



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATÁLIA SOARES RIBEIRO

**PAPEL DOS ESTRÓGENOS NAS LESÕES DE PELE
MEDIADAS POR ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR
RADIÇÃO UVB CRÔNICA**

NATÁLIA SOARES RIBEIRO

**PAPEL DOS ESTRÓGENOS NAS LESÕES DE PELE
MEDIADAS POR ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR
RADIAÇÃO UVB CRÔNICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof^a Dr^a Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Londrina
2012

R484p Ribeiro, Natália Soares.

Papel dos estrógenos nas lesões de pele mediadas por estresse oxidativo induzido por radiação UVB crônica / Natália Soares Ribeiro. – Londrina, 2012.
52 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Estresse Oxidativo – Teses. 2. Pele – Efeitos da radiação solar – Teses. 3. Estrogenos – Teses. 4. Patologia experimental – Teses. I. Armani, Alessandra Lourenço Cecchini. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

NATÁLIA SOARES RIBEIRO

**PAPEL DOS ESTRÓGENOS NAS LESÕES DE PELE MEDIADAS POR
ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR RADIAÇÃO UVB CRÔNICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Andréia Name Colado Simão
UEL – Londrina - PR

Prof^a Dr^a Ivete Conchon Costa
UEL – Londrina - PR

Prof^a Dr^a Alessandra Lourenço Cecchini Armani
UEL – Londrina - PR

Londrina, 23 de janeiro de 2012.

À Deus, meu refúgio e minha fortaleza por todas as bênçãos derramadas sobre a minha vida.

Aos meus pais, Elson e Silvia, que são exemplos de superação e sempre me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos. Ao meu irmão querido, Flávio, que apesar da distância está sempre perto, no meu coração.

Às minhas tias Mariza e Cida e minha prima Renata que sempre me acolheram com muito amor e paciência, ao meu namorado Rodolfo sempre disponível, compreensivo e disposto a ajudar.

Às minhas queridas amigas Mariana Finco, Paula Milanez, Melissa Scheller e Mariana Ribeiro pelo apoio e incentivo em todas as circunstâncias!

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Alessandra Lourenço Cecchini Armani, por todo empenho dedicado à mim durante toda a realização deste trabalho, por toda a sua compreensão, apoio e incentivo.

Ao professor Dr. Rubens Cecchini por todo conhecimento compartilhado que contribuiu grandemente para a execução deste trabalho.

À Ms. Vânia Terra e à Thamara Nishida, que foram meus braços direito e esquerdo, sempre prontas e dispostas a ajudar de diversas maneiras possíveis.

Ao professor Dr. Rodrigo Cabral Luiz e à professora Dr^a. Ivete Conchon Costa por terem aceitado participar da banca examinadora.

Aos técnicos de laboratório Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho, por toda assistência técnica prestada, pelos ensinamentos, apoio, paciência, carinho e cuidado, Deus os abençoe sempre!

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação, Paula Milanez, Poliana Marinello, Vanessa Jacob Victorino, Fernanda Carolina de Campos, Carolina Conchon, Carolina Panis, Paula Gaspar, Raíssa Pereira e Renato Cardoso que além da agradável companhia sempre estiveram dispostos a ajudar nos mais diversos assuntos. Muito obrigada a todos por compartilharem tão agradáveis e bons momentos.

À todo o corpo docente do Mestrado de Patologia Experimental, pela ampla contribuição em minha formação científica.

Agradeço ainda a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho e contribuíram para o meu amadurecimento e crescimento profissional e pessoal, vocês são muito importantes pra mim!

