados, observamos um aumento da enzima SOD, nas primeiras horas, após à exposição, sendo sua atividade máxima no tempo de 12 h e redução, significativa, no tempo de 24 h. De maneira similar, os estudos realizados por JIN et al (2007) observaram aumento dos níveis de SOD, em cultura de queratinócitos, após a radiação de 4,5 J/cm² de UVB. O aumento da atividade de SOD pode ser atribuído pela produção de ânions O₂⁻, após 6 h da irradiação UVB. Esse radical livre é altamente reativo, podendo reagir três vezes mais rápido com o radical NO[•], que com a SOD (LOWE, 2000). A enzima SOD neutraliza os ânions O₂⁻ convertendo em H₂O₂, protegendo a célula do dano oxidativo pela prevenção da formação de compostos muito reativos, como ONOO⁻ e OH⁻ (AFONSO et al., 2007), representando a primeira defesa antioxidante (FERNANDO et al., 2016b). Em seguida, a enzima CAT converte o H₂O₂ em H₂O e O₂ (MURAMATSU et al., 2005).

Neste trabalho, não observamos alterações, significativas, da atividade de CAT, nas primeiras horas após à exposição UVB, esse dado infere uma inibição dessa enzima após a radiação. De acordo com IIZAWA et al (1994), altos níveis de ânions O₂⁻ são capazes de inativar enzimas como a CAT e Glutathione peroxidase (GPx). Os níveis de CAT, ao contrário de SOD, após 24 h apresentavam três vezes mais altos do que o grupo *sham*. Por outro lado, diversos trabalhos mostram que UVB reduz os níveis de CAT e sugerem que essa enzima pode ser, parcialmente, responsável por acúmulo de EROs, após a radiação (SONG & GAOC, 2014; FERNANDO et al., 2016a; FERNANDO et al., 2016b). É sabido que a enzima CAT exerce sua função, cooperativamente, com o Sistema Glutathione (GSH/GPx) (TERRA et al., 2012). Esse sistema atua na eliminação não somente dos peróxidos inorgânicos, provenientes da SOD e outros processos, mas também na detoxificação de peróxidos orgânicos e hidroxilas induzidos pela radiação UVB (BANSAL & KAUSHAL, 2014).

O presente trabalho mostrou que UVB depleta os níveis de GSH em todos os tempos analisados, após a radiação. Similarmente, FONSECA et al (2010) observaram esse mesmo perfil para os níveis de GSH, em camundongos *Hairless*, após a exposição à UVB (2,46 J/cm²). A depleção de GSH, induzido por UVB, pode ter contribuído para a sobrecarga da atividade de CAT, observada após 24 h da exposição. Conseqüentemente, ocorre um acúmulo de peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) que promove danos às células, pois esse radical é dissolvido em solução aquosa e penetra, facilmente, pela membrana celular para a formação de radicais mais reativos, como a OH[•], pela reação de Fenton (HANCOCK et al., 2001). Estudos imunohistoquímicos conduzidos por MURAMATSU et al (2005) mostraram uma co-localização desse radical e a enzima CAT na camada granulosa da epiderme, sugerindo que a distribuição desta enzima acompanha o acúmulo de H₂O₂, após a radiação UV.

Os eventos induzidos pela radiação UVB, estresse oxidativo e inflamação, conduzem alterações morfológicas, da pele, que possibilitam a sua visualização por análise microscópica (BABA et al., 1996; RYU et al., 2010). Os cortes histológicos dos fragmentos de pele mostraram que UVB induziu danos à epiderme (Figura 17), nas primeiras horas após à exposição, que resultaram em células volumosas e com microvacúolos semelhante à uma degeneração hidrópica. Tais alterações celulares decorrem do aumento de radicais livres que comprometeram a permeabilidade da membrana plasmática pela peroxidação lipídica (AZULAY et al, 2013).

A radiação UVB induz danos diretos ao DNA (STEGE et al., 2000) que resulta em mutações e ativação de vias de sinalização de morte celular (TANG et al. 2007). A apoptose, em células irradiadas, é um processo adicional ao fotodano, cujo mecanismo molecular é semelhante àquele conduzido pela inflamação, que envolve fragmentação de DNA de células queimadas ou apoptóticas (ISHIDA & SAKAGUCHI, 2007). As mudanças degenerativas da apoptose, em queratinócitos, como condensação do citoplasma e núcleos picnóticos (BABA et al., 1996), foram visualizadas nas primeiras horas após a exposição à UVB e alcançaram dano celular máximo no tempo de 12 h (Figura 17). Além disso, acima de 95% das células da epiderme, se apresentavam anucleadas e a lesão completamente instalada no tempo de 24 h. Esse dano foi comparado a uma necrose de coagulação. Já que algumas células apresentavam perda de elementos nucleares e preservação do contorno celular (AZULAY et al, 2013). Portanto, a energia empregada nesse modelo experimental, promove uma lesão por toda extensão da epiderme que compromete a estrutura e os mecanismos funcionais da pele (BENJAMIN et al., 2008).

Tais alterações estruturais também são visualizadas na derme, caracterizadas por degradação e desorganização de fibras colágenas e acúmulo de elastina (BRENNEISEN et al., 2002). A análise das lâminas coradas por HE mostraram que a radiação UVB, também, resulta em mudanças estruturais em toda a extensão da derme à hipoderme, incluindo aumento discreto da espessura e espaçamento das fibras colágenas após 6 h da exposição. Tais alterações progredem para uma destruição de fibras colágenas observada após 12 h, além disso, a camada apresenta redução de folículos pilosos e anexos. Essas alterações qualitativas sugerem uma participação das proteases que degradam a matriz, como as metaloproteinases (MMPs) (BRENNEISEN et al., 2002). Tais enzimas estão envolvidas em muitos eventos proteolíticos, tanto fisiológicos quanto patológicos incluindo a embriogênese, cicatrização, inflamação e câncer (QUANT et al., 2009). Ainda, observa-se aumento da espessura derme-hipoderme, vasodilatação e destruição de membranas de células adipócitas, inferindo um edema cutâneo. Dentre os eventos dermais, induzidos pela radiação, como degeneração das fibras elásticas e acúmulo anormal de elastina, resulta na perda da elasticidade e fotoenvelhecimento cutâneo que contribuem para a formação de rugas e carcinogênese (YAAR & GILCHREST, 2001; BRENNEISEN et al., 2002).

Em nosso modelo experimental observamos que a dose $2,4 \text{ J/cm}^2$ de UVB promove alterações dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos, associados ao estresse oxidativo, inflamação e danos ao DNA. Essas observações, incluindo eritema, edema, estresse oxidativo, recrutamento de células inflamatórias, degradação e desorganização de fibras colágenas, foram mais expressivas no tempo de 24 h após à exposição (Figura 52). Portanto, definiu-se esse período de tempo para avaliar a eficácia de P1G10 sobre as lesões induzidas por UVB.

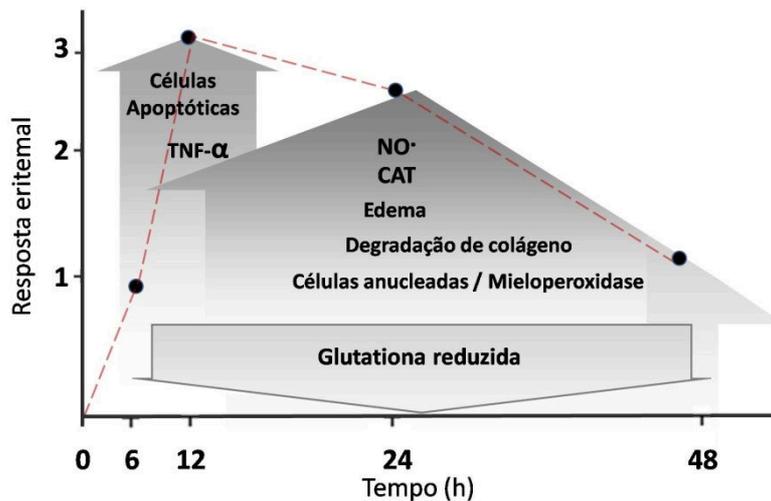


Figura 56 - Ilustração dos principais eventos que ocorrem na pele de camundongos *Hairless* em resposta à exposição aguda da radiação UVB. A ilustração mostra um aumento da resposta inflamatória e oxidante/antioxidante em relação ao tempo, após a radiação UVB .

6.2 P1G10 modula o sistema antioxidante e inflamatório induzidos por exposição aguda à UVB – Dose Única

Uma vez caracterizado o modelo experimental e a partir dos resultados prévios dos efeitos cicatrizante cutâneo, protetor gástrico de P1G10, obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, inferimos que essa fração poderia atuar, também, como agente preventivo ou protetor contra lesões induzidas por UVB. Para tanto, avaliamos, *in vitro* e *in vivo*, o efeito da fração proteolítica, P1G10, sobre biomarcadores do estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidantes, o perfil de parâmetros inflamatórios, além do efeito sobre a matriz extracelular, frente à irradiação UVB em dose única de 2,4 J/cm².

As proteases contidas na fração P1G10 são capazes de inibir os elementos radicalares presentes em solução de DPPH. Após a obtenção da curva linear entre as concentrações usadas da fração e o sequestro do radical, foi possível calcular o EC₅₀ (0,02 mg/mL), como mostrado na Figura 38. A atividade antioxidante mostrada pelas proteases, pode ser atribuída aos aminoácidos, como, triptofano, tirosina, cisteína, dentre outros. CHIANG et al. (2014) sugerem em testes *in vitro*, que essa atividade se dá pela doação de um átomo de hidrogênio desses aminoácidos para o radical DPPH[•], formando um composto mais estável (DPPH-H). Atividade

antioxidante, também, foi mostrada para outras cisteíno-proteases, onde se determinaram os valores de EC_{50} de 1,71 mg/mL para papaína (KIM et al., 2009; AMRI & MAMBOYA., 2012) e 684 mg/mL para bromelina (MANOSROI et al., 2014). Comparando esses valores de EC_{50} , podemos inferir que P1G10 possui uma atividade antioxidante superior à papaína e à bromelina. O uso dessas proteases em estudos dermatológicos está basicamente relacionado às suas atividades proteolíticas no reparo tecidual. No entanto, a atividade antioxidante mostrada para essas enzimas poderia ser explorada como protetora e reparadora da pele frente à agressão de agentes oxidantes (ELIAS et al., 2008; CALÓ & MARABINI, 2014; MANOSROI et al., 2014).

A aplicação tópica de P1G10, após a exposição de dose única à UVB, preservou o sistema de defesa antioxidante cutâneo e diminuiu a produção de EROs. As análises dos estudos, *in vitro* e *in vivo*, mostraram que P1G10 inibiu o acúmulo de EROs intracelulares, como ânions $O_2^{\cdot-}$ e peróxido de hidrogênio e/ou peroxinitrito e/ou radical hidroxila, mensurados pelas sondas DHE e DCFH-DA, respectivamente. Estudos conduzidos por PARK & LEE (2008) relataram a redução de radicais livres em células *HaCat* irradiadas e tratadas com resveratrol, relacionando este efeito com o aumento da sobrevivência celular, dado pela diminuição do dano oxidativo dos componentes celulares (proteínas, DNA e lipídios). De fato, EROs promovem peroxidação dos lipídios presentes na membrana celular e, conseqüentemente, acúmulo de malondialdeído (MDA) (HSEU et al., 2012). Em conformidade com a redução de EROs, P1G10 reduziu a lipoperoxidação indicada pelos níveis de MDA, que se mostraram reduzidos nos fragmentos de pele (Figura 31). É importante ressaltar que essa formação da lipoperoxidação não depende, apenas, da presença de pró-oxidantes que promovem a peroxidação, mas, também, da disponibilidade do substrato, assim como, dos níveis locais de enzimas antioxidantes (TERRA et al., 2012).

Uma vez que EROs são responsáveis pelo dano intracelular e que o tratamento com P1G10 reduziu a concentração dessas moléculas e preservou a permeabilidade celular, decidimos averiguar o envolvimento da fração no sistema de defesa antioxidante. Inicialmente, avaliamos a atividade da enzima SOD e verificamos que na pele dos animais que receberam 0,1% P1G10, incorporado ao

veículo gel Natrosol®, houve prevenção da depleção de, aproximadamente, 30% da atividade dessa enzima após 24 h da exposição à UVB, como mostrado na Figura 32. A SOD é a maior defesa antioxidante contra os ânions $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; HALLIWELL, 2006; FUKAI & USHIO-FUKAI, 2011). Assim, é possível que esse efeito de P1G10 sobre a preservação do sistema SOD, após a radiação, seja o responsável pela redução de ânions $O_2^{\cdot-}$.

Outro importante sistema antioxidante é o da Glutathione que é responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos (CAMPANINI et al., 2013). Nesse sistema de defesa, a glutathione peroxidase (GPx) é considerada o mais importante antioxidante da pele (AFAQ & MUKHTAR, 2001), pois está envolvida na eliminação do peróxido de hidrogênio, com o auxílio da proteína GSH que se apresenta como o único doador de hidrogênio (FILIP et al., 2011). Assim, verificamos que o tratamento tópico com P1G10, também, inibiu a depleção de GPx e GSH, mantendo seus níveis, significativamente, altos quando comparados ao grupo irradiado que recebeu o veículo. Esses dados corroboram os estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa que mostraram a restituição dos níveis de GSH no grupo tratado com P1G10 em modelo de úlcera gástrica, que sugerem um efeito protetor da fração neste modelo experimental (ARAUJO-SILVA et al., 2015). Achados semelhantes foram reportados por VAYALIL et al (2003) ao aplicar 0,2% de derivados de epicatequinas, originados do chá verde, constatando prevenção da depleção dos antioxidantes endógenos como GPx, CAT e GSH frente à exposição à radiação UVB. Esses autores relatam que os componentes antioxidantes atuam em cooperação sinérgica, a fim de manter uma concentração fisiológica de EROs intracelulares.

Como previamente descrito, verificamos um aumento, significativo, dos níveis de CAT nos animais irradiados em relação ao grupo *sham*. Ademais, observamos que os grupos tratados com P1G10 apresentaram um acréscimo expressivo e significativo da atividade da enzima CAT quando comparado com grupo que recebeu o veículo. Acreditamos que a fração exerça um efeito benéfico na modulação do mecanismo antioxidante, ao induzir uma maior atividade de CAT em resposta aos níveis aumentados de SOD, a fim de auxiliar o sistema de defesa glutathione (GSH e

GPx) na remoção do excesso de peróxido formado, diminuindo os danos celulares e progressão do processo inflamatório.

Estudos têm demonstrado que enzimas antioxidantes, também estão envolvidas no processo inflamatório. MATHEW et al. (2014) descreveram a participação de GPx na modulação de vias de sinalização que conduzem à ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B e, desse modo, modulando as respostas inflamatórias, como a produção citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células.

Neste trabalho, observamos as manifestações inflamatórias agudas que ocorrem na pele após a exposição de dose única à UVB. Como mostrado na Figura 23, verificamos que o eritema e o edema se apresentaram reduzidos nos grupos tratados com P1G10, após 24 h da irradiação. Essas reações cutâneas têm sido diretamente associadas ao aumento da expressão de COX2 (CHOI et al., 2014), devido a sua presença em grande concentração na epiderme, após a irradiação (ANGGAKUSUMA et al., 2010). A proteína COX2 é considerada um biomarcador inflamatório, pois é responsável por mediar a produção de prostaglandinas (BLACK et al., 2008). A Figura 34 mostra que, no nosso modelo experimental, foi constatada a supressão da expressão de COX2 na pele dos animais tratados, topicamente, com a fração. Corroborando os resultados deste trabalho, estudos prévios do nosso grupo, utilizando o modelo de úlcera gástrica, mostraram que os animais tratados com P1G10 e sub-frações (CMS1 e CMS2) apresentaram redução da expressão gênica de COX2 (ARAUJO-SILVA, 2015). Seguindo com as proteases, BHUI et al (2009) relatam o efeito anti-inflamatório da bromelina pela inibição do aumento de expressão de COX2 em pele de animais tratados, e sugerem essa ação como um efeito primário da cisteíno-protease contra a resposta inflamatória.

Apesar da resposta eritemal induzida por UVB ser similar àquela produzida por injúria térmica, mediada por histamina, em estudos prévios utilizando anti-histamínicos não se observou o bloqueio da formação do eritema após a irradiação (CLYDESDALE et al., 2001). Por outro lado, o uso de anti-inflamatórios, como o celecoxibe (inibidor específico de COX2) e a indometacina (inibidores não seletivo para COX) foi capaz de reduzir o edema e eritema em animais expostos à radiação

UVB, mostrando que esse efeito, provavelmente, ocorre através da inibição da via da síntese de prostaglandinas (WILGUS et al., 2002; WULF et al., 2010). Diante do exposto, sugerimos que a redução das alterações macroscópicas, eritema e edema, promovidas por P1G10, podem estar relacionadas com a inibição da expressão de COX2, no entanto, é importante investigar a participação da PGE₂ nesse efeito farmacológico em lesões induzidas por UVB.

A radiação UVB estimula os queratinócitos à superexpressão de COX2 via aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias (TANAKA et al., 2004). De acordo com LEE et al (2013), as citocinas TNF- α e IL1 β podem sofrer ação direta de UVB e desencadear a ativação da fosfolipase citosólica e, por conseguinte, as COXs, resultando no aumento dos níveis de prostaglandinas e recrutamento de células inflamatórias (LEE et al., 2013). Nossos resultados mostraram que, apesar dos níveis de TNF- α , após a radiação, se apresentarem semelhantes aos basais, o tratamento tópico com 1,0% P1G10 se mostrou efetivo na redução desses níveis, após 24 h da exposição à UVB (Figura 29). Em um trabalho, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, o efeito anti-inflamatório de P1G10 foi evidenciado pela diminuição dos níveis de TNF- α produzidos por macrófagos peritoneais (induzidos por tioglicolato), após 24h de tratamento (BRAGA, 2013). Similarmente, trabalhos publicados com outras cisteíno-proteases, como a bromelina, relataram a redução dos níveis TNF- α em diferentes condições inflamatórias (ONKEN et al., 2008; HUANG et al., 2008).

Além da citocina TNF- α , a IL1 β mostra ser uma proteína importante no processo inflamatório, induzido por UVB, estudos mostram grandes quantidades desta citocina armazenadas na camada córnea da epiderme humana (PILAI et al., 2005). Esses dados são corroborados por diversos trabalhos que mostram aumento de seus níveis em diferentes doses de UV, após 24 h da irradiação (LEE et al., 2013; IVAN et al 2014; PAL et al., 2015). Em conformidade, nossos resultados mostraram quantidade, significativa, de IL1 β no homogenato de pele, quando irradiada por UVB, sugerindo uma participação ativa dessa citocina na progressão da inflamação e dano celular. Em contrapartida, o tratamento tópico com 1,0% P1G10 inibiu o aumento dos níveis de IL1 β , mantendo seus valores semelhantes aos basais. Esses dados sugerem uma importante ação de P1G10 na redução da resposta

inflamatória, induzida por UVB, pois a citocina IL1 β amplifica essa resposta através da produção de vários agentes pró-inflamatórios (revisado por CLYDESDALE et al., 2001), como por exemplo, na indução do aumento de expressão de IL8 (KONDO et al., 1993; RAINGEAUD & PIERRE, 2005). As citocinas IL-1 β e IL8 desempenham um papel central no auto-recrutamento e ativação de células inflamatórias (EL-ABASERI et al., 2013). Diante disso, investigamos os níveis de IL8 após a exposição de dose única à UVB, na ausência e presença de P1G10. Mostramos assim, que UVB aumenta, significativamente, os níveis da citocina IL8 (Figura 29). Contrariando as expectativas, a pele dos animais tratados com P1G10 não se apresentou alterada em relação aos níveis dessa citocina pró-inflamatória. Esses dados mostram que, na presença de P1G10, os níveis de IL8 não acompanham os de IL1 β , assim, inferimos que o mecanismo de ativação de IL8, nesse modelo experimental, não depende somente de IL1 β e que, alternativamente, outra via de sinalização é ativada para sua produção.

Estudos recentes sobre a dermatite atópica apontam a produção de IL8, em queratinócitos, via produção de IL9 por estímulo da molécula de interação estromal-1 (STIM1) e, subsequente ativação de quinase ativada por estímulos extracelulares (ERK) (HONG et al., 2015). Consistente com os nossos resultados, PERNET et al (1999) e VIEIRA et al (2014) mostraram que o uso da indometacina, também, não induziu modificações nos níveis de IL8, em sobrenadante de queratinócitos, após a radiação com UV, porém, promoveu redução na síntese e expressão de TNF- α e IL-1 β . É sabido que essas citocinas estão associadas com o recrutamento de células inflamatórias e das células de Langerhans na epiderme (DUTHIE et al., 2000), sendo a IL8 quimiotática para neutrófilos no sítio da inflamação (HENKELS et al., 2011).

Tais resultados nos incentivaram à investigar o envolvimento de P1G10 no recrutamento de células inflamatórias, sendo assim, análises histopatológicas foram realizadas. A medida morfométrica da celularidade na hipoderme mostrou que P1G10 reduziu o número de células, significativamente, na concentração de 1,0%. Na descrição histopatológica revelou que a pele dos animais tratados com a fração conta infiltrado inflamatório reduzido, discreta hiperemia e menor destruição dos adipócitos na hipoderme. Além disso, observamos um decréscimo de 50% na espessura derme-hipoderme (Figura 24) em todas as concentrações de P1G10

testadas quando comparadas ao grupo irradiado que recebeu o veículo. Em adição, o presente trabalho avaliou, indiretamente, o recrutamento de neutrófilos, pela mensuração da atividade de MPO, que se apresentou reduzido nos animais que receberam 1,0% de P1G10 (Figura 28). Estudos anteriores com a fração, também, avaliaram o efeito de P1G10 no processo inflamatório e observaram uma diminuição do infiltrado inflamatório em lesões de diferentes etiologias (GOMES et al., 2010, LEMOS et al., 2011; ARAÚJO-SILVA et al., 2015). Diante do exposto, verificamos que apesar de P1G10 não possuir efeito sobre os níveis de IL8, promoveu redução dos danos da radiação, mediados pela atividade anti-inflamatória, por inibir o aumento de IL-1 β , TNF- α , expressão de COX2 e reduzir o recrutamento inflamatório para área da lesão, induzida por UVB.

Contudo, o mecanismo pelo qual P1G10 exerce o seu efeito anti-inflamatório ainda não está esclarecido. Diversos trabalhos relatam o envolvimento da via MAP quinases, principalmente p38 MAP quinase, na ativação da transcrição de citocinas e COX2, após a radiação por UVB (HOMMES et al., 2003; TSOYI et al., 2008; MUTOU et al 2010). No entanto, estudos conduzidos por TANG et al (2001) demonstraram que a inibição dessa via não anulou completamente a atividade promotora de COX2. Esses autores mostraram que o uso do inibidor da fosforilação de Akt (LY294002) promoveu supressão total da atividade de COX2 e redução, parcial, dos níveis dessa proteína endógena, sendo sugerida uma importante participação da via PI3K/Akt no processo. Essa via de sinalização tem sido, fortemente, associada com a regulação da expressão de síntese de COX2 e PGE₂ (YANG et al., 2009) através da ativação e translocação do NF κ B para o núcleo, a partir da fosforilação de I κ B quinase (IKK α) e, conseqüentemente, a degradação de I κ B (OZES et al., 1999; OECKINGHAUS & GHOSH, 2009).

A fim de verificar se a via PI3K/Akt estaria envolvida no mecanismo de ação molecular da fração P1G10, averiguamos o seu efeito na fosforilação de Akt (pAkt), ou seja, no estado ativado da proteína. Nossos resultados mostraram um aumento da fosforilação de Akt nos animais expostos à UVB comparados com o grupo *sham*, após 24 h da irradiação. Interessantemente, os animais tratados topicamente com P1G10 apresentaram redução da proteína fosforilada (Figura 33). BHUI et al (2009) demonstraram que a bromelina exerce a ação anti-inflamatória através da redução

da expressão de COX2 e inibição da ativação de NFκB a partir da regulação da via Akt. Esses resultados são coerentes com aqueles encontrados por PAL et al (2015) que mostraram que o efeito anti-inflamatório de fisentina (flavonóide extraído de maçã e frutas vermelhas) ocorre pela modulação da via de sinalização da inflamação PI3K/Akt/NFκB em camundongos *Hairless* após a irradiação UVB.

Dentre os processos que envolvem a participação da via PI3K/Akt, a regulação da expressão do gene supressor de tumor, p53, é um evento importante na promoção de danos promovidos pela radiação UV (IBUKI et al., 2010). Alguns achados sugerem que a inflamação e a apoptose são requeridas na tentativa de reparar e recuperar células e tecidos danificados pela UV (BENJAMIN et al., 2008; FILIP et al., 2010; RAMACHANDRAN & PRASAD, 2012). Estudos prévios verificaram que a inibição da expressão de p53, em células epidermais, resulta na indução da atividade de AP-1 e NFκB, através da ativação de vias de sinalizações, como Akt e MAP quinases (exceto ERK1/2), após a radiação UV (WANG et al., 2005). Considerando que a expressão da proteína p53 é requerida como um ponto de controle durante a progressão do ciclo celular, após a irradiação com UVB (ISHIDA & SAKAGUCHI, 2007), analisamos sua expressão. Nossos resultados mostraram que P1G10 aumentou a expressão de p53 nuclear, sendo, significativo, nos animais que receberam 1,0% da fração, como mostrado na Figura 35. Em conformidade, estudos conduzidos por KALRA et al (2008) mostraram que a bromelina reduz o processo da tumorigênese por induzir o aumento de expressão de p53 e inibição do fator NFκB, explicado pelo bloqueio da fosforilação de Akt. Com o aumento e acúmulo de p53, p21 é ativada que, por sua vez, inibe a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que a célula pare na fase G1, até que complete o reparo do DNA (BASU & HALDAR, 1999; FILIP et al., 2013). Além disso, p53 pode ativar a transcrição de diferentes genes alvo, levando a diferentes, possíveis resultados. Com a perda da função dessa proteína, no entanto, o dano ao DNA segue o processo sem ser reparado, podendo levar ao acúmulo de mutações (oncogenes) e, posteriormente, à transformação maligna (BORLON et al., 2008). Em adição, o tratamento com P1G10 reduziu o número de células anucleadas e com núcleos picnóticos (menos de 80%) comparado com o grupo que recebeu o veículo (mais de 95%), constatado pela análise histopatológica.

O acúmulo da proteína p53 exerce várias atividades, incluindo a regulação de mediadores para a apoptose, incluindo Bax, Bcl-2, CD95/Fas e DR5/KILLER (BENCHIMOL, 2001). Estudos mostram que, o aumento da expressão de p53 não se limita apenas na indução da apoptose, em oposição, pode ocorrer uma redução do limiar apoptótico em resposta ao dano do DNA (GILLET et al., 2000; MRASS et al., 2004). De acordo com SIREROL et al (2015) o aumento da expressão de p53 pode ser relacionada à manutenção do estado redoxi celular, uma vez que a proteína desempenha um papel na proteção da expressão de proteínas antioxidantes, com objetivo de prevenir a oxidação do DNA durante um estresse oxidativo. FRANCO & CIDLOWSKI (2009) relatam que as alterações do ambiente redoxi intracelular regulam o progresso da apoptose e a depleção de GSH é considerada como reguladora da cascata de sinalização de vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Assim, esse evento pode requerer a ativação do sistema Fas/FasL (via extrínseca) ou da via mitocondrial com a liberação do citocromo c (via intrínseca) (CHANDRA et al., 2000; TOR et al., 2014). Ambas as vias apoptóticas, extrínseca e intrínseca, se unem em uma única via, na qual a caspase 3 é considerada a maior efetora e, portanto, biomarcadora da apoptose (ISHIDA & SAKAGUCHI et al., 2007; FILIP et al., 2011). Nossos resultados mostraram uma redução da expressão protéica de caspase 3 na pele dos animais que receberam P1G10, em relação aos animais irradiados que receberam o veículo, conforme mostrado na Figura 36. Esses dados mostram que os níveis de apoptose foram, parcialmente, restaurados na presença de P1G10, sugerindo uma redução da citotoxicidade induzida por EROs ou estresse oxidativo produzido por UVB. De acordo com KIM et al (2015) a exposição à UV resulta em um processo apoptótico intenso, que poderia comprometer a função da pele como barreira natural e acelerar o fotoenvelhecimento. Diante disso, esses autores sugerem que a inibição da apoptose de queratinócitos da pele pode representar um método terapêutico para bloqueio do fotoenvelhecimento cutâneo.

Outro evento importante induzido por UVB é a degradação do colágeno, fragmentação e desorganização, além da inibição da biossíntese de pró-colágeno resultando em perda do conteúdo da matriz extracelular (MEC) (QUANT et al., 2009). As mudanças morfológicas induzidas por UVB foram investigadas e observamos, em cortes corados com tricômico de Gomori, que a pele dos animais

irradiados apresentavam alterações dermais, como fibras colágenas esparsas e desorganizadas. No entanto, ao analisarmos os cortes da pele dos animais tratados com P1G10 (Figuras 26D e E) observamos maior organização e preservação das fibras colágenas, semelhantes ao grupo *sham*. Esse efeito é compatível com aqueles observados pelo nosso grupo quando avaliada a atividade cicatrizante da fração, onde mostramos tecidos com maior deposição e organização de fibras colágenas em lesões de diferentes etiologias (dermoabrasão, queimadura e excisional) (GOMES et al., 2010, LEMOS et al., 2011; FREITAS, 2011; ARAÚJO-SILVA et al., 2015). O colágeno é o componente mais abundante da pele, representando 80% do peso cutâneo e proporciona propriedades de tensão e resistência. É sabido que mudanças no metabolismo do colágeno, que resultam em degradação dessas fibras, estão associadas à superexpressão das enzimas colagenases e metaloproteinases, consideradas grandes responsáveis, também, pelo fotoenvelhecimento cutâneo (IM et al., 2014).

Em lesões promovidas por UVB, as metaloproteinases (MMPs) se apresentam alteradas e o balanço entre inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) e MMPs fica comprometido (ANGGAKUSUMA & HWANG, 2010). O aumento de expressão de MMP9 cliva colágeno tipo I, II e V que depende da ativação dos fatores de transcrição, como NFκB e AP-1, que são regulados por vias de sinalização, como a PI3K/Akt (BRENNEISEN et al., 2002; QUANT et al., 2009; CHENG et al., 2012). Estudos mostram que dose única de irradiação, em humanos, induz aumento da atividade de metaloproteinases (IM et al., 2015). Em conformidade, nossos resultados mostraram, por análise de zimografia, um aumento da atividade de MMP9 após a exposição à uma única dose de UVB. O tratamento com P1G10 inibiu em 50% a atividade gelatinolítica de MMP9, confirmando as análises histológicas que mostraram a preservação da matriz extracelular nos animais tratados. Estudos conduzidos por ARAUJO-SILVA (2015), em úlceras gástricas que relatam um efeito cicatrizante da fração CMS1 de P1G10, mostram uma alteração do balanço MMP2/TIMP2 interpretado como participante ativo no remodelamento da MEC. Ademais, experimentos realizados em lesões excisionais mostram que P1G10 acelera o processo cicatricial em paralelo com a inibição de MMP9 (Figura 30) , que por sua vez, está associada à redução do tecido de granulação e maior depósito de colágeno (dados não publicados). Em outro

trabalho, realizado por IVAN et al (2014), se verificou que Pirrolidina Ditiocarbamato, um tiol antioxidante, protegeu a pele de camundongos contra os danos promovidos por UVB pela redução de secreção e atividade de MMP-9, esta atribuída à inibição da ativação de NFκB induzida após à exposição.

O presente trabalho mostra que P1G10, em diferentes sistemas (*in vivo* e *in vitro*), inibe o estresse oxidativo pela eliminação de radicais livres, conseqüentemente, auxilia na manutenção do sistema de defesa antioxidante da pele. Em adição, a fração previne o aumento do eritema, edema, mediadores inflamatórios (MPO e COX2), nível de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL1β), infiltrado inflamatório, atividade de MMP-9, depleção do sistema glutaciona e apoptose. P1G10 inibe a sinalização Akt que está envolvida na inflamação induzida por UVB e aumenta a proteína p53 relacionada ao reparo do DNA (Figura 57).

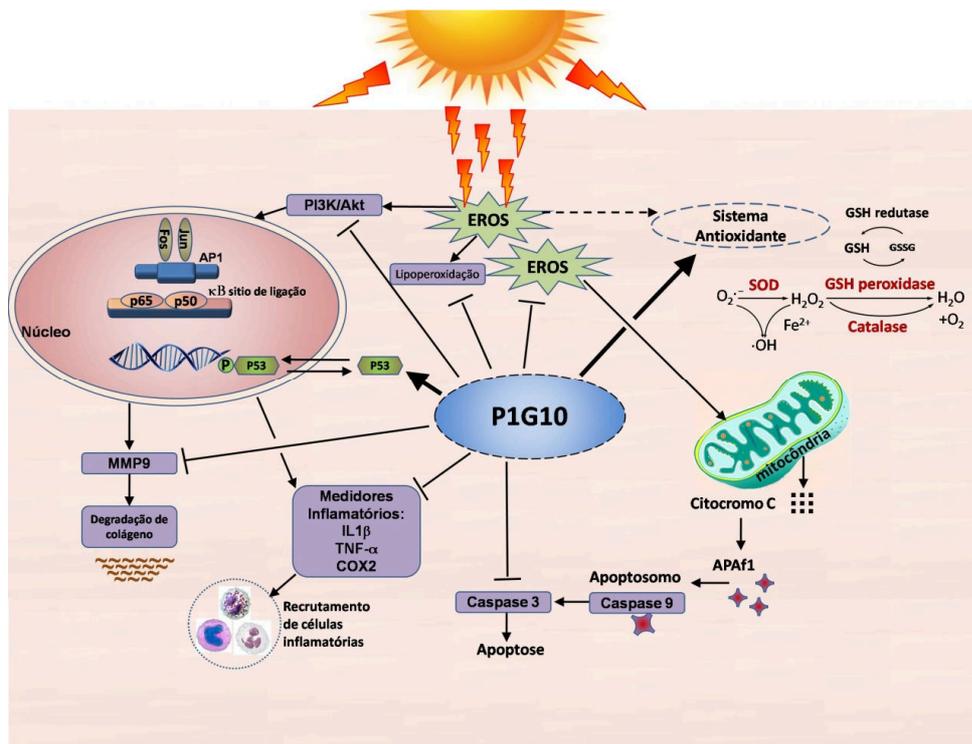


Figura 57 - Diagrama esquemático mostrando o efeito de P1G10 em alterações celulares e moleculares induzidas por exposição dose única UVB. P1G10 previne os danos induzidos por UVB pela inibição de EROs, lipoperoxidação da membrana, processo inflamatório, degradação de colágeno e apoptose. Além disso, interfere na via Akt, aumenta a expressão nuclear da proteína p53 e auxilia no sistema de defesa antioxidante pela prevenção da depleção dos componentes (em vermelho) desse sistema.

6.3 P1G10 modula o sistema antioxidante e inflamatório induzidos por exposição aguda à UVB – doses múltiplas

A maioria dos danos, promovidos por queimadura à UVB, são mais visíveis na epiderme, com moderadas alterações dérmicas. A exposição aguda à UVB promove alterações transientes, ou seja, podem ser reparadas em até duas semanas (LAVKER et al., 1995; CHUN et al., 2007). Apesar dos efeitos de exposição de dose única à radiação UV, sobre o estresse oxidativo e danos ao DNA, serem úteis para analisar respostas complexas da pele à radiação, o modelo de múltiplas exposições é, provavelmente, mais fiel ao ser comparado com àquela radiação solar naturalmente recebida pelos seres humanos (FILIP et al., 2011). De acordo com OLTEANU et al (2012), o estudo com o modelo de doses de UVB repetidas por 10 dias é considerado como intermediário entre a exposição aguda e crônica, semelhante àquela que ocorre em uma pessoa durante as férias de verão. Esse modelo possibilita avaliar os efeitos dos danos persistentes da radiação UV sobre a pele.