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar ainda que em vão, do que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”

Martin Luther King

RIBEIRO, Natália Soares. **Papel dos estrógenos nas lesões de pele mediadas por estresse oxidativo induzido por radiação uvb crônica.**2012. 52 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A privação ou redução acentuada dos hormônios femininos tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo e desordens metabólicas entre mulheres. O desequilíbrio no perfil redox semelhante àquele observado na mulher durante o declínio da função ovariana pode ser desenvolvido em modelo experimental animal através da ooforectomia bilateral. A radiação ultra-violeta B (UVB) é conhecida por promover lesões de pele mediadas por espécies reativas de oxigênio (EROs) levando a lesões foto-oxidativas. O objetivo desse estudo é verificar a resposta da pele às lesões oxidativas induzidas pela irradiação UVB crônica em modelo experimental com níveis de estrógenos reduzido. Para tanto, foram utilizadas ratas Wistar distribuídas em grupos experimentais submetidos a uma intervenção cirúrgica para retirada dos ovários (Ooforectomia) denominados Ooforectomia (O), Ooforectomia submetido à irradiação UVB (OUV) e Ooforectomia tratado com α – tocoferol e submetido à irradiação UVB (OUV α T) e seus controles (Sham) que sofreram a intervenção cirúrgica porém, sem retirada ovariana, denominados Sham (S), Sham submetido à irradiação (SUV) e Sham tratado com α – tocoferol e submetido à irradiação UVB (SUV α T). Uma semana após o procedimento cirúrgico iniciaram os tratamentos numa frequência de 3 vezes por semana. A irradiação aconteceu em 9 sessões, em doses crescentes, cuja dose acumulada foi de 1.314mJ/cm². O α – tocoferol foi administrado imediatamente antes das sessões de irradiação, na dose de 100mg/Kg animal por via intraperitoneal. Após quatro semanas o sangue foi coletado para dosagem do 17 β - estradiol e a pele coletada. A análise dos resultados revelou umaumentada peroxidação lipídica (QL)nos animais ooforectomizados(O), quando comparados com os controles(S). Houve também um aumento na formação de lipoperóxidos nos grupos ooforectomizados submetidos a radiação UVB (OUV) quando comparado com O, bem como nos grupos controle submetidos a UVB (SUV) quando comparado com os grupos S e SUV tratado com α -Tocoferol (SUV α T) quando comparado com S. Para confirmar a participação das EROS, os animais ooforectomizados e submetidos a irradiação UVB foram tratados com α -tocoferol(OUV α T) e os níveis de hidroperóxidos lipídicos retornaram aos valores basais. Os níveis de MDA aumentaram nos grupos OUV e OUV α T quando comparado com O, assim como nos grupos SUV e SUV α T quando comparado com S, não mostrando envolvimento de estrógenos na peroxidação lipídica tardia. A atividade da catalase apresentou uma forte tendência de aumento no grupo OUV quando comparado ao seu controle (O) e, no grupo SUV quando comparado com S não houve o mesmo comportamento, sugerindo que a redução dos níveis de estrogênio interferiu na atividade da catalase na pele de animais submetidos à irradiação UVB crônica. A capacidade antioxidante radical total (TRAP) permaneceu inalterada revelando não ocorrer nenhuma alteração nas defesas antioxidantes de baixa massa molecular, mesmo com a redução dos estrógenos. Através da QL, uma técnica bastante sensível para indicação de estresse oxidativo demonstrou-se que os estrógenos têm participação na proteção da pele num processo inicial de lipoperoxidação de membrana. Este estudo fornece a primeira abordagem sobre a relação do estresse oxidativo induzido pela irradiação UVB na pele de ratas num modelo experimental com níveis reduzidos de estrogênio.

Palavras-chaves: Estresse oxidativo. Pele. Radiação UVB. Estrógenos.

RIBEIRO, Natália Soares. **Role of Estrogens in Skin Lesions Mediated by Oxidative Stress Induced by Chronic UVB** 2012. 52 f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina.