As múltiplas exposições à UVB causam perda gradual da estrutura e função da pele, pelo acúmulo de DNA danificado, alterações do sistema imune e inflamação crônica, os quais favorecem o desenvolvimento do câncer de pele (MATSUMURA et al., 2004). Os efeitos dessa exposição são de intensidade mais baixa, porém, promovem danos persistentes. Esse fenômeno é conhecido como foto-adaptação ou tolerância, e envolve espessamento da epiderme, bronzeamento cutâneo, vascularização e reparo ao DNA, no entanto, os mecanismos envolvidos, ainda, são pouco conhecidos (FILIP et al., 2011). Essa foto-adaptação é caracterizada por reduzir respostas celulares frente a doses repetidas e equivalentes de radiação UV (OH et al., 2004). Considerando o efeito protetor da fração P1G10 apresentado, anteriormente, em modelo agudo de exposição única à UVB, avaliamos, nesta etapa, as modificações adaptativas envolvendo o estresse oxidativo, defesa antioxidante e a inflamação, induzidos por doses múltiplas.

O dano oxidativo, induzido por doses múltiplas de UVB, foi avaliado pela mensuração dos níveis de EROs e MDA produzidos pela pele irradiada (Figura 51). Nesse modelo, o ensaio com a sonda DCFH-DA mostra que UVB promove aumento

de 50% nos níveis de EROs, no entanto, observamos uma redução destes nos grupos que receberam o tratamento tópico com P1G10. Esse aumento na produção de EROs, por UV, provoca injúrias nas membranas plasmáticas das células pela interação com esses radicais resultando em peroxidação lipídica e aumento da permeabilidade celular (TSOYI et al., 2008; PAAL et al., 2016). Com o intuito de verificar o efeito de P1G10 na preservação da integridade da membrana plasmática, mensuramos os níveis de MDA em homogenatos de pele. Apesar do tratamento com P1G10 apresentar redução nos níveis de EROs, a análise para MDA mostrou que os níveis de lipoperoxidação se apresentam semelhantes aos do grupo UVB. O processo de formação de hidroperóxidos lipídicos ocorre em diversas etapas com inúmeras reações químicas que resultam em diferentes compostos, além de MDA (AYALA et al., 2014). Dentre os sub-produtos dessa reação, os aldeídos monofuncionais também são reativos para o ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido e à temperatura elevada utilizada no teste de TBARs, formando produtos que no teste espectrofotométrico, possuem semelhante espectro como o complexo MDA:TBA (1:2) (532 nm) (LIMA & ABDALLA, 2001). Além disso, esses autores relatam a possibilidade de ocorrer autoxidação dos lipídios e, conseqüentemente, aumento dos níveis de MDA, durante a fase de aquecimento do ensaio. Portanto, a avaliação do MDA pelo teste de TBARs não é específico, sendo possível, também, ocorrer interferências durante o ensaio.

Na sequência, investigamos a participação da fração no sistema de defesa antioxidante, como mostrado na Figura 52. Primeiramente, verificamos o efeito de P1G10 no sistema SOD e observamos que os níveis dessa enzima se encontravam inalterados em todos os grupos experimentais. Segundo os achados de JAKSON (1999), os fibroblastos da pele humana respondem à UVB por uma superregulação rápida, aproximadamente 30 minutos, com um aumento transiente da atividade da enzima SOD. A ausência de alterações nos níveis de SOD, no modelo utilizado, pode ser explicada por esse aumento transiente que teria ocorrido antes das análises ou mesmo, pela sensibilidade do método empregado.

Diferentemente do que foi observado para enzima SOD, verificamos que, depois de repetidas doses de UVB, há uma depleção de, aproximadamente, 50% da atividade de GPx em relação ao *sham*, sendo essa redução também relatada por

VAYALIL et al (2003) em pele de camundongos *Hairless* irradiados por múltiplas doses de UVB. Todavia, o tratamento com P1G10 manteve os níveis da atividade dessa enzima semelhantes aos basais, possivelmente, impedindo assim, a depleção de GPx induzida por UVB. Ainda no sistema glutaciona, observamos que UVB estimulou o aumento dos níveis de GSH, incluindo os da pele dos animais tratados com P1G10. É sabido que o fator nuclear eritróide (Nrf2) é ativado em resposta à exposição UVB. Este fator ativa a expressão de uma bateria de enzimas de detoxificação de EROs e estimula a produção de antioxidantes, incluindo a GSH. (SCHAFER et al., 2010). Apesar de verificarmos a redução da atividade de GPx no grupo UVB, em acordo com o descrito por VAYALIL et al. (2003), o sistema de defesa antioxidante atua, cooperativamente, aumentando os níveis de GSH, como resposta ao mecanismo foto-adaptativo da pele. DIVYA et al (2015) relatam que GSH, em células expostas à UV, possui um papel central na coordenação do mecanismo antioxidante. Assim, P1G10 protegeu a depleção de GPx e manteve os níveis altos de GSH, com intuito de otimizar o mecanismo de redução e/ou eliminação de peróxido de hidrogênio.

A epiderme possui uma atividade antioxidante extremamente eficaz considerada superior à maioria dos tecidos (JENKINS, 2002), contudo, nesse modelo experimental, constatamos que UVB reduz a eficiência desse sistema, pois prejudicou o mecanismo de eliminação de peróxido hidrogênio através da redução da atividade de GPx. Ainda sobre irradiação UVB, o mecanismo de defesa da pele promoveu aumento, não apenas dos níveis de GSH, mas também, aumentou a atividade de CAT na tentativa de restituir, ao organismo, a homeostasia. Essas diferenças entre os componentes do sistema antioxidante são previsíveis em modelo de doses repetidas à UV, devido às distintas respostas ao estresse oxidativo, apresentadas em queratinócitos e fibroblastos, que refletem esse mecanismo (MARIONNET et al., 2010). Similarmente ao descrito na exposição dose única de UVB, o tratamento tópico com P1G10, em múltiplas doses, promoveu um acréscimo nos níveis da atividade de CAT, portanto auxiliando o sistema Glutaciona na remoção do peróxido de hidrogênio e prevenção de outros subprodutos mais reativos. De acordo com FILIP et al (2011), há diversos estudos sobre os efeitos das exposições repetidas à UVB e os biomarcadores de EROs, porém os resultados são variáveis e difíceis de serem interpretados, provavelmente, devido às modificações

adaptativas que surgem na pele e à aplicação de diferentes parâmetros experimentais. O conjunto das análises, dos parâmetros antioxidantes, sugere que as exposições repetidas à UVB se concentram na redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2). Por outro lado, o efeito de P1G10 se interpõe entre estimulação e proteção das moléculas antioxidantes nesse sistema, com objetivo de manter a eficácia do mecanismo de defesa antioxidante da pele.

Conforme descrito por HUR et al (2010) a preservação do sistema antioxidante auxilia na modulação de vias de sinalização, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, a fim de retardar o progresso da inflamação induzida por UVB. O presente trabalho apresentou um aumento de 40X nos níveis de IL-1 β em relação ao *sham*, este dado sugere uma participação importante da citocina na indução do dano tecidual, após múltiplas exposições à UVB. De fato, estudos apontam que IL1 β é responsável pela indução da inflamação cutânea (KIM et al., 2015) local e edema tecidual (FILIP et al., 2011; LEE et al., 2013;), além de desempenhar um papel importante na carcinogênese associada à inflamação (BENKO et al., 2008). Em nosso estudo, verificamos uma redução dos níveis de IL-1 β (Figura 49) nos animais que receberam topicamente P1G10. Sabe-se que, IL-1 β ativa NADPH-oxidase que aumenta os níveis de ânions superóxidos, estes responsáveis em ativar o fator NF κ B, estimulando a produção e liberação de citocinas inflamatórias (KIM et al., 2015). A ação inibitória de P1G10 sobre IL1 β mostra um efeito adicional da fração, além da eliminação de radicais livres, a inibição de produção de outras citocinas.

Seguindo a avaliação do efeito de P1G10 sobre os componentes que participam da inflamação cutânea, também, mensuramos os níveis da citocina TNF- α . Após exposições repetidas à UVB, observamos um aumento, significativo, dos níveis dessa citocina pró-inflamatória quando comparado ao *sham*. No entanto, os animais que receberam o tratamento tópico com P1G10 apresentaram os níveis de TNF- α reduzidos, em aproximadamente 3 vezes, conforme mostrado na Figura 49. Esse resultado sugere uma propriedade anti-inflamatória mostrada por P1G10, visto que, repetidas doses de UVB, implica em um acentuado aumento do processo inflamatório (FILIP et al., 2011). Esses dados são consistentes com a redução das alterações macroscópicas observadas em animais tratados com a fração que

apresentaram reações inflamatórias cutâneas reduzidas, como no caso da hiperemia. Também foi observado que o tratamento reduziu a aspereza e pigmentação cutânea. Esses efeitos foram compartilhados pela pentoxifilina, inibidora farmacológica da produção de TNF- α , que se mostrou efetiva na redução das alterações de pele que resultou, posteriormente, na diminuição de papilomas, induzidos quimicamente em camundongos (ROBERTSON et al., 1996).

Além disso, a análise da resposta histopatológica mostrou que P1G10 reduz o infiltrado inflamatório, observado na hipoderme. Esses dados foram confirmados pela análise morfométrica, que revelou redução, significativa, da celularidade, do tecido lesionado, em animais tratados com 1,0% de P1G10. Assim como observado no modelo de dose única, em doses múltiplas, P1G10 apresentou efeito anti-inflamatório, inferindo uma ação resolutiva da fração após a irradiação UVB.

Aliada a essas alterações morfológicas, observamos que a radiação promoveu um aumento da espessura da derme-hipoderme, assim como, também, da epiderme, em relação ao *sham*. Essa resposta da epiderme induzida pela radiação é indicativa de um processo proliferativo celular (EL-ABASERI et al., 2006). Tal efeito foi confirmado, em cortes histológicos, por imunomarcagem para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) que foi demonstrado que exposição UVB aumenta, significativamente, a expressão dessa proteína na pele (AHMED et al., 1999; ZHOU et al., 2011). Em conformidade, exposições repetidas à UVB promoveu aumento do número de células imunomarcadas, inferindo uma intensa atividade da divisão celular dos queratinócitos da epiderme (Figura 48). De acordo com DIVYA et al (2015), o aumento da proliferação de células da epiderme está associada à inflamação crônica induzida por doses múltiplas de radiação UVB. A abundância de células PCNA positivas pode indicar desordens dermatológicas malignas e não-malignas (GUILHERMO et al., 2012).

Conforme mostrado na Figura 48F, os animais tratados com P1G10 apresentaram redução, significativa, da imuno-reatividade para PCNA nas células da epiderme, ademais, do identificado na análise morfométrica, em relação a espessura dessa camada cutânea. Fica, assim, evidenciada uma efetividade da fração na prevenção da hiperplasia epidérmica, que pode estar associada com os efeitos

antioxidante e/ou anti-inflamatório de P1G10. Resultados similares foram obtidos por FISHER et al (1999) em ensaios com uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), como celecoxibe e indometacina, que mostraram que estas drogas são efetivas na inibição da proliferação mediada por UVB, em camundongos *Hairless*. Esses dados corroboram os obtidos em estudos sobre o envolvimento de COX2 em condições hiperproliferativas, incluindo o câncer (ZHAN & ZHENG, 2007; ZHOU et al., 2011). Em conformidade, outros estudos com AINES, como descritos por BURNS et al (2013) mostram o efeito preventivo do tratamento tópico com diclofenaco, em pele de camundongos *Hairless*, na inibição de COX2 e produção de prostaglandinas, além de diminuir tumores induzidos por repetidas doses de UVB. Em um trabalho conduzido por DIVYA et al (2015) é relatado que o uso tópico de extrato de amora preta inibe o dano oxidativo, inflamação e proliferação, pela modulação da via de sinalização MAP quinase e NFκB, em pele de ratos irradiados por UVB.

UVB induz estresse que desencadeia inflamação na epiderme, pela amplificação de vias de sinalização, como MAP quinases e PI3K/Akt (DHANWADA et al., 1995; SHARMA et al., 2007). Essas vias estão comumente envolvidas no processo de regulação de fatores de transcrição, como NFκB e AP-1 (CHOI et al., 2014), em respostas à vários estímulos extracelulares, como as citocinas TNF-α e IL1 (HOMMES et al., 2003). A fim de verificar se essas vias estariam envolvidas no mecanismo molecular de P1G10, após exposições repetidas à UVB, estudamos o efeito da fração sobre os níveis de fosforilação de p38, JNK MAP quinase e Akt. Como mostrado na Figura 55, P1G10, inibiu a fosforilação de Akt, confirmando os resultados obtidos, anteriormente, sobre o modelo de exposição dose única. Esse efeito é compartilhado com o da via MAP quinases (Figuras 53 e 54), onde observamos que o tratamento tópico reduziu, aproximadamente 50%, a fosforilação de p38 e JNK MAP quinases. A inibição dessas vias é alvo de estudo para o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias potentes, como os sintéticos da guanilhidrazonas, que atuam na supressão da ativação de macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α, IL1 e IL6, se mostrando efetivos, por exemplo, em artrite induzida em ratos (LARSSON et al., 2005). O mecanismo anti-inflamatório das guanilhidrazonas ocorre através de interferência na fosforilação ou ligação competitiva com o sítio de ligação ao ATP das proteínas quinases

(HOMMES et al., 2003). Essa ação resulta na redução da expressão de AP-1 e, conseqüentemente, na inibição da transcrição de mediadores inflamatórios (KIM et al., 2013). Estudos conduzidos por CHOI et al (2014) mostraram a eficácia da rutina (flavonóide) na inibição da expressão de COX2 e iNOS, induzidos por UVB, através da inibição da fosforilação de p38 e JNK MAP quinases. Além disso, estudos têm demonstrado o efeito anti-inflamatório da protease, bromelina, associado à redução da expressão de NFκB e atividade de COX2, também, mediado pela inibição das vias de sinalização MAP quinases (HOU et al., 2006), além de PI3K/Akt (BHUI et al., 2009).

A via de sinalização MAP quinases têm sido um assunto de grande interesse para elucidar os mecanismos de respostas celulares à UVB. Estudos sugerem uma relação estreita entre a ativação de JNK e p38 quinases e a produção de metaloproteinases, como a MMP-9 (RITTIÉ & FISHER, 2002). De acordo com ANGGAKUSUMA & HWANG (2010) e KIM et al (2012) relatam que a expressão de MMP-9 está associada à fosforilação de MAP quinases que induzem a fosforilação da proteína c-Jun e a expressão da proteína c-Fos seguida da formação do complexo AP-1. Este complexo é responsável pela regulação da transcrição de MMP-9. BRENNEISEN et al (2002) relatam um aumento significativo da atividade de JNK, em cultivo de fibroblastos da derme humana, bem como a detecção da transcrição de c-Jun após a irradiação com UVB, em baixas doses. Nossos resultados mostraram que UVB, além de estimular a expressão de MAP quinases, também ativaram a atividade da forma latente e ativa de MMP-9 (Figura 50). Além disso, observamos, em cortes histológicos, que a pele dos animais irradiados apresentavam fibras colágenas espessas e desorganizadas. O tratamento com P1G10 mostrou eficaz na redução de, aproximadamente, 50% da atividade de MMP9 e, em cortes histológicos, observamos que a fração protegeu as estruturas da derme da pele dos animais, similar ao modelo experimental anterior.

Nossos resultados mostram que P1G10, em modelo de doses múltiplas de UVB, modula o sistema antioxidante, inibe a formação de EROs, progresso da inflamação e a proliferação. Além disso, a fração inibe a atividade de MMP-9 e exerce o seu efeito protetor contra degradação da MEC. Em adição P1G10 inibe a sinalização de JNK e p38 MAP quinases e PI3/Akt que estão envolvidos nos

diferentes eventos, mencionados acima (Figura 58). Esses dados sugerem um efeito protetor de P1G10 contra os danos, sucessivos, promovidos pela radiação.

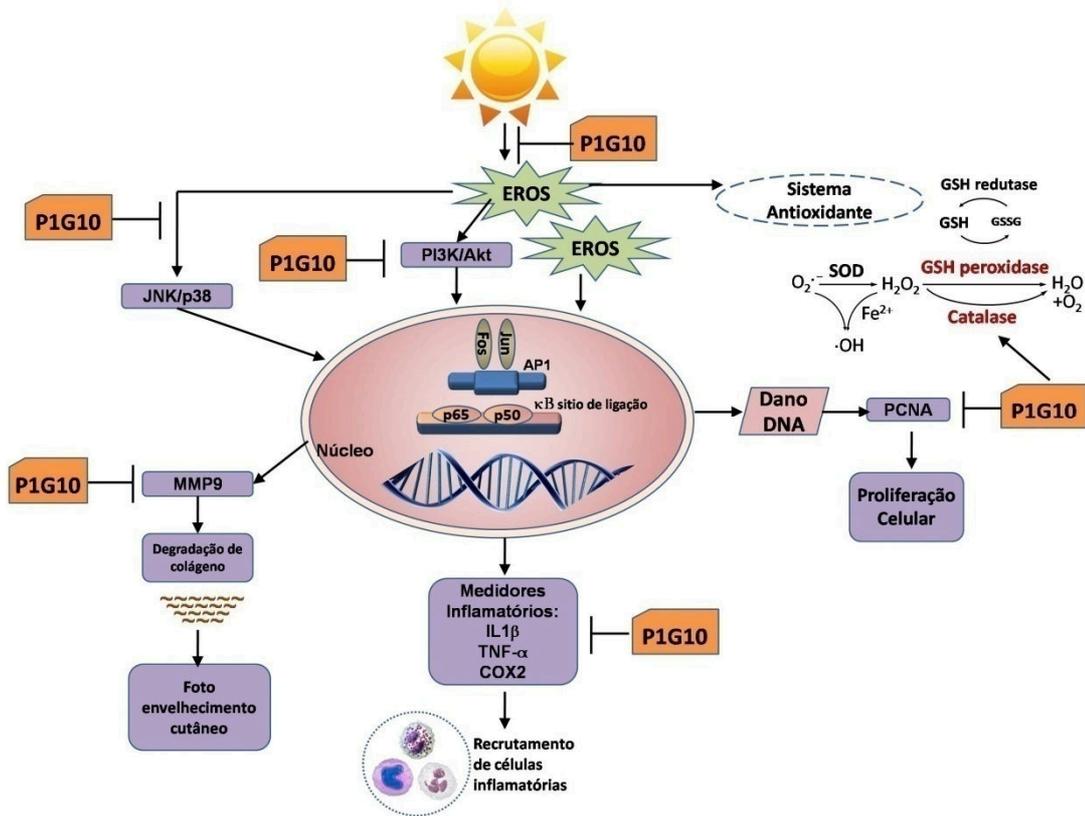


Figura 58 - Diagrama esquemático mostrando o efeito de P1G10 em alterações celulares e moleculares induzidas por doses múltiplas à UVB. P1G10 previne os danos induzidos por UVB pela inibição de EROs, processo inflamatório, degradação de colágeno e proliferação. Além disso, interfere na via JNK/p38 MAP quinases e Akt e, modula o sistema de defesa antioxidante. As palavras, em vermelho, indicam as moléculas envolvidas pelo efeito de P1G10 no sistema antioxidante.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que P1G10 contribui para a eliminação de radicais livres, participando de uma forma importante no sistema de defesa antioxidante. Além disso, podemos confirmar o efeito anti-inflamatório da fração que aliado à atividade antioxidante reduzem os danos promovidos por UVB, mostrados pela inibição e/ou modulação de proteínas regulatórias que participam desse processo.

08 - REFERÊNCIAS

AFAQ, F., MUKHTAR, H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways, *J. Photochem. Photobiol. B*, v.63, p.61–69. 2001.

AFAQ, F., ADHAMI, V. M., AHMAD, N., MUKHTAR, H. Inhibition of ultraviolet B-mediated activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green tea Constituent (-)-epigallocatechin-3- gallate. *Oncogene*, v. 22, n. 7, p. 1035-44, Feb 20 2003.

AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem Photobiol B*, v.63, n.1-3, p.61-69. 2001.

AFONSO, V., CHAMPY, R., MITROVIC, D., COLLIN, P., LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, v.74, p.324-329. 2007.

AGOSTINIS, P., BERG, K., CENGEL, K. A. Photodynamic therapy of cancer: An update. *Cancer Journal for Clinicians*, v.61, n.4, p.250-281. 2011.

AHMED, N. U., UEDA, M., AND ICHIHASHI, M. Induced expression of p16 and p21 proteins in UVB-irradiated human epidermis and cultured keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, v.19, p.175-181. 1999.

ALLEMANN, I. B.; BAUMANN, L. Botanicals in Skin Care Products. *Int J Dermatol.*, v.48, p.923- 934. 2009.

ALTIERI, F., GRILLO, C., MACERONI, M., CHICHIARELLI, S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, v.10, n.5, p.891–937. 2008.

AMARO-ORTIZ, A., YAN, B., D’ORAZIO, J. A. Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules*, v. 19, n.5, p.6202-6219. 2014.

AMRI, E. and MAMBOYA, F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review, Am. . *Biochem. Biotechnol.*, v.8, p.99-104. 2012.

ANGEL, P., SZABOWSKI, A., SCHORPP-KISTNER, M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*, 20:2413-23 (2001).

ANGGAKUSUMA, YANTI, HWANG, J. K. Effects of macelignan isolated from *Myristica fragrans* Houtt. on UVB-induced matrix metalloproteinase-9 and cyclooxygenase-2 in HaCaT cells. *J Dermatol Sci.*, v.57, n.2, p.114-22. 2010.

ANSARI, K. M., RUNDHAUG, J. E., FISCHER, S. M. Multiple signaling pathways are responsible for prostaglandin E2-induced murine keratinocyte proliferation. **Mol. Cancer Res.**, v.6, p.1003-1016. 2008.

APTE, R. N., VORONOV, E. Interleukin-1-a major pleiotropic cytokines in tumor-host interactions. **Semin. Cancer Biol.**, v.12, p.277-290. 2002.

ARAUJO-SILVA, A. C., LEMOS, F. O., GOMES, M. T. R.,; SALAS, C. E.,; LOPES, M. T. P. . Role of gastric acid inhibition, prostaglandins and endogenous-free thiol groups on the gastroprotective effect of a proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, p. 133-141, 2015.

ARMSTRONG, J. S., WHITEMAN, M., YANG, H., JONES, D. P., STERNBERG, P. Jr. Cysteine starvation activates the redox-dependent mitochondrial permeability transition in retinal pigment epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v.45, n.11, p.4183-9. 2004.

AUBIN, F., MOUSSON, C. Ultraviolet lighth-induced regulatory (supressor) T cells: an approach for promoting induction of operational allograft tolerance? **Transplantation**, v.77, n.1, p. 29-31. 2004.

AYALA, A., MUÑOZ, M. F., ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-ydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2014. Article ID 360438, 31 p. 2014

AZULAY, R. D, AZULAY, D. R. AZULAY-ABULAFIA, L. **Dermatologia**. 6. ed. 2638p, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

BABA, T., HANADA, K., HASHIMOTO, I. The study of ultraviolet B-induced apoptosis in cultured mouse keratinocytes and in mouse skin. **Jorn. Dermatol. Science**, v.12, p.18-23. 1996.

BACKVALL, H; WOLF, O; HERMELIN, H; WILTZEBERG, E; PONTEN, F. The density of epidermal p53 clones is higher adjacent to squamous cell carcinoma in comparison with basal cell carcinoma. **Br J Dermatol**, v.150,p.259-66. 2004.

BALBINO, C.A.; PEREIRA L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p. 27-50. 2005.

BALDASSARE, J. J., BI, Y. & BELLONE, C. J. The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in IL-1 β Transcription. **J. Immunol.**, v.162, p.5367-5373. 1999.

BANSAL, M., KAUSHAL, N. **Oxidative Stress Mechanisms and their Modulation**. New Delhi, India, Spinger Ed., 167p. 2014

BANSAL, M., KAUSHAL, N. **Oxidative Stress Mechanisms and their Modulation.** New Delhi, India, Springer Ed., 167p. 2014

BARCELOS, L. S., DUPLAA, C., KRÄNKEL, N., GRAIANI, G., INVERNICI, G., KATARE, R., SIRAGUSA, M., MELONI, M., CAMPESI, I., MONICA, M., SIMM, A.,

CAMPAGNOLO, P., MANGIALARDI, G., STEVANATO, L., ALESSANDRI, G., EMANUELI, C., MADEDDU, P. Human CD133+ progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling. **Circulation Research**, v.104, p.1095-1102. 2009.

BARNES, P., KARIN, M. Nuclear factor J B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med.**, v.336, p.1066–1071. 1997.

BASHIR, M. M., SHARMA, M. R., WERTH, V. P. TNF-alpha production in the skin. **Arch Dermatol Res.**, v.301, n.1, p.87-91. 2009

BASU, A., HALDAR, S. The relationship between BCL2, BAX and p53: Consequences for cell cycle progression and cell death. **Molecular Human Reproduction** , v.4, n.12, p.1099-109. 1999.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** São paulo/sp: edart, editora da universidade de são paulo, 1976.

BENCHIMOL, S. p53-dependent pathways of apoptosis. **Cell Death Differ.**, v.8, p.1049–1051. 2001.

BENEDETTO, A. V. DO. The environment and skin aging. **Clinics in Dermatology**, v.16, p.129-139. 1998

BENJAMIN, C. L, ULLRICH, S. E, KRIPKE, M. L., ANANTHASWAMY, H. N. P53 tumor suppressor gene a critical molecular target for UV Induction and prevention skin cancer. **Photochem. Photobiol.**,v, p.84 55-62. 2008.

BENKO, S., TOZSER, J., MIKLOSSY, G., VARGA, A., KADAS, J., CRUSTAK, A., BERTA, A., RAJNAVOLGYI, E. Constitutive and UV-B modulated transcription of Nod-like receptors and their functional partners in human corneal epithelial cells. **Mol. Vis.**, v.14, p.1575-1583. 2008.

BHUI, K., PRASAD, S., GEORGE, J., SHUKLA, Y. Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. **Cancer Letters**, v.282, p.167-176. 2009.

BHUI, K., PRASAD, S., GEORGE, J., SHUKLA, Y. Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. **Cancer Lett.**, v.282, n.2, p.167-76. 2009.

BICKERS, D. R., ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol.*, v.126, p.2565–2575. 2006.

BINIEK, K., LEVI, K., DAUSKARDT, R. H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc Natl Acad Sci.*, v.109, p.17111–17116. 2012.

BISHAYEE, A. Cancer Prevention and Treatment with Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trials. *Cancer Prev. Res.*, v.2, p.409-418. 2009.

BLACK, A. T., GRAY, J. P., SHAKARJIAN, M. P., MISHIN, V., LASKIN, D. L., HECK, D. E., LASKIN, J. D. UVB light upregulates prostaglandin synthases and prostaglandin receptors in mouse keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.232, n.1, p.14–24. 2008.

BLACK, H. S. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochemistry and Photobiology.*, v.46, p.213-221. 1987.

BLACK, H. S., deGRUIJL, F. R., FORVES, P. D., CLEAVER, J. E., ANANTHASWAMY, H. N., deFABO, E. C., ULLRICH, S. E., TYRRELL, R. M. Photocarcinogenesis: an overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology.*, v.40, p.29-47. 1997.

BORLON, C., VANKONINGSLOO, S., GODARD, P., DEBACQ-CHAINIAUX, F., TOUSSAINT, O. Identification of p53-dependent genes potentially involved in UVB-mediated premature senescence of human skin fibroblasts using siRNA technology. *Mech Ageing Dev.*, v.129, n.3, p.109-119. 2008.

BOWDEN, G.T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nat Rev Cancer.* v4, p.23-35. 2004.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.*, v. 72, p.248-254. 1976.

BRAGA, A. D. Efeito da fração proteolítica do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, P1G10, sobre o processo inflamatório tumoral. 2013. 133f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

BRAVO, L. M.; HERMOSILLA, J.; SALAS, C. A biochemical comparison between latex from *C. candamarcensis* and *C. papaya*. *Braz J Med Biol Res.* v.27, p.2831-2862. 1994.

BRENNEISEN, P., SIES, H., SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. *Ann. N. Y. Acad. Science*, v.973, p.31-43. 2002.

- BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. ***Biochim Biophys Acta***, v. 1477, n.1-2, p.267-83. 2000.
- BURNS, E. M., TOBER, K. L., RIGGENBACH, J. A., SCHICK, J. S., LAMPING, K. N., KUSEWITT, D. F., YOUNG, G. S., OBERYSZYN, T. M. Preventative topical diclofenac treatment differentially decreases tumor burden in male and female Skh-1 mice in a model of UVB-induced cutaneous squamous cell carcinoma. ***Carcinogenesis***, v.34, n.2, p.370–377. 2013.
- CALIARI, M.V. **Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes**. Ed. UFMG, 149p. 1997.
- CALO, R., MARABINI, L. Protective effect of Vaccinium myrtillus extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). ***J Photoch Photobio B.***, v.132, p.27–35. 2014.
- CAMPANINI, M. Z., PINHO-RIBEIRO, F. A., IVAN, A. L., FERREIRA, V. S., VILELA, F. M., VICENTINI, F. T., MARTINEZ, R. M., ZARPELON, A. C., FONSECA, M. J., FARIA, T.J., BARACAT, M. M., VERRI, W. A. J. R., GEORGETTI, S. R., CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in *hairless* mice. ***J Photochem. Photobiol. B.***, v.127, p.153-160. 2013.
- CAMPBELL, J., CIESIELSKI, C. J., HUNT, A. E., HORWOOD, N. J., BEECH, J. T., HAYES, L. A., DENYS, A., FELDMANN, M., BRENNAN, F. M., FOXWELL, B. M. J. Novel Mechanism for TNF- α Regulation by p38 MAPK: Involvement of NF- κ B with Implications for Therapy in Rheumatoid Arthritis. ***J. Immunol.***, v.173, n.11, p.6928-6937. 2004.
- CAMPOS, P.P ; VASCONCELOS, A.C. ; FERREIRA, M. A. N. D. ; ANDRADE, S. P. Alterations in the dynamics of inflammation, proliferation and apoptosis in subcutaneous implants of lupus-prone mice. ***Histology and Histopathology***, v.26, p.433-442. 2011.
- CASAGRANDE, R; GEORGETTI, S. R; VERRI, W. A; DORTA, D. J; SANTOS, A. C; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in *hairless* mice. ***Photochemistry and Photobiology***, v. 84, p.21-27. 2006.
- CAYROL, C., KNIBIEHLER, M., DUCOMMUN, B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. ***Oncogene***, v.16, p.311-320. 1998.
- CHANDRA, J., SAMALI, A., ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. ***Free Radical Biol. Med.***, v.29, n.3, p.323-333. 2000.
- CHANG, H. Y., YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of Caspases. ***Microbiol. Molec. Biology Review***, v.64, n.4, p. 821-846. 2000.

CHEN, W., BOWDEN, T. Activation of p38 MAP kinase and ERK are required for ultraviolet-B induced c-fos gene expression in human keratinocytes. **Oncogene**, v.18,, p.7469-7476. 1999.

CHEN, Z. J., PARENT, L., MANIATIS, T. Site-specific phosphorylation of ikappabalpha by novel ubiquitination-dependet protein kinase activity. **Cell**, v. 84, p.853-862. 1996.

CHENG, C. Y., HSIEH, H. L., HSIAO, L. D, YANG, C. M. PI3-K/Akt/JNK/NF-κB is essential for MMP-9 expression and outgrowth in human limbal epithelial cells on intact amniotic membrane. **Stem Cell Res.**, v.9, n.1, p9-23. 2012.

CHOI, K. S., KUNDU, J. K., CHUN, K. S., NA, H. K., SURH, Y. J. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in *hairless* mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. **Arch Biochem Biophys.**, v.559,p.38-45. 2014.

CHRISTIANO, S. C. Avaliação das atividades pró e anti-inflamatória de fração proteolítica obtida do látex de *Carica candamarcensis*. 75f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.

CHUN, K-S., AKUNDA, J., LANGENBOCH, R., Cyclooxygenase-2 inhibits UVB-induced apoptosis in moue skin by activating the prostaglandin E2 receptor, EP2 e EP4. **Cancer Res.**, v.67, p.2015-2021. 2007.

CHUNG, K. Y., CHANG, N. S., PARK, Y. K., LEE, K. H. Effect of Ultraviolet Light on the Expression of Adhesion Molecules and T Lymphocyte Adhesion to Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. **Yonsei Med J.**, v.43, n.2, p.165-174. 2002.

CLYDESDALE, G. J., DANDIE, G. W., MULLER, H. K. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. **Immunol Cell Biol.** 2001 ,v.79, n.6, p.547-68. 2001.

COTRAN, Ramzi S.; ABBAS, Abul K.; FAUSTO, Nelson; ROBBINS, Stanley L.; KUMAR, Vinay: **Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1592p. 2005.

D'ORAZIO, J., JARRETT, S., AMARO-ORTIZ, A., SCOTT, T. UV Radiation and the Skin. **International Journal of Molecular Sciences.**, v.14, n.6, p.12222-12248. 2013.

DENNIS,L.K; VANBEEK, M.J; FREEMAN, L.E; SMITH, B.J; DAWSON, V; COUGHLIN, J.A. Sunburns and Risk of Cutaneous Melanoma: Does Age Matter? A Comprehensive Meta-Analysis. **Annals of Epidemiology**, v.18, n.8, p.614-627. 2008.

DEVARY, Y., ROSETTE, C., DIDONATO, J. A.; KARIN, M. NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. **Science**, v.261, p. 1442-1445. 1993.

DHANWADA, K. R., DICKENS, M., NEADES, R., DAVIS, R., PELLING, J. Differential effects of UVB and UVC components of solar radiation on MAP kinase signal transduction pathways in epidermal keratinocytes. **Oncogene**, v.11, p.1947–1953. 1995.

DI LORENZO, A., FERNANDEZ-HERNANDO, C., CIRINO, G., SESSA, W. S. AKT1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.34, p.14552-14557. 2009.

DIVYA, S. P., WANG, X., PRATHEESHKUMAR, P., SON, Y. O., ROY, R. V., KIM D., DAI, J., HITRON, J. A., WANG, L., ASHA, P., SHI, X., ZHANG, Z. Blackberry extract inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation through MAP kinases and NF- κ B signaling pathways in SKH-1 mice skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.284, n.1, p.92–99. 2015.

DUTHIE, M. S., KIMBER, I., DEARMAN, R. J., NORVAL, M. Differential effects of UVA1 and UVB radiation on Langerhans cell migration in mice. **J. Photochemistry and Photobiology**, v.57, p.123-131. 2000.

DWIVEDI, A. H., PILLAI, S. G. Photosensitized reactions: an important route of reaction in photochemistry. **International Journal of Advanced Technology in Engineering and Science**, v. 2, p.1-4. 2014.

EL-ABASERI, TB., PUTTA, S., HANSEN, L. A. Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. **Carcinogenesis**, v.27, n.2, p. 225–231. 2006.

ELDER, D. E. **Lever: histopatologia da Pele**. ed. 10, Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, pp.1193. 2009.

ELIAS, R. J., KELLERBY, S. S., DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.48, n.5, p.430-41. 2008.

ERUSLANOV, E., KUSMARTSEV, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. **Methods Mol Biol**, v.594, p.57-72. 2010.

ESTAÇÃO DIGITAL MÉDICA. Pinta na pele: sistema para o aprendizado do reconhecimento precoce de cânceres da pele. Disponível em: <<http://www.saudeparavoce.com.br/pintanapele>>. Acesso em 27 set.2016.

FERNANDO, P. M., PIAO, M. J., HEWAGE, S. R., KANG, H. K., YOO, E. S., KOH, Y. S., KO, M. H., KO, C. S., BYEON, S. H., MUN, S.R., LEE, N. H., HYUN, J. W. Photo-protective effect of sargachromenol against UVB radiation-induced damage through modulating cellular antioxidant systems and apoptosis in human keratinocytes. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.43, p.112-119. 2016.

FERNANDO, P. M. D. J., PIAO, M. J., KANG, K. A., RYU, Y. S., HEWAGE, S. R. K. M., CHAE, S. W., HYUN, J. W. Rosmarinic Acid Attenuates Cell Damage against UVB Radiation-Induced Oxidative Stress via Enhancing Antioxidant Effects in Human HaCaT Cells. **Biomol Ther**, 24(1): 75-84 (2016).

FERRARA, N., KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature** 438, 967–974. 2005.