ABSTRACT

The deprivation or significant reduction of female hormones is associated with increased oxidative stress and metabolic disorders among women. Imbalance in the redox profile similar to those observed in women during the decline ovarian hormonal activity can be obtained in an animal model through rat bilateral oophorectomy. The ultra-violet B radiation (UVB) may promote skin damage mediated by reactive oxygen species (EROs) leading to photooxidative damage in skin cells. The aim of this study is to assess the response of skin to oxidative damage induced by chronic UVB irradiation in an experimental model with lowest estrogen levels. In this study were used wistar female rats with 95-115grs and 10 weeks old, divided into six groups of eight animals, three experimental groups underwent surgery for removal of the ovaries (oophorectomy) called Oophorectomy (O), Oophorectomy submitted to chronic UVB irradiation (OUV) e Oophorectomy treated with α – tocopherol and submitted to chronic UVB irradiation (OUV α T) and their controls (Sham) who suffered surgical intervention but without ovarian removal, called Sham (S), Sham submitted to chronic UVB irradiation (SUV) e Sham treated with α – tocopherol and submitted to chronic UVB irradiation (SUV α T). One week after surgery began treatment at a frequency of 3 times per week. Irradiation took place in nine sessions, in which increasing doses accumulated dose was 1.314mJ/cm². The α -tocopherol was administered immediately before the sessions of irradiation at a dose of 100mg/kg animal intraperitoneally. After four weeks the blood was collected for determination of 17 β -estradiol and the skin was removed and stored for later analysis. The results showed an increase of lipid peroxidation (CL) in oophorectomized animals (O) when compared with controls (S). There was an increased significant of lipid peroxide formation in oophorectomized group submitted to UVB radiation (OUV) when compared with O, as in control group submitted to UVB (SUV) when compared with S and SUV treated with α - tocopherol. To confirm the involvement of ROS, the oophorectomized animals and submitted to UVB radiation were treated with α -tocopherol (OUV α T) and lipid hydroperoxide levels returned to basal values. MDA levels were increased in groups OUV and OUV α T when compared with O as in SUV and SUV α T when compared with S, not showing the involvement of estrogens in late lipid peroxidation. The catalase activity showed a strong tendency of increased in OUV group when compared O group and, in SUV group when compared with S was not presented the same behavior, suggesting that reduced levels of estrogen interfere in catalase activity in the skin of animals subjected to chronic UVB irradiation. The total radical antioxidant capacity (TRAP) remained unchanged, revealing that no changes occur in the low molecular antioxidants defenses even in reduction of estrogens. Through QL, a technique sensitive enough to indicate oxidative stress it was shown that estrogens play a role in protecting the skin in the initial process of membrane lipid peroxidation. This study provides the first approach to the reduction of estrogen by the ovaries removed (oophorectomy) of rats in relation to oxidative stress in the skin induced by UVB irradiation.

Keywords: Oxidative stress. Skin. UVB irradiation. Estrogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático das camadas da pele e seus componentes.....	12
Figura 2 - Fontes de espécies reativas na pele e mecanismos de defesa.....	15
Figura 3 - Estrutura molecular do 17 β -Estradiol.....	18
Figura 4 - Mecanismo de produção e regulação do Estradiol.....	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	A PELE.....	10
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO E BALANÇO REDOX NA PELE.....	13
1.3	EFEITOS OXIDATIVOS NA PELE PELA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UV.....	16
1.4	PAPEL DOS HORMÔNIOS FEMININOS NA PELE.....	18
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
	ARTIGO	31
	ANEXOS	51
	ANEXO A - Link do guia para autores da revista Photochemistry and Photobiology B: Biology.....	52

1 INTRODUÇÃO

A pele está continuamente exposta a uma combinação de fatores, tais como agentes químicos, físicos e microbiológicos, muitos dos quais induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (GUARATINI, MEDEIROS & COLEPICOLO, 2007).

Os raios ultravioleta (UV) são os principais responsáveis pela maioria das lesões cutâneas. As manifestações da exposição aguda incluem eritema e queimadura solar, já a exposição crônica leva ao envelhecimento e é considerada um dos agentes mais importantes para o desenvolvimento de doenças cutâneas malignas (PODDA *et al.*, 1998; SAIJA *et al.*, 2000).