FERREIRA JÚNIOR M, BATISTA, S. A, VIDIGAL, P. V, CORDEIRO, A. A, OLIVEIRA, F. M, PRATA, L. O, DINIZ, A. E, BARRAL, C. M, BARBUTO, R. C, GOMES, A. D, ARAÚJO, I. D, QUEIROZ, D. M, CALIARI, M. V. Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected *Mongolian gerbils* (*Meriones unguiculatus*). **Eur J Histochem.**, v.59, n.2, p.2489. 2015.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v.43, n.1, p.61-8. 1997.

FIGUEIREDO C. (2009). Avaliação das propriedades antitumoral e antimetastática de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* em modelo de melanoma murino. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

FIGUEIREDO, S. A. VILELA, F.M., DA SILVA, C. A., CUNHA, T. M., DOS SANTOS, M. H., FONSECA, M. J.I. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.131, n.0, p. 65-73. 2014.

FILIP, A; DAICOVICIU, D; CLICHICI, S; MOCAN, T; MURESAN, A; POSTESCU, I. D. Photoprotective of two natural products on Ultraviolet B-induced oxidative stress and apoptosis in SKH-1 mouse skin. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.7-8, p. 761-766. 2011a.

FILIP, A; DAICOVICIU, D; CLICHICI, S; MOCAN, T; MURESAN, A; POSTESCU, I. D. The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.105, p.133-142. 2011b.

FILIP, G. A., POTESCU, I. D., BOLFA, P., CATOI, C., MURESAN, A., CLICHICI, S. Inhibition of UVB-induced skin phototoxicity by a grape seed extract as modulator of nitrosative stress, ERK/NFκB signaling pathway and apoptosis, in SKH-1 mice. **Food and Chemical Toxicol.**, v.57, p.296-306. 2013.

FISCHER, S. M., LO, H. H., GORDON, G. B., SEIBERT, K., KELLOFF, G., LUBET, R. A., CONTI, C. J. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. **Mol Carcinog.**, v.25, n.4, p.231-40. 1999.

FISCHER, T. W., ZBYTEK, B., SAYRE, R. M., APOSTOLOV, E. O., BASNAKIAN, A. G., SWEATMAN, T. W. Melatonin increases survival of hacat keratinocytes by suppressing Uv-induced apoptosis. **J. Pineal Res.**, v.40, p.18–26. 2006.

FITC, M. E., CROSS, I. V., FORD, J. M. p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV-irradiation-induced DNA damage, in vivo. **Carcinogenesis**, v.24, n.5, p.843-850. 2003.

FITCH, R. B., SWAIM, S. E. The role of epithelialization in wound healing. **Small Animal Wound Healing**, v.17, p.167-77. 1995.

FONSECA, Y. M., CATINI, C. D., VICENTINI, F. T, CARDOSO, J. C., CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L, VIEIRA, M. J. F. Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress. **J. Pharm. Science**, v.100, n.6, p. 2182-2193. 2011.

FONSECA, Y. M., CATINI, C. D., VICENTINI, F. T., NOMIZO, A., GERLACH, R. F., FONSECA, M. J. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **J Ethnopharmacol.** , v.127, n.3, p.596-601. 2010.

FOOTE, C.S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. **Photochem. Photobiol.**, v.54, p.659. 1991.

FOOTE, C.S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. **Photochem Photobiol.** , v. 54, n.5, p.659. 1991.

FRANCO, R., DEHAVEN, W. I, SIFRE, M. I., BORTNER, C. D., CIDLOWSKI, J. A. Glutathione Depletion and Disruption of Intracellular Ionic Homeostasis Regulate Lymphoid Cell Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n.52, p. 36071-36087. 2008.

FRANCO, R., CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis and glutathione: beyond and antioxidant – Review. **Cell Death and Differentiation**, v.16, p.1303-1314. 2009.

FRANCO, R., CIDLOWSKI, J. A. Glutathione efflux and cell death. **Antioxid Redox Signal.**, v.17, n.12, p.1694-713. 2012.

FREITAS, K M. Avaliação dos efeitos da fração proteolítica P1G10 de *Vasconcellea cundinamarcensis* sobre a cicatrização de lesões cutâneas excisionais em camundongo. 75f. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.

FUCHS, J. Potential and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radic. Biol. Med.**, v.25, p.848-873, 1998.

FUKAI, T., USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.15, n.6, p.1583-1606. 2011.

G J FISHER, G. J., TALWAR, H. S., LIN, J., LIN, P., MCPHILLIPS, F., WANG, Z., LI, X., WAN, Y., KANG, S., VOORHEES, J. J. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest.*, v.101, n.6, p.1432–1440. 1998.

GARCÍA, M., LLAMES S., GARCÍA, E., MEANA, A., CUADRADO, N., RECASENS, M., PUIG, S., NAGORE, S., ILLERA, N., JOCANO, J. L., DEL RIO, M. *In Vivo* Assessment of Acute UVB Responses in Normal and Xeroderma Pigmentosum (XP-C) Skin-Humanized Mouse Models. *The american journal of pathology*, v. 177, n. 2, 865–72. 2010.

GEURTS, N., OPDENAKKER, G., VAN DEN STEEN, P. E. Matrix Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology & Therapeutics.*, v.133, n.3, p.257-279. 2011.

GIACOMONI, P. U. **Biophysical and Physiological Effects of Solar Radiation on Human Skin.** Cambridge, UK: RSC Publishing; 2007.

GILLET, R., GRIMBER, G., BENNOUN., FROMENTEL, C. C., BRIAND, V., JOULIN, V. The consequence of p53 overexpression for liver tumor development and the response of transformed murine hepatocytes to genotoxic agents. *Oncogene*, v.19, n.31, p.3498-3507. 2000.

GOMES, F. S. L. Efeito da fração proteolítica de *Carica candamarsensis* na cicatrização cutânea: avaliação pré-clínica e clínica Fase I. 230 f. (Tese de doutorado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

GOMES, F.S.; SPINOLA CDE, V.; RIBEIRO, H.A.; LOPES, M.T.; CASSALI, G.D.; SALAS, C.E. Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. *Burns*, v.36, p.277–283. 2010.

GOMES, M. T. R. Caracterização bioquímica e farmacológica de proteases do látex de *Carica candamarcensis* com atividade mitogênica. 146 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.

GOMES, M. T.R.; BEMQUERER, M. P.; LOPES, M. T. P. The structure of CMS2MS2, a mitogenic protein isolated from *Carica candamarcensis*. *Biol. Chem.*, v.388, p.819-82. 2007.

GONZALES, M. D. H., PAL, M. L., FERRARI, A., WEILL, F. S., CZERNICZYNYEC, A., LEONI, J., BUSTAMANTE, J. Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, v.16, p.311-317. 2005.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A., LE NAOUR, R., GANGLOFF, S. C., GUENOUNOU, M. Differential regulation of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 in UVB-

irradiated human keratinocytes via cyclic AMP/protein kinase A pathway. **Cytokine**, v. 23, n.4-5, p.138-49. 2003.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**; v.126:131-8. 1982.

GREEN, L. C, WAGNER, D. A, GLOGOWSKI J, SKIPPER, P. L, WISHNOK J. S, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**., v.126, p.131-8. 1982.

GROTTO, D., MARIA, L. S., VALENTINI, J., PANIZ, C., SCHMITT, G., GARCIA, S. C., POMBLUM, V. J., ROCHA, J. B. T., FARINA, M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quim. Nova**, v.32,n.1, p.169-174. 2009

GUILLERMO, R. F., ZHANG, X., KAUSHIK, R. S., ZEMAN, D., AHMED, S. A., KHALIFA, S., FAHMY, H., DWIVEDI, C. Dose-Response on the Chemopreventive Effects of Sarcophine-Diol on UVB-Induced Skin Tumor Development in SKH-1 Hairless Mice. **Mar Drugs**., v.10, n.9, p.:2111-2125. 2012.

HALL, P. A., MCKEE, P. H., MENAGE, H. D., DOVER, R., LANE, D. P. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. **Oncogene**., v.8, n.1, p.203–207. 1993.

HALLIWELL B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**., v.141, n.2, p.312-322. 2006.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, n.2, p. 1-85. 1990.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford, UK. Second edition, Oxford University Press .1989

HAN, W., MING, M., HE, YU-YING . Caffeine Promotes Ultraviolet B-induced Apoptosis in Human Keratinocytes without Complete DNA Repair. **The journal of biological chemistry**, v.286, n.26, p. 22825–22832. 2011.

HAN, W.,MING, M.,HE, Y. Y. Caffeine promotes ultraviolet B-induced apoptosis in human keratinocytes without complete DNA repair. **J Biol Chem**., v. 286, n.26, p. 22825-32. 2011.

HANCOCK, J. T., DESIKAN, R., NEILL, S. J. Role of reactive oxygen in cell signalling pathways. **Biochemical Society Transactions**, v.29, n.2, p.345-350. 2001.

HARRIS, R. B; ALBERTS, D. S. Strategies for skin cancer prevention. **Int. J. Dermatol.**, v.43, n.4, p.243-51. 2004.

HAWKINS, P. T., STEPHENS, L. R. PI3K signalling in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1851, p.882–897. 2015.

HENKELS, K. M., FRONDORF, K., GONZALEZ-MEJIA, M. E., DOSEFF, A. L., GOMEZ-CAMBRONERO, J. IL-8-INDUCED NEUTROPHIL CHEMOTAXIS IS MEDIATED BY JANUS KINASE 3 (JAK3). **FEBS letters.**, v.585, n.1, p.159-166. 2011.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Antification of lipid peroxidation in tissue extracts based on fe(iii)xylene orange complex formation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.19, n.3, p. 271-280. 1995.

HERRLING, T., JUNG, K., FUCHS, J. UV-generated free radicals (FR) in skin and hair-Their formation, action, elimination and prevention. A general view. **SOFW J**, v. 133, p.2-11. 2007.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **J. Immunol. Meth.**, v. 82, p. 253-259, 1985.

HISSIN, P. J., HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, v. 74, P. 214-226. 1976.

HOMMES, D. W., PEPPELENBOSCH, M. P., VAN DEVENTER, S. J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. **Gut.**,v.52, n.1, p.144-51. 2003.

HONEYCUTT, K.A; KOSTER, M.I; ROOP, D.R. Genes involved in stem cell fate decisions and commitment to differentiation play a role in skin disease. **Journal Invest Dermatol Symp Proc.** v.9, n.3,p.261-8. 2004.

HONG, C. H., CHANG, K. L., WANG, H. J., YU, H. S., LEE, C. H. IL-9 induces IL-8 production via STIM1 activation and ERK phosphorylation in epidermal keratinocytes: A plausible mechanism of IL-9R in atopic dermatitis. **J Dermatol Sci.**, v.78, n.3, p.206-214. 2015.

HOU, R. C, CHEN, Y. S., HUANG, J. R., JENG, K. C. Cross-linked bromelain inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production involving cellular signaling suppression in rats. **J. Agric. Food Chem.**, v.54(6):2193-8. 2006.

HSEU, Y-C., CHOU, C-W., KUMAR, K. J. S., FU, K-T., WANG, H-M., HSU, L-S., KUO, Y-H., WU, C-R., CHEN, S-C., YANG, H-L. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. **Food Chem. Toxicol.**, v.50, p.1245–1255. 2012.

HU, X., BEETON, C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. **J. VIS. EXP.** (45), E2445. 2010.

HUANG, J. R., WU, C. C., HOU, R. C., HENG, K. C. Bromelain inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in human THP-1 monocytes via the removal of CD14. ***Immunol Invest***, v.37, n.4, p.263-277. 2008.

HUR, S., LEE, Y. S., YOO, H., YANG, J. H, KIM, T. Y. Homoisoflavanone inhibits UVB-induced skin inflammation through reduced cyclooxygenase-2 expression and NF-kappaB nuclear localization. ***J Dermatol Sci.***, v.59, n.3, p.163-169. 2010.

HUSSAIN, S. P., HOFSETH, L. J. & HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. ***Nature Rev. Cancer***, v.3,, p.276–285. 2003.

HYUN, Y. J., PIAO, M. J., KO, M. H., LEE, N. H., KANG, H. K., YOO, E. S., ... HYUN, J. W. Photoprotective effect of *Undaria crenata* against ultraviolet B-induced damage to keratinocytes. ***Journal of bioscience and bioengineering***, v.116, n.2, p.256–64. 2013.

IBUKI, Y., AKAIEM, M., TOYOOKA, T. PI3-kinase/Akt pathway mediates expression of p53 after UVB irradiation. ***Genes and Environment.***, v.32, n.4, p.85-91. 2010.

IIZAWA, O., KATO, T., TAGAMI, H., AKAMATSU, H., NIWA, Y. Long-term follow-up study of changes in lipid peroxide levels and the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in mouse skin after acute and chronic UV irradiation. ***Arch. Derm. Res.***, v.286, n.47–52. 1994.

IM, A. R., SONG, J. H., LEE, M. Y., CHAE, S. Magnolol reduces UVB-induced photodamage by regulating matrix metalloproteinase activity. ***Environ Toxicol Pharmacol.***, v.39, n.1, p.417-23. 2015.

INCA. Estimativa 2015: Incidência de câncer no Brasil. CÂNCER, I. N. D. Rio de

IOBST, S.; SANTHANAM, U.; WEINKAUF, R. L. ***Biotechnology in Skin Care (I): Overview***. New York, Ed. Taylor & Francis. 117-122. 2006.

ISHIDA, T. and SAKAGUCHI, I. Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*. ***Biology Pharm Bull***, v.30, n.5, p.928-934. 2007.

IVAN, A. L., CAMPANINI, M. Z., MARTINEZ, R. M., FERREIRA, V. S., STEFFEN, V. S., VICENTINI, F. T., VILELA, F. M., MARTINS, F. S., ZARPELON, A. C., CUNHA, T. M., FONSECA, M. J., BARACAT, M. M., GEORGETTI, S. R., VERRI, W. A. J. R, CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in *hairless* mice and exhibits antioxidant activity in vitro. ***Journal of Photochemistry and Photobiology B***, v.138, p. 124-133. 2014.

JACKSON, M. Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation. ***Proceedings of the Nutrition Society***, 58: 673-676 (1999). Janeiro: 124 p. 2015.

JENA, N. R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *Journal of Biosciences.*, v.37,n.3,p.503–517. 2012.

JENKINS, G. Mechanisms of Ageing and Development. *Molecular mechanisms of skin ageing.*, v.123, n.7, p.801-810. 2002.

JIANG, W., ANANTHASWAMY, H. N., MULLER, H. K., KRIPKE, M. L. p53 protects against skin cancer induction by UVB-radiation. *Oncogene*, v.18, n.29, p.4247-4253. 1999.

JIANG, W., ANANTHASWAMY, H. N., MULLER, H. K., KRIPKE, M. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*, v.18, p.4247-4253. 1999.

JIN, G. H., LIU, Y., JIN, S. Z., LIU, X. D., LIU, S. Z. UVB induced oxidative stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents. *Radiat Environ Biophys.*, v.46, n.1, p. 61-68. 2007.

JUNG, K., SEIFERT, M., HERRLING, T., FUCHS, J. UV-generated free radicals (FR) in skin: Their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents . *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, v.69, p.1423–1428. 2008.

JUNG, Y. D., FAN, F., MCCONKEY, D. J., JEAN, M. E., LIU, W., REINMUTH, N., STOELTZING, O., AHMAD, S. A., PARIKH, A. A., MUKAIDA, N., ELLIS, L. M. Role of P38 MAPK, AP-1, and NF-kappaB in interleukin-1beta-induced IL-8 expression in human vascular smooth muscle cells. *Cytokine*, v.18, n.4, p. 206-13. 2002.

KABASHIMA, K., NAGAMACHI, M., HONDA, T., NISHIGORI, C., MIYACHI, Y., TOKURA, Y., NARUMIYA, S. Prostaglandin E2 is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. *Laboratory Investigation*, v.87, p.49–55. 2007.

KALRA, N., BHUI, K., ROY, P., SRIVASTAVA, S., GEORGE, J., PRASAD, S., SHULA, Y. Regulation of p53, nuclear factor κB and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.226, p.30-37. 2008.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, v.12, n.4, p.390-401. 2002.

KARIN, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, v.270, n.28, p.16483-6. 1995.

KARTHIKEYAN, R., KANIMOZHI, G., PRASAD, N. R., AGILAN, B., GANESAN, M., MOHANA, S., SRITHAR, G. Hydroxycoumarin prevents UVB-induced activation of NF-κB and subsequent overexpression of matrix metalloproteinases and inflammatory markers in human dermal fibroblast cells. *J. Photochem Photobiol. B.*, v.161, p.170-176. 2016.

KASTAN, M. B., ONYEKWERE, O., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., CRAIG, R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Research**, v.51, p.6304-6311. 1991.

KASTAN, M. B., ONYEKWERE, O., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., CRAIG, R. W. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. **Cancer Res.**, v.51, n.23, p.6304-6311. 1991.

KATIYAR, S.K., MATSUI, M. S., ELMETS, C. A., MUKHTAR, H. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. **Photochem Photobiol.**, v.69, n.2, p.148-53. 1999.

KATIYAR, S. K., MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. **J Leukoc Biol.** , v.69, n.5, p.719-26 (2001).

KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by green tea: antioxidant and immunomodulatory effects. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.** , v.3, n.3, p.234-42. 2003.

KENNEDY, C; BAJDIK, C.D; WILLEMZE, R; DE GRUIJL, F.R. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. **Journal Invest Dermatol.**, v.120, n.6, p.1087-1093. 2003.

KIM, A. L, LABASI, J. M., ZHU, Y., TANG, X., MCCLURE, K., GABEL, C. A., ATHAR, M., BICKERS, D. R. Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 *hairless* mice. **J Invest Dermatol.**, v.124, n.6, p.1318-25. 2005.

KIM, E. K., LEE, W. B., MOON, S. H., JEON, Y. J., AHN, C. B., KIM, B. H., PARK, P. J., JEON, B. T. Free radical scavenging activity by ESR spectroscopy and neuroprotective effect on H₂O₂ induced damage in PC-12 cells of enzymatic extract from Korean elk velvet antle. **J. Nutri. Biochem.**, v.33, p.895-912. 2009.

KIM, D., HAYNES, C. L. THE Role of p38 MAPK in Neutrophil Functions: Single Cell Chemotaxis and Surface Marker Expression. **The Analyst.**, v.138, n.22, p10. 2013.

KIM, S., JIN, S-G, PFEIFER, G. P. Formation of cyclobutane pyrimidine dimers at dipyrimidines containing 5-hydroxymethylcytosine. **J. Photochemical & photobiological sciences.**, v.12, n.8, p.1409-1415. 2013.

KIM, Y., LEE, S. K., BAE, S., KIM, H., PARK, Y., CHU, N. K., KIM, S. G., KIM, H., HWANG, Y., KANG, J. S., LEE, W. J. The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. **Immunology Letters**, v.149, p.1110-118. 2013.

KIM, I. Y., HE, YU-YING. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. **Genes & Diseases**, v.1, n.2, p.188–198. 2014.

KIM, K. H., PARK, S. J., LEE, Y. J., LEE, J. E., SONG, C. H., CHOI, S. H., KU, S. K., KANG, S. J. Inhibition of UVB-Induced Skin Damage by Exopolymers from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 in Hairless Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.116, p.73–86. 2015.

KIMURA, T., DOI, K. Effects of indomethacin on sunburn and suntan reactions in hairless descendants of Mexican hairless dogs. **Histol Histopathol**, v.13, p.29-36. 1998.

KLIGMAN, L. H., and KLIGMAN, A. M. Topical tretinoin for photoaged skin. **Photodermatology**, v.3, p.215-227. 1986.

KNITATKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology** 12, 390-401. 2002.

KONDO, S., KONO, T., SAUDER, D. N., MCKENZIE, R. C. IL8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. **J. Investigative Dermatology**, v.101, n.5, p. 690-694. 1993.

KRIPKE, M.L. Immunological Effects of Ultraviolet Radiation. **Journal Dermatol**, v.18, p.410-414. 1991.

KUPAI, K., SZUCS, G., CSEH, S., HAJDU, I., CSONKA, C., CSONT, T., FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.61, p.205-209. 2010.

LARSSON, E., HARRIS, H. E., PALMBLAD, K., MÅNSSON, B., SAXNE, T., KLARESKOG, L. CNI-1493, an inhibitor of proinflammatory cytokines, retards cartilage destruction in rats with collagen induced arthritis. **Ann Rheum Dis**, v.64, p.494–496. 2005.

LAVKER, R. M., GERBERICK, G. F., VERES, D., IRWIN, C. J., KAIDBEY, K. H. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. **J. A. Acad. Dermatol.**, v.32, p.53-62 (1995).

LAWRENCE, N. J., SONG, L., DOIG, J., RITCHIE, A. M., BROWNSTEIN, D. G., MELTON, D. W. Topical thymidine dinucleotide application protects against UVB-induced skin cancer in mice with DNA repair gene (Ercc1)-deficient skin. **DNA Repair**, v.8, n.5, p.664-71. 2009.

LECCIA, M. T., YAAR, M., ALLEN, N., GLEASON, M., GILCHREST, B. A. Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts. **Exp Dermatol**, v.10, n.4, p.272–279. 2001.

LEE, CHIANG-WEN., KO, HORNG-HUEY., CHAI, CHEE-YIN., CHEN, WAN-TZU., LIN, CHUN-CHING., YEN, FENG-LIN. Effect of *Artocarpus communis* Extract on UVB Irradiation-Induced Oxidative Stress and Inflammation in *Hairless* Mice. ***Int J Mol Sci.***, v.14, n.2, p.3860–3873. 2013.

LEE, C-W. O., NA, Y. O., PARK, N-H., KIM, H-S., AHN, S. M., KIM, J. W., KIM, H-K., JANG, Y. P. Amentoflavone inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression through the modulation of AP-1 components in normal human fibroblasts. ***App. Biochemistry and Biotechnology***, v.166, n.5, p.1137-1147. 2012.

LEE, J. K.; KIM, J. H.; NAM, K. T.; LEE, S. H. Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation in the skin of *hairless* mice. ***Journal of Dermatological Science***, v.32, n.3,p. 171-179. 2003.

LEE, M. H., REYNISDÓTTIR, I., MASSAGUÉ, J. Cloning of p57KIP2, a cyclindependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. ***Genes Dev***, v.9, n.6, p. 639-49. 1995.

LEE, Y. R., NOH, E. M., JEONG, E. Y., YUN, S. K., JEONG, Y. J., KIM, J. H., KWON, K. B., KIM, B. S., LEE, S. H., PARK, C. S., KIM, J. S. Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressing the NF-kappaB pathway in human dermal fibroblasts. ***Exp Mol Med.***, v.41, n8, p.548-54. 2009.

LEE, Y. R., NOH, E. M., JEONG, E. Y., YUN, S. K., JEONG, Y. J, KIM, J. H., KWON, K. B., KIM, B. S., LEE, S. H, PARK, C. S., KIM, J. S. Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressing the NF-kappaB pathway in human dermal fibroblasts. ***Exp Mol Med.***, v.41, n.8, p.548-54. 2009.

LEMOS, F. O., FERREIRA, L.A., CARDOSO, V. N., CASSALI, G. D., SALAS, C. E., LOPES, M. T. Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Carica candamarcensis*. ***Eur J. Dermatol***, v.21, p.722-730. 2011.

LEMOS, F. O., MELLO, V. J., CASSALI, G. D., SALAS, C. E., LOPES, M. T. P. Pre-clinic evaluation of proteases from *C. candamarcensis* as termal healing principles. First *Internacional Symposia about Pharmacology of Natural products, Varadero, Cuba*, 2006.

LEMOS, F. O., VILLALBA, M. I. C., TAGLIATI, C. A., CARDOSO, V. N., SALAS, C. E., LOPES M. T.P. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity of a *Vasconcellea cundinamarcensis* proteinase fraction with pharmacological activity. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, v.26, n.1, p. 94-101. 2016

LEON, J. Botánica de Los Cultivos Tropicales. San Jose: **IICA** 445. 1987.

LEVER. (2009). **Histopatologia da Pele**. ed. 10, Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro,pp.1193;

LIETZKE, S.E., BOSE, S., CRONIN, T., KLARLUND, J., CHAWLA, A., CZECH, M. P., LAMBRIGHT, D. G. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. **Mol. Cell.**, v.6, p. 385–394. 2000.

LIMA, E. S., ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v.37, n.3. 2001.

LIU, J., SHEN, H. M., ONG, C. N. Role of intracellular thiol depletion, mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in *Salvia Miltiorrhiza*-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. **Life Sciences**, v.69, n.16, p. 1833-1850. 2001.

LOGAN G, WILHELM DL. The inflammatory reaction in ultraviolet injury. **Br. J. Exp. Pathol.**, v.47, p.286–99. 1966.

LOWE, D. T. Nitric Oxide Dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry.**, v.4, p.441-458. 2000.

MADESH, M., BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. **Indian J Biochem Biophys.**, v.35, n.3, p.184-8. 1998.

MANNELLO F & MEDDA V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. **Progress in Hist and Cytoc.**, v.47, p.27-58. 2012.

MANOSROI, A., CHANKHAMPAN, C., PATTAMAPUN, K., MANOSROI, W., MANOSROI, J. Antioxidant and Gelatinolytic activities of papain from papaya latex and bromelain from pineapple fruits. **Chiang Mai. J. Sci.** v.41, n.3, p.635-648. 2014.

MARIONNET, C., PIERRARD, C., LEJEUNE, F., SOK, J., THOMAS, M., & BERNERD, F. Different Oxidative Stress Response in Keratinocytes and Fibroblasts of Reconstructed Skin Exposed to Non Extreme Daily-Ultraviolet Radiation. **PLoS ONE**, v.5, n.8, e12059. 2010.

MARTIN, J. P., BURCH, P. Production of oxygen radicals by photosensitization. **Methods Enzimol**, v.186, p.635-645. 1990.

MARTIN, J. P., LOGSDON, N. Oxygen radicals are generated by dye-mediated intracellular photooxidations: a role for superoxide in photodynamic effects. **Arch. Bioquem. Biophysics**, v.256, p.39-49. 1987.

MARTINEZ, M. A. R; RUIZ, I. R. G; FRANCISCO, G.; NETO, C. F.; CABRAL, L. S. Molecular genetics of non-melanoma skin cancer* Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **An Bras Dermatol.**, v.81, n.5, p.405-19. 2006.

MATHEW, O. P., RANGANNA, K., MILTON, S. G. Involvement of the Antioxidant Effect and Anti-inflammatory Response in Butyrate-Inhibited Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. **Pharmaceuticals.**, v.7, n.11, p.1008-1027. 2014.

- MATSUMURA, Y., ANANTHASWAMY, H.N. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 756-783, 2002.
- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.195, n.3, p.298-308. 2004.
- MELLO, V. J., GOMES, M. T. R., RODRIGUES, K. C. L. (2006). Recent Progress in Medicinal Plants: Drug Develop Molec Texas Studium Press, 211-224.
- MELLO, V. J.; GOMES, M. T. R.; LEMOS, F. O. ANDRADE, S.P.; LOPES, M.T.; SALAS, C.E The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**, v.15, p.237-244. 2008.
- MELNIKOVA, V. O, ANANTHASWAMY, H. N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. **Mutat Res**, v.571, p.91-106. 2005.
- MENSOR, L. L., MENEZES, F. S., LEITÃO, G. G., REIS, A. S., DOS SANTOS, T. C., COUBE, C. S., LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant Extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.127-130. 2001.
- MIKI, C., INOUE, Y., ARAKI, T., UCHIDA, K., KUSUNOKI, M. Cytokines and cancer development. **J. Surg. Oncol**, v.95, p.10-11. 2007.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An Bras Dermatol.**, v.84, n.3, p.263-269. 2009.
- MONTEIRO-RIVIERE, N. & RIVIERE, J. E. **Skin** In: Toxicology, Ed. Academic Press, cap.18, p.439-445. 1999.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOUTIM, V.; SILVA, L.G.; LOPES, M.T.P.; FERNANDES G.W.; SALAS, C.E. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Plant Sci.**, v.142, p.115-121. 1999.
- MOWBRAY, M., MCLINTOCK, S., WEERAKOON, R., LOMATSCHINSKY, N., JONES, S., ROSSI, A. G., WELLER, R. B. Enzyme-Independent NO Stores in Human Skin: Quantification and Influence of UV Radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.129, n.4, p.834-842. 2009
- MRASS, P., RENDL, M., MILDNER, M., GRUBER, F., LENGAUER, B., BALLAUN, C., ECKHART, L., TSCHACHLER, E. Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. **Cancer Res.**, v.64, n.18, p.6542-6548. 2004.

MURAMASTSU, S., SUGA, Y., MIZUNO, Y., HASEGAWA, T., MATSUBA, S., HASHIMOTO, Y., VOLKL, A., SEITZ, H., OGAWA, H. Differentiation-specific localization of catalase and hydrogen peroxide, and their alterations in rat skin exposed to ultraviolet B rays. **Journal of Dermatological Science**, v.37, p.151-158. 2005.

MUTO, Y., TSUKIMOTO, M., HOMMA, T., KOJIMA, S. Immune Response Pathways in Human Keratinocyte (HaCaT) Cells are Induced by Ultraviolet B via p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation. **Journal of Health Science**, v 56, p.675 – 683. 2010.

OECKINGHAUS, A., GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v.1, n.4, p. 1- 14. 2009.

OH, C., HENNESSY, A., HA, T., BISSET, Y., DIFFEY, B., REES, J. L. The time course of photoadaptation and pigmentation studied using a novel method to distinguish pigmentation from erythema. **J. Invest. Dermatol.**, v.123, p.965-972. 2004.

OH, J-H., CHUNG, A-S., STEINBRENNER, H., SIES, H., BRENNEISEN, P. Thioredoxin secreted upon ultraviolet A irradiation modulates activities of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. **Actv. Biochemistry ad Biophysics**, v.423, p.218-226. 2004.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, n.2, p.351-358. 1979.

OHTA, M. TANOUE, K.; TARNAWSKI, A. S. AI R., ITANI, R. M., SANDER, F. C., SUGIMACHI, K., SARFEH, I. J. Overexpressed nitric oxide synthase in portal-hypertensive stomach of rat, a key to increased susceptibility to damage. **Gastroenterol**, v.112, p.1920–1930, 1997.

OLTEANU, E. D., FILIP, A., CLICHICI, S., DAICOVICIU, D., ACHIM, M., POSTESCU, I. D., BOLFA, P., BOLOJAN, L., VLASE, L., MURESAN, A. Photochemoprotective effect of Calluna vulgaris extract on skin exposed to multiple doses of ultraviolet B in SKH-1 hairless mice. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.**, v.31, n.3, p.233-43. 2012.

ONKEN, J.E.; GREER, P.K.; CALINGAERT, B.; HALE, L.P. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. **Clin. Immunol.** V.126, p.345–352. 2008.

OPLÄNDER, C., SUSCHEK, C. V. The Role of Photolabile Dermal Nitric Oxide Derivates in Ultraviolet Radiation (UVR)-Induced Cell Death. **International Journal of Molecular Sciences**. v.14, n.1,p.191-204. 2013.

ORTOLAN, T. G., MENCK, C. F. M. UVB-Induced Cell Death Signaling Is Associated with G1-S Progression and Transcription Inhibition in Primary Human Fibroblasts. Hofmann TG, ed. **PLoS ONE.**, v. 8, n.1,;e76936. 2013.

OSAKI, L. H & GAMA, P. MAPKs and Signal Transduction in the Control of Gastrointestinal Epithelial Cell Proliferation and Differentiation. *Int J Mol Sci*, v.14, p.10143-10161. 2013.

OZES, O. N., MAYO, L. D., GUSTIN, J. A., PFEFFER, S. R., PFEFFER, L. M., DONNER, D. B. NF κ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, v.401, p.82-85. 1999.

PAAL, J. V., NEYTS, E. C., VERLACKT, C. C. W., BOGAERTS, A. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chem. Sci.*, v.7, p.489. 2016.

PAGLIA, D. E; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, v.70, p. 158-169. 1967.

PAL, H. C., ATHAR, M., ELMETS, C. A., AFAQ, F. Fisetin inhibits UVB-induced cutaneous inflammation and activation of PI3K/AKT/NF κ B signaling pathways in SKH-1 *hairless* mice. *Photochem Photobiol.*, v.91, n.1, p.225-234. 2015.

PANICH, U., ONKOKSOONG, T., LIMSAENGURAI, S., AKARASEREENONT, P., WONGKAJORN SILP, A. UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: The protective effect of gallic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.*, v.108, p.16–22. 2012.

PARK, K., LEE J. H. Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. *Oncol Rep.*, v.19, n.2, p.413-417. 2008.

PERNET, I., SAGOT, V., SCHMIT, D., VIAC, J. UVA1 and UVB radiation but not PGE2 stimulate IL-8 release in normal human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.*, v.291, p.527-529. 1999.

PILLAI, S., ORESAJO, C., HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. Intern. *Journ. Cosmetic. Science*, v.27, p.17-34. 2005.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 48, n.1, p.1-22. 2003.

PODDA, M., GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin. Exp. Dermatol.*, Oxford, v.26, p.578-582. 2001.

PRATHEESHKUMAR, P., SON, Y. O., WANG, X., DIVYA, S. P, JOSEPH, B., HITRON, J. A., WANG, L., KIM, D., YIN, Y., ROY, R. V., LU, J., ZHANG, Z., WANG, Y., SHI, X. Cyanidin-3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF- κ B signaling pathways in SKH-1 *hairless* mice skin. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v.280, n.1, p.127-37. 2014.

PROPHET, E. B. **Afip laboratory methods in histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 278p. 1992.

PUPE, A., DEGREEF, H., GARMYN, M. Induction of tumor necrosis factor- α by UVB: A role for reactive oxygen intermediates and eicosanoids. **Photochemistry and Photobiology**, v.78, p.68-74. 2003.

QUANT, T., QIN, Z., XIA, W., SHAO, Y., VOORHEES, J. J., FISHER, G. J. Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. **J. Invest. Dermatology**, v.14, p.20-24. 2009.

RABE, J. H., MAMELAK, A. J., MCELGUNN, P. J., MORISON, W. L., SAUDER, D. N. Photoaging: mechanisms and repair. **J Am Acad Dermatol.**, v. 55, p.1-19. 2006.

RABE, J.H.; MAMELAK, A.J.; MCELGUNN, P.J.S.; MORISON, W.L.; SAUDER, D.N. (2006). **J Am Acad Dermatol** 55:1–19;

radiation in photoaging of the skin. **Experimental Gerontology**, v.43, p.629-632. 2008

RAI, N., SARKAR, M., RAHA, S. Piroxicam, a traditional non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) causes apoptosis by ROS mediated AKT activation. **Pharmacols Report.**, v.67, p.1215-1223. 2015.

RAINGEAUD, J., PIERRE, J. Interleukin-4 downregulates TNF α -induced IL-8 production in keratinocytes. **FEBS Letters.**, v.579, n.18, p.3953–3959. 2005.

RAMACHANDRAN, S., PRASAD, N. R. Sesamol modulates ultraviolet-B-induced apoptotic and inflammatory signaling in human skin dermal fibroblasts. **Int. Journ. Nutr. Pharmacol. Neurol. Diseases.**, v.2, n.1, p.31-39. 2012.

RAMASWAMY, N. T., RONAI, Z., PELLING, J. C. Rapid activation of JNK1 in UV-B irradiated epidermal keratinocytes. **Oncogene**, v.16, p.1501-1505. 1998.

RASTOGI, R. P., RICHA, KUMAR, A., MADHU, B. T., SINHA, R. P. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p.1-32. 2010.

REGALADO, E. L., RODRÍGUEZ, M., MENÉNDEZ, R., FERNANDEZ, X., HERNÁNDEZ, I., MORALES, R. A., FERNÁNDEZ, M. D., THOMAS, O. P., PINO, J. A., CONCEPCIÓN, A. R., LAGUNA, A. Photoprotecting action and phytochemical analysis of a multiple radical scavenger lipophilic fraction obtained from the leaf of the seagrass *Thalassia testudinum*. **Photochem Photobiol.**, v.87, n.5, p.1058-66. 2011.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v.49, p.1603-1616. 2010.