Os estrógenos têm uma profunda influência sobre a pele. O hipoestrogenismo relativo que acompanha a menopausa exacerba os efeitos deletérios do envelhecimento intrínseco e ambiental (VERDIER-SÉVRAIN *et al.*, 2006). Diversos estudos sugerem que a ausência ou diminuição acentuada dos estrógenos levam ao aparecimento de diversas patologias oxidativas em vários sistemas corporais como no tecido cerebral, hepático, sanguíneo, não havendo relatos sobre a pele.

1.1 A PELE

A pele é um órgão complexo, formado por diferentes estruturas e com diversos tipos celulares, que atua como uma barreira protetora dos órgãos internos ao ambiente, enquanto mantém o balanço entre proliferação e descamação celular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Mais do que qualquer outro tecido, é exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos (GUARATINI, MEDEIROS & COLEPICOLO, 2007). Devido à sua estrutura complexa, a pele pode exercer diferentes funções como, manutenção de sua própria integridade e da integridade do organismo, proteção contra agressões a agentes externos, absorção e secreção de líquidos, controle da temperatura, barreira à prova d'água, metabolismo de vitamina D, funções estéticas e sensoriais e proteção contra a radiação UV (HARRIS, 2005).

O tegumento cutâneo é constituído por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica que se arranjam em três camadas distintas: a epiderme, a derme e a tela subcutânea, sendo que esta última, embora apresente a mesma estrutura e morfologia da

derme não faz parte da pele, apenas serve como suporte e união da derme aos órgãos subjacentes, além de permitir a pele uma considerável amplitude de movimento (KEDE & SABATOVICH, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A superfície externa da pele é formada por um epitélio pavimentoso estratificado, denominada epiderme que é principalmente composta por queratinócitos, melanina (pigmento produzido pelos melanócitos) e células apresentadoras de antígeno – Células de Langerhans. Uma membrana separa a epiderme da derme, a qual contém primariamente proteínas extracelulares produzidas pelos fibroblastos. O suprimento vascular da pele reside na derme (MUKHERJEE *et al*, 2006). Possui a capacidade de renovar-se continuamente, descamando-se e misturando-se com a secreção das glândulas sudoríparas e sebáceas, evitando que a pele tenha um aspecto escamoso ou áspero (ROTTA, 2008).

A pele pode ser classificada em pele fina e grossa. A pele grossa é caracterizada pela presença de cinco camadas epiteliais que cobrem a planta dos pés e a palma das mãos, não possuindo anexos cutâneos como folículo piloso, músculos eretores dos pêlos, nem glândulas sebáceas, mas possuindo glândulas sudoríparas (pele glabra). Demais regiões corporais protegidas por pele fina contendo quatro camadas epiteliais, que contém os anexos ausentes na pele grossa (DECCACHE, 2006).

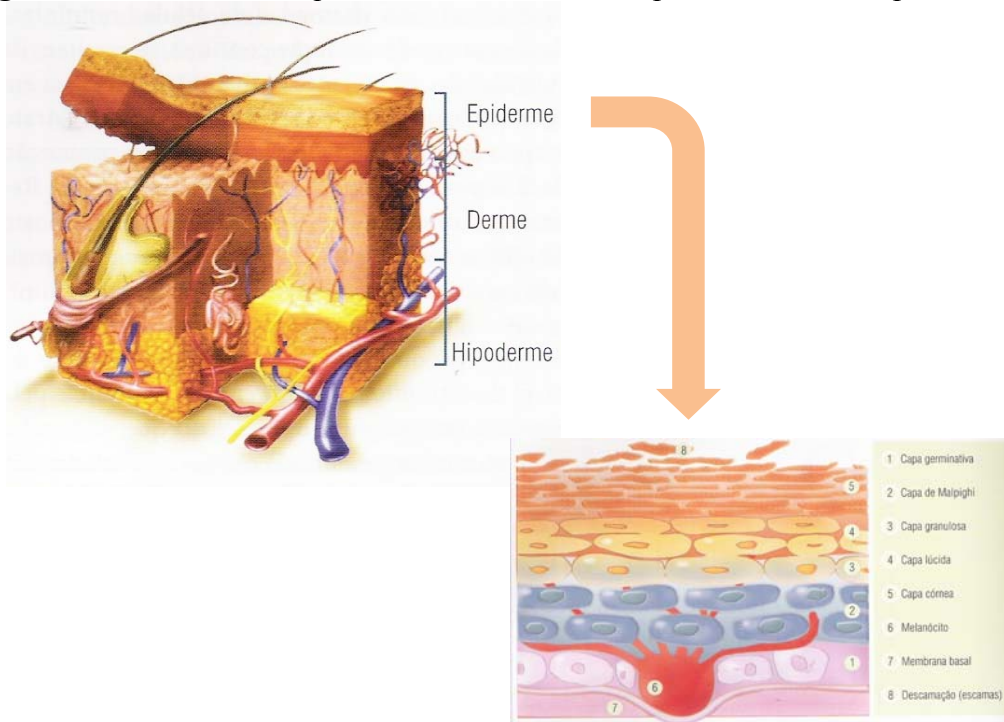
A parte mais externa da epiderme (estrato córneo) é portanto, o resultado de um processo que consiste em uma matriz de queratina (células mortas), que formam uma barreira protetora efetiva, sendo estas células (corneócitos), constantemente renovadas (HALIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Com a estratificação e o achatamento, o corneócito passa a ocupar uma área de aproximadamente vinte células basais (LODÉN & MAIBACH, 2000).

A camada basal é formada por células matrizes (stem cells) e células proliferativas, que são células germinativas e darão origem aos queratinócitos (KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005). Outro tipo celular importante da epiderme encontrado na camada basal ou estrato germinativo é o melanócito. São células dendríticas originadas a partir da crista neural com função de produção de melanina, um pigmento que pode variar do amarelo ao marrom, responsável pelas diferentes tonalidades de pele (SCOTT *et al.*, 2001).

A melanina é um poderoso pigmento antioxidante com função de proteção das células basais dos efeitos nocivos da radiação UV. Indivíduos com menor capacidade de produção de melanina são mais propensos a desenvolver câncer de pele. Devido a exposição à radiação UV, ocorre a ativação dos melanócitos e consequente aumento da produção de

melanina, observando-se o escurecimento da pele (GUARATINE, MEDEIROS & COLEPICOLA, 2007).

Figura 1 - Desenho esquemático das camadas da pele e de seus componentes.



Fonte: Borges (2010).

A derme é constituída por tecido conjuntivo e é responsável pelo suporte da trama vascular, pela defesa imunológica e também apresenta função nos mecanismos de termorregulação. Apresenta nervos, componentes celulares contendo células matrizes, fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos e mastócitos, sustentados por uma rede fibrosa de tecido conjuntivo, contendo elastina, colágeno e proteoglicanas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O colágeno é uma das principais proteínas extracelulares componentes dos tecidos conjuntivos. Sintetizadas pelos fibroblastos presentes na derme, formam uma grande massa da matriz extracelular e constituem 70 a 80% do peso da derme. Outra proteína com papel importante na derme é a elastina. Estas são responsáveis pelas propriedades retráteis da pele. São sintetizadas nos fibroblastos e compõem-se de micro fibrilas. Estão associadas ao colágeno, porém, em peles normais constituem apenas de 2 a 4% da derme. A matriz extracelular é um gel aquoso, formado de fibronectina e glicosaminoglicanas, que são ácidos hialurônicos, sulfato de condroitina e sulfato de dermatana, sintetizados pelos fibroblastos.

Fornecem meio para acomodação de células e fibras e promovem o transporte de água e eletrólitos (HARRIS, 2005).