RHODES, L. E., GLEDHILL, K., MASOODI, M., HAYLETT, A. K., BROWNRIGG, M., THODY, A. J., TOBIN, D. J., NICOLAOU, A. The sunburn response in human skin is

characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases. *The FASEB Journal*, v.23, n.11, p.3947–3956. 2009.

RIBEIRO, C. *Cosmetologia: aplicada a dermoestética*. 2. Ed. – São Paulo: Pharmabooks Editora, 441p.

RIBEIRO, S. M. R., QUEIROZ, J. H., PELUZO, M. C. G., COSTA, N. M. B., MATTA, S. L. P., QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosc. J.*, v.21, n.3, p.133-149. 2005.

RIDLEY, A., WHITESIDE, J. R., MCMILLAN, T. J., ALLINSON, S. L. Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.85, n.3, p.177-195. 2009.

RITTIÉ, L., FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev.*, v.1, n.4, p.705-720. 2002.

ROBERTSON, F. M., ROSS, M. S., TOBER, K. L., LONG, B. W., OBERYSZYN, T. M. Inhibition of pro-inflammatory cytokine gene expression and papilloma growth during murine multistage carcinogenesis by pentoxifylline. *Carcinogenesis*, v.17, p.1719-1728. 1996.

ROSSO, S., ZANETTI, R., MARTINEZ, C., TORMO, M. J., SCHRAUB, S., SANCHO-GARNIER, H., FRANCESCHI, S., GAFÀ, L., PEREA, E., NAVARRO, C., LAURENT, R., SCHRAMECK, C., TALAMINI, R., WECHSLER, J. The multicentre south European study 'Helios'. II: Different sun exposure patterns in the aetiology of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer*, v.73, p.1440-1446. 1996.

RUNDHAUG, J. E., FISCHER, S. M. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.*, v.84, p.322-329. 2008.

RYU, H. C., KIM, C., KIM, J.Y., CHUNG, J. H., KIM, J. H. UVB radiation induces apoptosis in keratinocytes by activating a pathway linked to "BLT2-reactive oxygen species". *J Invest Dermatol*, v.130, p.1095–1106. 2010.

SAIGA, A. I., TANABE, S., NISHIMURA, T. Antioxidante activity of peptides obtained from Porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.3661-3667. 2003.

SAMPAIO, S. A., RIVIT, E. A. *Dermatologia*. 2 ed. 1156p, São Paulo: Artmed. 2001.

SANTOS, B. H. C. Papel biológico dos dímeros de pirimidina em células humanas irradiadas com UVA. 111f. Dissertação de Mestrado (Programa Ciências – Biologia/Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

SASAKI, T., IRIE-SASAKI, J., JONES, R. G., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J., STANFORD, W. L., BOLON, B., WAKEHAM, A., ITIE, A., BOUCHARD, D.,

KOZIERADZKI, I., JOZA, N., MAK, T. W., OHASHI, P. S., SUZUKI, A., PENNINGER, J. M. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. **Science.**, v.287, p.1040–1046. 2000.

SCHAFER, M; WERNER, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 9,p. 620-637. 2008.

SCHALKA, S., REIS, V. M. S. Sun protection factor: meaning and controversies. **An Bras Dermatol.**, v.86, n.3, p.507-15. 2011.

SCHLICKEISER S, PLEYER U. **Western, northern, and southern blotting.** Basic science techniques in clinical practice. Chapter 6. I. S. (Eds.) Springer Ed., Heidelberg., p.48-57 2007.

SCHWARZ, T. Photoimmunosuppression. **Photodermal Photoimmunol Photomed**, v.18, p.141-145. 2002.

SHANGARI, N.; O'BRIEN, P. J. **Catalase activity assays.** Current Protocols in Toxicology, v. Chapter 7, p. Unit 7 7 1-15. 2006.

SHARIKABAD, M. N., OSTBYE, K. M., LYBERG, T., BRØRS, O. Effect of extracellular Mg²⁺ on ROS and Ca²⁺ accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.280, n.1,H344-H353. 2001.

SHARMA SD, MEERAN SM, KATIYAR SK. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in in vivo SKH-1 *hairless* mice. **Mol Cancer Ther**, v.6, n.3, p.995-1005. 2007.

SHIMIZU, T; OGA, A; MURAKAMI, T; MUTO, M. Overexpression of p53 Protein Associated with Proliferative Activity and Histological Degree of Malignancy in Solar Keratosis. **Dermatology**, v.2, p.113-118. 1999.

SHINDO, Y., WITT, E., PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their response to ultraviolet light. **J. Invest. Dermatol.**, v.100, p.260-265. 1993.

SHINDO, Y.; HASHIMOTO, T. Antioxidant defence mechanism of the skin against UV irradiation: study of the role of catalase using acatalasaemia fibroblasts. **Archives for dermatological research. Archiv fur dermatologische Forschung**, v.287, n.8, p.747–753. 1995.

SHROEDER, P., HAENDLER, J., KRUTMAN, J. The role of near infrared

SILVA, A. A.. Medidas de radiação solar ultravioleta em Belo Horizonte e saúde pública. **Rev. Bras. Geof.**, São Paulo, v.26, n.4, p.417-425. 2008

SILVA, C. A.; MELLO, V. J.; LOPES, M. T. P., MELLO, V. J, SALAS, C. E. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Med**, 69:926-932. 2003.

SILVA, C. R., OLIVEIRA, M. B. N., MOTTA, E. S., ALMEIDA, G. S., VARANDA, L. L., PÁDULA, M., LEITÃO, A. C., CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Genotoxic and Cytotoxic Safety Evaluation of Papain (*Carica papaya* L.) Using In Vitro Assays. **J. Biomed. Biotech.**, v. 2010, p. 1-8. 2010.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.48, n.6, p. 812-822. 2004.

SINHA, K., DAS, J., PAL, P. B., SIL, P. C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Arch Toxicol.**, v.87, n.7, p.1157-80. 2013.

SIQUEIRA IR.; CIMAROSTI H.; FOCHESSATTO C.; SALBEGO C.; NETTO C.A. Agerelated susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. **Brain Research**, v.1025, n.1–2, p. 226-230. 2004.

SIREROL, J. A., FEDDI, F., MENA, S., RODRIGUEZ, M. L., SIRERA, P., AUPI, M., PEREZ, S., ASENSI, M., ORTEGA, A., ESTRELA, J. M. Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects *hairless* mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.85, p.1-11. 2015.

SITAILO, L. A., TIBUDAN, S. S., DENNING, M. F. Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. **The Journ. Biolog. Chemist**, v.277, n.22, p.19346-19352. 2002.

SMITH, M. L., SEO, Y. R. p53 regulation of DNA excision repair pathways. **Mutagenesis**, v.17, n.2, p.149-156. 2002.

SOEHNGE, H., OUHTIT, A., ANANTHASWAMY, O. N. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. **Front Biosci.**, v.1;2:d538-51. 1997.

SONG, J. L., GAO, Y. Protective Effects of *Lindera coreana* on UVB-induced Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. **Iran J Pharm Res.** , v.13, n.4, p. 1369–1378. 2014.

SPANOS, S., RICE, S., KARAGIANNIS, P., TAYLOR, D., BECKER, D. L. WINSTON, R. M. L., HARDY, K. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human pre-implantation embryos. **Reproduction**, v.124, n.3, p.353-363. 2002.

SRIVASTAVA, R. K., CHEN, Q., SIDDIQUI, I., SARVA, K., SHANKAR, S. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1}. **Cell cycle**, v. 6, n.23, p. 2953-2961. 2007.

STEELE, V. E., LUBET, R. A. The use of animal models for cancer chemoprevention drug development. **Seminars in Oncology**, v.37, n.4, p. 327-338. 2010.

STEGE, H., ROZA, L., VINK, A. A., GREWE, M., RUZICKA, T., GREYER-BECK, S., KRUTMANN, J. Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. **Proc Natl Acad Sci.**, v.97, p.1790-5. 2000.

SUETSUNA, K. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. **Mar. Biotechnol.**, v.2, p.2-5. 2000.

SUR, R., HECK, D. E., MARIANO, T. M., JIN, Y., MURPHY, W. J., LASKIN, J. D. UVB light suppresses nitric oxide production by murine keratinocytes and macrophages. **Biochem Pharmacol.**,v.64, n.10, p1469-1481. 2002.

SVOBODOVA A, WALTEROVA D, VOSTALOVA J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 150, p.25-38. 2006.

TANAKA, S., SATO, T., AKIMOTO, N., YANO, M., ITO, A. Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes in vivo and in vitro. **Biochem Pharmacol.** , v.68, n.3, p.433-9. 2004.

TANG, Q., GONZALES, M., INOUSE, H., BOWDEN, T. Roles of AKT and Glycogen Synthase Kinase β in the ultraviolet B induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. **Cancer Research**, v.61, p.4329-4332. 2001.

TANG, X., ZHU, Y., HAN, L., KIM, A. L., KOPELOVICH, L., BICKERS, D. R., ATHAR, M. CP-31398 restores mutant p53 tumor suppressor function and inhibits UVB-induced skin carcinogenesis in mice. **Clin. Invest.**, v.117, p.3753-3764. 2007.

TEDESCO, A. C., MARTINEZ, L. and GONZÁLEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. **Braz J Med Biol Res**. V.30, n.5, p.561-575. 1997.

TERRA, V. A., SOUZA-NETO, F. P., PEREIRA, R. C., SILVA, T. N. X., COSTA, A. C. C., LUIZ, R. C., CECCHINI, R., CECCHINI, A. L. Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.109, p.34-41. 2012.

THOMAS, P. A., DEVASAGAYAM & JAYASHREE, P. KAMAT. Biological significance of singlet oxygen. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.40, p.680-692. 2002.

TIZARD, I.R.. **Imunologia veterinária: introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 39-50. 2002.

TIZARD, I.R.. **Imunologia veterinária: introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 39-50. 2002

TOR, Y. S., YAZAN, L. S., FOO, J. B, ARMANIA, N., CHEAH, Y. K., ABDULLAH, R., IMAM, M. U., ISMAIL, N., ISMAIL, M. Induction of apoptosis through oxidative stress-related pathways in MCF-7, human breast cancer cells, by ethyl acetate extract of *Dillenia suffruticosa*. **BMC Complement Altern Med.**, v.14, p.55. 2014.

TORNALETTI, S., HANAWALT, P. C. Effect of DNA lesions on transcription elongation. **Biochimie**, v.81, p.139-146. 1999.

TOWER, J. Programmed cell death in aging. **Ageing Research Reviews**, n. 0,2015.

TOWNSEND, D. M., TEW, K. D, TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomed Pharmacother.**, v.57, n.3-4, p.145-55. 2003

TREVITHICK, JR, XIONG, H, LEE, S, *et al*. Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated **erythema**, edema, and skin sensitivity in *hairless* mice. **Biochem Biophys** 296: 575–582. 1992.

TSOYI, K., PARK, H. B., KIM, Y. M., CHUNG, J. I., SHIN, S. C., LEE, W. S., SEO, H. G., LEE, J. H., CHANG, K. C., KIM, H. J. Anthocyanins from black soybean seed coats inhibit UVB-induced inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression and PGE2 production through regulation of the nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **J Agric Food Chem.** , v.56, n.19, p.8969-8974. 2008.

TSUJI, T., MIMURA, Y., WEN, S., LI, X., KANEKAWA, A., SASAKI, K., SHINOZAKI, F. The significance of PCNA and p53 in some oral tumors. *Int. Journ. Oral Maxillofac. Surg.*, v.24, p.221-225. 1995.

UENO, H., NAKAMURA, H., INOUE, M., IMAI, K., NOGUCHI, M., SATO, H., SEIKI, M., OKADA, Y. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. **Cancer Res.**, v.57, p. 2055–2060. 1997.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.64, p.99-104. 2001.

VALLABHAPURAPU, S., KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annu Rev. Immunol.**, v.27, p.693-733. 2009.

VAN LAETHEM, A., CLAERHOUT, S., GARMYN, M., AGOSTINIS, P. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.37, n.8, p.1547–53. 2005.

VAYALIL, P. K., ELEMENTS, C. A., KATIYAR, S. K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and

proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 *hairless* mouse skin. **Carcinogenesis**, v.24, n.5,p.927-936. 2003.

VAYALIL, P. K., ELEMENTS, C. A., KATIYAR, S. K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 *hairless* mouse skin. **Carcinogenesis**, v.24, n.5, p.927-936. 2003.

VICENTINI, F. T. M. C., CASAGRANDE, R., DEL CIAMPO, J. O., WOLGA, N. O., PITOL, D. L., IYOMASA, M. M., BENTLEY, M.V L. B., FONSECA, M. J. V. Quercetin in w/o microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **European journal of pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, v.69, p.948-957. 2008.

VIEIRA, M. J., PEDROSA, S. R., ARGAAÑARAZ, G. A., SILVA, J. A., CAVALHEIRO, E. A., NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Indomethacin can downregulate the levels of inflammatory mediators in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine-induced status epilepticus. **CLINICS**, v.69, n.9,p.621-626. 2014.

VILELA, F. M. P., FONSECA, Y. M., JABOR, J. R., VICENTINI, F. T. M. C., FONSECA, M. J. V. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in *hairless* mice after a single dose of ultraviolet radiation. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, v.80, p.387–392. 2012.

VILLALBA, MIC, SILVA, A, TAGLIATI, C., SALAS, CE, LOPES, MT. Acute systemic toxicological and mutagenic evaluation of a proteolytic fraction from the latex of *Carica candamarcensis*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.107, p.162- 692. 2010.

VOEHRINGER, D. W., MCCONCKEY, D. J., MCDONNEL, T. J., BRISBAY, S., MEYN, R. E. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.2956-2960. 1998.

VOGELSTEIN, B., LANE, D., LEVINE, A.L. Surfing the p53 network. **Nature**, v.408, p.307-310. 2000.

WANG, J., OUYANG, W., LI, J., WEI, L., MA, Q., ZHANG, Z., TONG, Q., HE, J., HUANG, C. Loss of tumor suppressor p53 decreases PTEN expression and enhances signaling pathways leading to activation of activator protein 1 and nuclear factor κB induced by UV radiation. **Cancer Research**, v.65, n.15, p.6601-6611. 2005.

WEI, H., ZHANG, X., WANG, Y., LEBWOHL, M. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of *hairless* mice by isoflavone genistein. **Cancer Lett.**, v.185, p.21–29. 2002.

WEN, K. C.,FAN, P. C., TSAI, S. Y., SHIH, I. C., CHIANG, H. M. *Ixora parviflora* Protects against UVB-Induced Photoaging by Inhibiting the Expression of MMPs,

MAP Kinases, and COX-2 and by Promoting Type I Procollagen Synthesis. **Evid Based Complement Alternat Med.**,2012:417346. 2012.

WENK, J., BRENNEISEN, P., MEEWES, C., WLASCHEK, M., PETERS, T., BLAUDSCHUN, R., MA, W., KUHR, L., SCHNEIDER, L.,SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. UV-induced oxidative stress and photoaging. **Curr. Probl. Dermatol.**, v.29, p.83–94. 2001.

WILGUS, T. A., PARRET, M. L., ROSS, L. S., TOBER, K. L., ROBERTSON, F. M., OBSERYZYN, T. M. Inhibition of ultraviolet light-B-induced cutaneous inflammation by a specific cyclooxygenase-e inhibitor. **Adv Exp Med Biol**, v.507, p.85-92. 2002.

WILGUS, T.A.; ROSS, M.S.; PARRETT, M.L.; OBERYSZYN, T.M. Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.62, p.367–384. 2000.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v.82, p.969-974. 1995.

WULFF, B. C., THOMAS-AHNER, J. M, SCHICK, J. S, OBERYSZYN, T. M. Celecoxib reduces the effects of acute and chronic UVB exposure in mice treated with therapeutically relevant immunosuppressive drugs. **Int J Cancer.**, v.126, n.1, p.11-8. 2010

XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science** ,v.1, n. 2, p.1-8. 2005.

YAAR, M., GILCHREST, B. A. Skin aging: Postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. **Clin. Geriatr. Med.**, v.17, p.617-630. 2001.

YANG, CHUEN-MAO., LEE, I-TA., LIN, CHIH-CHUNG., YANG, YA-LIN., LUO, SHUE-FEN., KOU, Y. R., HSIAO, LI-DER. Cigarette smoke extract induces COX-2 expression via a PKCa/c-Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt/NF-κB pathway and p300 in tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.297, n.5, p.892-902. 2009

YANG, H., WANG, X., LIU, X., WU, J., LIU, C., GONG, W., ZHAO, Z., HONG, J., LIN, D., WANG, Y., LAI, R. Antioxidant Peptidomics Reveals Novel Skin Antioxidant System. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.8, n.3, p. 571-583. 2009.

YASUI, K., BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase for resolution of inflammation. **Inflamm Res.**, v.55, p.359–363. 2006.

YUSUF, N., IRBY, C., KATIYAR, S. K., ELMETS, C. A.. Elmet's. Photoprotective effects of green tea polyphenols. ***Photodermatol Photoimmunol Photomed*** , v.23, p.48–56. 2007.

ZAN, H., ZHENG, H. The role of topical ciclo-oxygenase-2 inhibitors in skin cancer: treatment an prevention. ***Am J. Clin. Dermatol.***, v.8, n.4, p.195-200. 2007.

ZHOU B. R., LIU W. L., LUO, D. Protective effect of baicalin against multiple ultraviolet B exposure-mediated injuries in C57BL/6 mouse skin. ***Arch Pharm Res.***, v.34, n.2, p.261-268. 2011.

ANEXO A -

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 174/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da atividade cicatrizante da fração proteolítica PIG10 em lesões excisionais e em queimaduras promovidas por UVB**", que tem como responsável(is) **Miriam Teresa Paz Lopes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/ 12/2010**.

Este certificado expira-se em **14/ 12/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 174/2010**, related to the project entitled "**Healing activity of proteolity fraction (PIG10) from C. Candamarcensis latex on wounds and burns induced by UVB exposure**", under the supervisors of **Miriam Teresa Paz Lopes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 14, 2010**.

This certificate expires in **December 14, 2015**.

Belo Horizonte, 17 de Dezembro de 2010.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
312/0-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B

Obtenção, purificação e caracterização da fração proteolítica, P1G10, do látex de *Vasconcellea cudinamarcensis*.