Por ser um órgão exposto continuamente a agentes agressores, muitos dos quais induzem à formação de EROs e de ERNs, a pele possui mecanismos de resposta rápida, bem como moléculas antioxidantes de baixo peso molecular para contrabalançar o efeito deletério causado por espécies oxidativas. Estas espécies são fundamentais em diversos processos fisiopatológicos e bioquímicos, mantendo a sobrevivência e a homeostase celular, promovendo um equilíbrio refinado entre sua formação e remoção. Porém, quando há alterações acentuadas neste equilíbrio, um estado pró-oxidante é produzido, levando assim ao chamado estresse oxidativo (RASILAINEN *et al.*, 2002).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E BALANÇO REDOX NA PELE

O estresse oxidativo portanto, é um fenômeno que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e de ERNs e as defesas antioxidantes, podendo resultar tanto na diminuição destas defesas quanto no aumento da formação de EROs e ERNs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, porém, as membranas biológicas (retículo endoplasmático, membranas mitocondriais ou plasmáticas) são as mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica e pode resultar em alterações na organização estrutural, funcional, enzimática e na permeabilidade das membranas celulares (MELLO FILHO, HOFFMAN & MENEGHINI, 1984; CECHINI, ARUOMA & HALLIWELL, 1990).

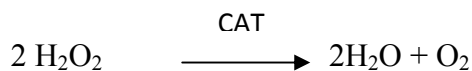
Dentre as EROs formadas na pele, podemos destacar os radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), os radicais peroxila e alcoxila ($\text{RO}_2\cdot$ e $\text{RO}\cdot$), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (BEAK *et al.*, 2004) e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos (ROOH). Além das EROs, também estão envolvidas em processos redox outras espécies intermediárias, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), tais como o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

São consideradas fontes exógenas o ar poluente, gases naturais deletérios, ozônio, alta concentração de oxigênio, radiação ionizante e não-ionizante, invasão de bactéria patogênica, vírus e toxina exógena. A pele também pode sofrer danos oxidativos por lesões físicas (KOHEN, FANBERSTEIN & TIROSH, 1997; KOHEN, 1999; KOHEN, GATI,

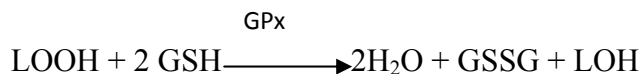
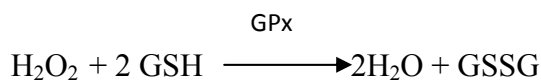
2000). A radiação UV desencadeia reações fotoquímicas nas células epidérmicas e dérmicas, conduzindo a processos degenerativos (HECK *et al.*, 2003; KVAN & DAHLE, 2003).

Antioxidantes endógenos desempenham uma função crucial na perfeita manutenção da função celular e deste modo da saúde e bem-estar sistêmicos (RAHMAN, 2007). Os mais eficientes antioxidantes enzimáticos envolvem a Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD) (MATES *et al.*, 1999). Os antioxidantes não enzimáticos incluem Tocoferol (vitamina E), Ascorbato (vitamina C), Thiol antioxidantes (Glutathione e Ácido Lipóico), Melanina, Carotenóides, Flavonóides naturais, Ácido urocânico (principal absorvente da radiação UV, além de ser o principal sequestrador natural de radical hidroxil) e outros compostos (MCCALL & FREI, 1999).

A CAT é uma enzima de células aeróbicas e é muito eficiente na conversão do H₂O₂ em água e molécula de oxigênio. Tem uma das maiores capacidades de conversão de todas as enzimas: uma molécula de CAT consegue converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de H₂O₂ em água e oxigênio a cada minuto (MATES *et al.*, 1999).



A GPx, por sua vez, é fundamental no metabolismo de H₂O₂ e de outros peróxidos, pois catalisa reações de doação de elétrons, no qual se utiliza da glutathione reduzida (GSH) como agente redutor, formando a glutathione oxidada (GSSG) (ROVER *et al.*, 2001).