Materiais

Soluções Utilizadas na obtenção das frações bioativas do látex

- Tampão acetato de sódio 1,0 M pH 5 (solução estoque)

Acetato de sódio	136,08 g
Água destilada q.s.p	1,00L

O pH foi ajustado para 5. O tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5, foi obtido a partir da diluição 1:10 da solução estoque em água Ultrapura.

- Solução de EDTA 500 mM

EDTA	37,22 g
Água destilada q.s.p	0,20 L

Solução de cisteína 200 mM:

Cisteína	12,10 g
Água destilada q.s.p	0,50L

Tampão de ativação (Tampão acetato de sódio 1 M, cisteína 25 mM, EDTA 10 mM e DTT 5mM:

Cisteína 200 mM	0,04 mL
EDTA 500 mM	4,00 mL
DTT	0,16 g
Tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) q.s.p	200,00 mL

Soluções Utilizadas na caracterização bioquímica de P1G10

- Solução 01

Na ₂ CO ₃	2,00%
NaOH	0,1 mol/L

- Solução 02

CuSO ₂ .5H ₂ O	0,05%
Citrato de sódio	1,00%

- Solução 01 de BAPNA 100 mM:

BAPNA	0,09 g
DMSO	2,00 mL

Esta solução foi mantida a -20°C até o momento de uso.

- Solução 02 de BAPNA 100 mM:

BAPNA 100mM	90,00 µL
Tampão Fosfato 25mM	30,00 mL
EDTA +0,5 M	120,00 µL
Cisteína 200 mM	120,00 µL

- Tampão de Tris-HCl, pH 6.8

EDTA	5,00 mM
Glicose	250,00 mM
KCl	30,00 mM
β-mercaptoetanol	2%
PMSF	100,00 µg/mL
Benzamidina	5,00 µg/mL
Aprotinina	2,00 µg/mL
Leupeptina	2,00 µg/mL
Água ultrapura q.s.p	1,00 L

- Solução para gel separador ácido não desnaturante 7,5% pH 4,3

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v)	1,25 mL
Ácido acético glacial P.A	170,00 µL
Solução de hidróxido de potássio 1 M	430,00 µL
Água ultrapura	3,05 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	70,00 µL
TEMED	30,00 µL

- Solução para o gel separador desnaturante 12% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v)	1,20 mL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8; 0,4 % SDS (p/v)	750,00 µL
Água ultrapura	1,02 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	25,00 µL
TEMED	5,00 µL
Água ultrapura q.s.p	

- Solução para o gel concentrador desnaturante 5% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v)	166,80 µL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v)	250,00 µL
Água ultrapura	571,20 µL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	10,00 µL
TEMED	2,00 µL
Água ultrapura q.s.p	1000,00µL

- Solução fixadora para géis

Metanol P.A	50,00 mL
Ácido acético glacial P.A	10,00 mL
Água destilada q.s.p	100,00 mL

- Solução fixadora para géis

Metanol P.A	50,00 mL
Ácido acético glacial P.A	10,00 mL
Água destilada q.s.p	100,00 mL

- Solução de azul-brilhante de coomassie para coloração de géis

Corante azul-brilhante de Coomassie G-250	125,00 mg
Ácido acético glacial P.A	10,00 mL
Água destilada q.s.p	100,00 mL

- Solução descorante de géis

Metanol P.A	5,00 mL
Ácido acético glacial P.A	7,00 mL
Água destilada q.s.p	100,00 mL

- Solução tampão de amostra eletroforese desnaturante

Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v)	700,00 µL
Glicerol	300,00 µL
SDS	100,00 mg
Azul de bromofenol	0,12 mg

- Tampão de corrida eletroforese desnaturante

Tris base	755,00 mg
Glicina	3,60 g
SDS	250,00 mg
Água destilada q.s.p	250,00 mL

- Solução salina 0,9%

NaCl	9,00 g
Água destilada q.s.p	1,00 L

- PBS pH 7,2 - 7,4 :

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,21g
Água ultrapura q.s.p	1,00L

- Reagente diluente (utilizado nos ensaios imunoenzimáticos) :

BSA 0,1%	0,04 g
PBS estéril	0,04 L

- Solução de ácido cítrico a 0,1 M :

Ácido cítrico monohidratado	10,51 g
Água destilada q.s.p	0,50 L

- Solução de ácido sulfúrico a 4M :

H ₂ SO ₄ (18M)	0,12 L
Água destilada q.s.p	0,50 L

Métodos

Obtenção e caracterização bioquímica da fração P1G10

A obtenção e purificação da fração foi realizada conforme descrito por SILVA et al. (2003). A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, o látex foi coletado e armazenado a 4°C. Posteriormente, o mesmo foi liofilizado e armazenado, em freezer, a -20°C. Para a separação cromatográfica, foram dissolvidos 15,0 g do látex liofilizado em 75,0 mL de solução tampão de ativação. A mistura foi, então, agitada durante 30 min e centrifugada (9.000 x g) durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado, sendo repetido o procedimento descrito acima com o resíduo, utilizando-se 25,0 mL do tampão de ativação. O filtrado foi aplicado em uma coluna contendo resina Sephadex G-10, após esta ter sido equilibrada com tampão acetato de sódio 1,0 M pH 5,0. As frações coletadas foram triadas mediante a determinação da absorbância a 280 nm. De acordo com o perfil cromatográfico proteico obtido, as frações que compunham o primeiro pico foram reunidas originando a amostra P1G10.

Em um sistema de ultrafiltração (Amicon), as amostras de P1G10 foram filtradas, lavadas três vezes com água deionizada e recolhida a solução residual que, posteriormente, foi liofilizada. As determinações da concentração proteica total e da atividade proteolítica específica do liofilizado foram realizadas como parâmetros para a caracterização da fração.

Determinação da atividade amidásica

A atividade proteolítica específica da amostra de P1G10 foi determinada através da medida da atividade amidásica em substrato BAPNA. Para isso, utilizou-se a Solução 02 de BAPNA. Em triplicata, a amostra de P1G10 foi alíquotada, para obtenção de uma mistura na concentração de 10 µg/mL da Solução 02 de BAPNA. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por um período variável de 1min a 12h até obtenção de uma coloração amarelo-clara. A reação foi interrompida com a adição de 60µL de solução de ácido acético 60% (v/v). A leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm com o aparelho zerado com 1mL da solução acima descrita na ausência de amostra (SILVA et al., 2003).

A atividade específica das amostras, quantificada em nM/min/ μ g, foi determinada de acordo com a seguinte equação.

$$A = a \times b \times c \quad (\text{equação 01})$$

Onde A equivale a absorvância, a é o coeficiente de absorvidade molar, b é o passo óptico e c equivale à concentração molar do complexo formado.

Estimativa da concentração de proteína

A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Nesse caso, foram incubadas quantidades entre 1,0 e 10,0 μ L das amostras completando o volume destas para 100,0 μ L com cloreto de sódio 100 mM. Foi adicionado em seguida 1,0 mL da solução de Bradford (Sigma®), permanecendo incubada por 15 min até a leitura da densidade ótica em 595 nm. Para cálculo das concentrações de proteína, foi estimada uma curva padrão utilizando BSA.

Resultados

Obtenção e caracterização da fração P1G10

O látex liofilizado foi dissolvido em tampão de ativação e aplicado a uma coluna Sephadex G-10 para separação cromatográfica. A separação em dois picos bem definidos, P1G10 e P2G10 se fez a partir do perfil protéico (absorvância 280 nm).

P1G10 corresponde ao primeiro pico do gráfico (Figura 01) referente às frações numeradas de 25 a 42, enquanto que o segundo pico foi chamado de P2G10 referente às frações numeradas de 48 a 66. As frações que compõem o pico P1G10 foram reunidas e submetidas à concentração e liofilização. De 15 g de látex aplicados na coluna, foram obtidos 4,23 g de P1G10, representando um rendimento de 28%. A atividade amidásica específica foi de 29,09 nM.min⁻¹.mg⁻¹ e a quantidade de proteína total de 84,6 \pm 1,60 %.

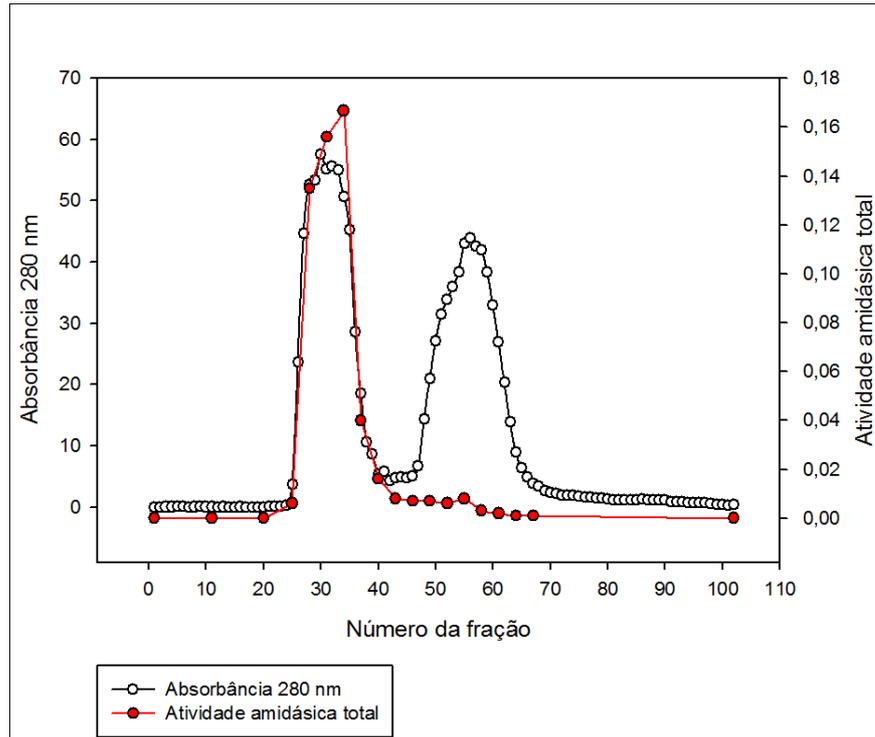


Figura 01 - Perfil cromatográfico da solução de látex após filtração em coluna “Sephadex G-10”. A solução do látex foi aplicada sobre a coluna Sephadex G10, sendo o perfil protéico e atividade amidásica determinados conforme descrito na metodologia (*item 2.1*).

Posteriormente, no intuito de caracterizar a composição protéica da amostra, foi realizada uma eletroforese em condições desnaturantes. A análise do gel (Figura 02) mostrou a presença de um perfil protéico reproduzível a partir das preparações testadas. A análise densitométrica do gel, usando o software Kodak versão 1D35, mostrou que o grupo mais abundante de proteínas continham massa relativa ao redor de 23 kDa, concordando com resultados prévios do nosso grupo. Em todos os experimentos realizados neste trabalho foi utilizado o estoque de P1G10, cujo perfil é mostrado na canaleta 4 da Figura 2.

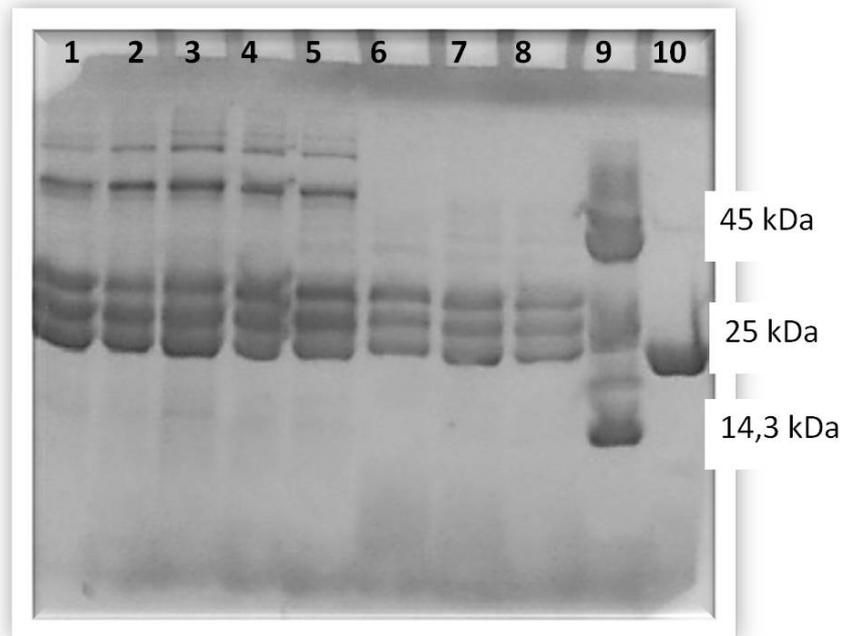


Figura 02 - Perfil eletroforético de diferentes amostras de látex de *V. candamarcensis* e fração P1G10 em gel SDS/PAGE 12% em condições desnaturantes. Canaletas 1 a 5, amostras de diferentes lotes de P1G10; canaletas 6 a 8, amostras de diferentes lotes de látex de *V. candamarcensis*; canaleta 9, padrão de peso molecular (ostra de P2G10. 10 μ g de ovalbumina, 45 kDa; 10 μ g de quimiotripsinogênio, 25 kDa e 10 μ g de lisozima, 14,3 kDa) e canaleta 10, amostra P2G10.

ANEXO C

AFERIÇÃO DA LÂMPADA 15W - COLER PARMER® 312 nm

A aferição foi realizada utilizando a lâmpada Cole Parmer® (312nm - lampada 15W), emissora de radiação, montada sobre suporte a 130mm acima do sensor, radiômetro Kip&Zonnen®, modelo CMP22. Os testes foram realizados à noite, em câmara escura, com objetivo medir a radiação líquida emitida pela lâmpada em relação à radiação ambiente.

Especificações do fabricante

Tipo produto	Lâmpada ultra-violeta padrão
Potencia lâmpada	15W
Comprimento de onda	312 nm
Intensidade	10 W/m ²
Dimensões	50x13x10cm.

Metodologia – O radiômetro conectado ao multiplexador, Agilent® - modelo 34980A, este com auxílio do software “Bench Link Data Logger” foi utilizado como sistema de aquisição de dados. O sistema iniciou tal aquisição com a lâmpada desligada e centralizada em relação ao radiômetro. Após efetuada a leitura de 10 medições da radiação de fundo a lâmpada foi ligada. O sistema de aquisição efetuou medidas da radiação emitida pela lâmpada, no mínimo, 20 pontos em intervalos de 5 segundos. Novamente, a lâmpada foi desligada para uma nova medição da radiação de fundo. Assim, três séries de medição foram efetuadas, e foi calculada a média das diferenças entre os picos de potência aferidos à 130mm do radiômetro, ver Figura 01.

A potência foi estimada pela média das diferenças da pico medidos mais dois desvios padrão da média.

Tabela 01 - Potencia lida pelo radiômetro com a lâmpada desligada e com a lâmpada ligada.

Medição	Pico sup.(W/m ²)	Inferior (W/m ²)	Δ Potencia(W/m ²)
1	7,986	-0,0809	8,067
2	8,160	0,0436	8,116
3	8,239	0,2369	8,002
-	-	-	Pot.(lampada) = 8,067 \pm 0,079

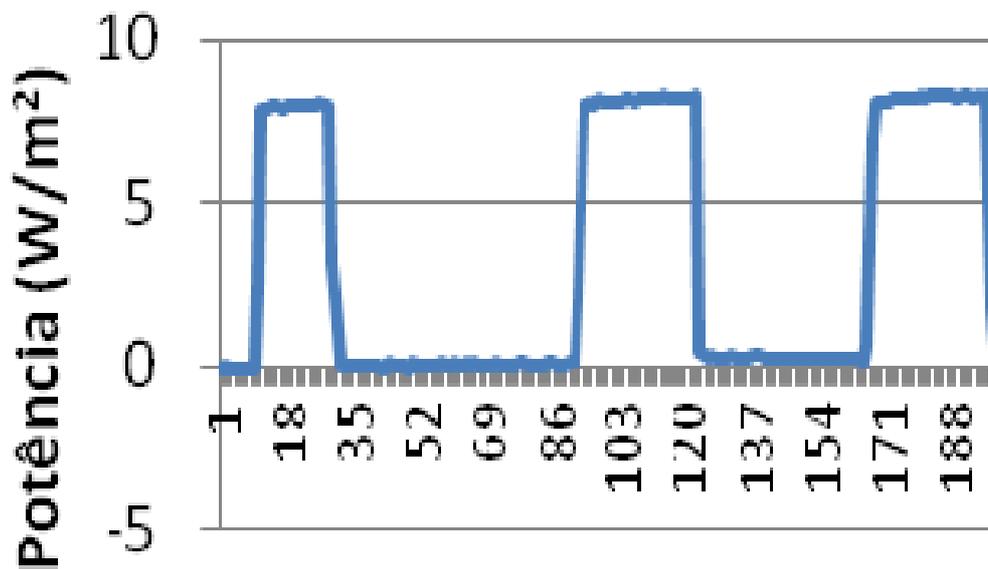


Figura 01 - Dados obtidos pelo radiômetro CMP22 e tratados em planilha Excel.

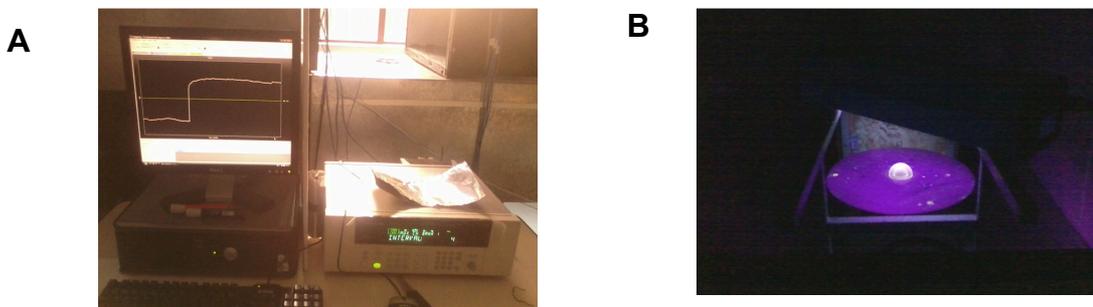


Figura 02. Fotos - A) Multiplexador e gráfico obtido pelo software. B) Radiômetro na câmara escura.

Imagens do laboratório do CEFET-MG - Fonte: CEFET-MG