A SOD é uma das mais eficientes enzimas antioxidantes intracelular. Neutraliza íons superóxidos através de sucessivos ciclos de redução de íons de metal de transição ativos (RAHMAN, 2007).

Os antioxidantes não enzimáticos ou de baixo peso molecular também contribuem com a manutenção do balanço redox celular. Nesta classe inclui-se um vasto

número de compostos, sintetizados *in vivo* ou obtidos exogenamente, que previnem danos oxidativos por interações diretas ou indiretas com as EROs/ERNs (BIALY *et al.*, 2002).

A Vitamina E, α -Tocoferol, é um importante antioxidante não enzimático de membrana celular (ACHIM, MICHAEL & RAJINDAR, 1999). Inúmeros são os trabalhos relatando que o α -Tocoferol pode atenuar o estresse oxidativo, principalmente por proteger membranas contra a lipoperoxidação. Tem sido demonstrado que o α -Tocoferol reage com o radical peróxil e como ânion superóxido protegendo o organismo da oxidação de constituintes essenciais dos tecidos ou impedindo a formação de produtos tóxicos da oxidação, como os produtos da lipoperoxidação formados a partir de ácidos graxos insaturados (NIKI *et al.*, 1984; FUKUZAWA & GEBICKI, 1985; MUKAI, KIKUCHI & URANO, 1990; MCCAY, 1990; MANZI *et al.*, 2003). Esta resposta tem sido atribuída à modulação do metabolismo celular do α -Tocoferol através de fatores de transcrição redox sensíveis, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), que é ativado em resposta de vários estímulos oxidantes (SCHRECK, ALBERMANN & BAEUERLE, 1992).

Figura 2 - Fontes de espécies reativas na pele e mecanismos de defesa.



Fonte: Guaratini, Medeiros e Colepicolo (2007).

1.3 EFEITOS OXIDATIVOS NA PELE PELA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UV.

A radiação UV provoca reações fotoquímicas. Ao alcançarem a pele, essas ondas penetram diferentemente, interagindo com as células da epiderme e da derme, conduzindo a processos degenerativos. Tais reações podem estimular a produção de

melanina, cuja manifestação é visível sob a forma de bronzeamento da pele, ou pode levar desde a produção de simples inflamação até graves queimaduras (KVAM & DAHLE, 2003).

Os raios solares contêm a radiação ultravioleta A, B e C. os raios UVC iniciam num comprimento de onda entre 180 e 290 nm, os UVB entre 290 e 320 nm e os UVA entre 320 e 400 nm. As UVA e UVB estimulam a formação de radicais livres e podem provocar o estresse oxidativo. Esta estimulação é dependente da penetração nas camadas da pele (SCOTT *et al.*, 2007).

A radiação UVB (280-320 nm) é o agente físico mais descrito como formador de espécies reativas na pele (ARMSTRONG & KRICKER, 2001; BICKERS & ATHAR, 2006), e embora exista muito mais UVA do que UVB no espectro solar, a UVB é 1000 vezes mais eficaz em produzir eritema do que a UVA. A UVB requer de 2,0 a 5,0 j/cm² para produzir uma dose mínima eritematosa, eo eritema atinge a máxima intensidade de 6 a 20 horas após a exposição (YING, PARRISH & PATHAK, 1974).

Tem sido sugerido que a reação das ERs formadas pelas radiações UV com componentes celulares podem resultar em lipoperoxidação, oxidação de proteínas e de DNA (LINTON, DAVIES & DEAN, 2001; BICKERS & ATHAR, 2006).

A exposição solar é um dos fatores mais importantes, por seus efeitos cumulativos, no desenvolvimento dos cânceres de pele (ICHIHASHI *et al.*, 2003). É responsável pela diminuição de sistemas antioxidantes cutâneos, bem como pelo aumento de sistemas oxidantes com produção de ERs, por diversos mecanismos, alterando assim o balanço redox celular e a homeostasia cutânea, responsáveis pelas lesões oxidativas da pele (JURKIEWICZ & BUETTNER, 1996; INAL & KAHRAMAN, 2000; YASUI & SAKURAI, 2000).

A radiação UVB é bem conhecida por induzir várias espécies oxidantes incluindo o óxido nítrico, peroxinitrito e componentes nitrosos (VILLIOTOU & DELICONSTANTINOS, 1995). Terra *et al.* (2012) num modelo de irradiação UVB em camundongos hairless verificaram que imediatamente após a irradiação, a lesão na pele dos camundongos é mediada por ERs como o ¹O₂, HO• e •NO, entretanto, os maiores níveis de hidroperóxidos lipídicos e •NO foram observados 24 h após a irradiação.

Punnonem *et al.* (1995) num modelo de irradiação crônica UVB em epiderme *in vivo* verificou a indução da atividade da SOD que é conhecida por ter um importante papel na eliminação do •O₂⁻. Os dados desse estudo sugerem que a resposta do sistema de defesa antioxidante frente à radiação UVB crônica difere consideravelmente daqueles causados por uma única dose de irradiação UVB.

Num estudo para avaliar o impacto da exposição crônica da radiação UVB sobre a produção de EROs e de lesões oxidativas de macro-moléculas como lipídios e DNAnA pele de camundongos, verificou-se aumento dos níveis de H_2O_2 nas amostras de pele submetidas à exposição de 15 kJ/m^2 de UVB três vezes por semana por 1-2 semanas (WEI *et al.*, 2002).

Num modelo de irradiação crônica UVB em camundongos hairless, Peres *et al.* (2011) verificou um desequilíbrio entre as capacidades antioxidantes e os processos oxidativos com diminuição da capacidade antioxidante total tanto no envelhecimento cronológico quanto no fotoenvelhecimento. Verificou também que a exposição de lipídeos de membrana celular ocorre em menor extensão nos animais jovens quando comparados com os mais velhos e que apesar da capacidade antioxidante total ter diminuído, a pele em animais jovens possui maior capacidade em promover uma eficiente resposta frente ao estresse oxidativo.

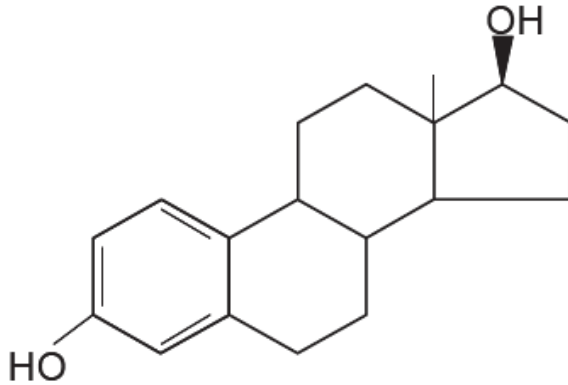
Sabe-se que grande parte das alterações cutâneas antes atribuídas ao processo de envelhecimento cronológico, devem-se entre outros fatores à exposição solar crônica (HELENIUS *et al.*, 1996). A radiação UVB na pele induz o aumento da atividade das gelatinases (matriz metaloproteinase-2 e 9), as quais atuam na degradação de colágeno, contribuindo para a formação de rugas e evolução do fotoenvelhecimento (INOMATA *et al.*, 2003).

Muitos estudos têm mostrado a formação de EROs e ERNs pela ação da radiação UVB, entretanto, não há até o presente momento relato sobre a ação da radiação UVB crônica na pele de animais que foram submetidos à privação dos estrógenos.

1.4 PAPEL DOS HORMÔNIOS FEMININOS NA PELE

O estrogênio é o esteróide predominante responsável pelas características sexuais secundárias nas mulheres e possui influência nas funções dos principais sistemas orgânicos corporais (HALL & PHILLIPS, 2005). A principal fonte de biossíntese é no ovário a partir de andrógenos pela perda do grupo metil do C-19 (carbono) e consequente formação de um anel aromático pelo complexo aromatase (PAYNE & HALES, 2004).

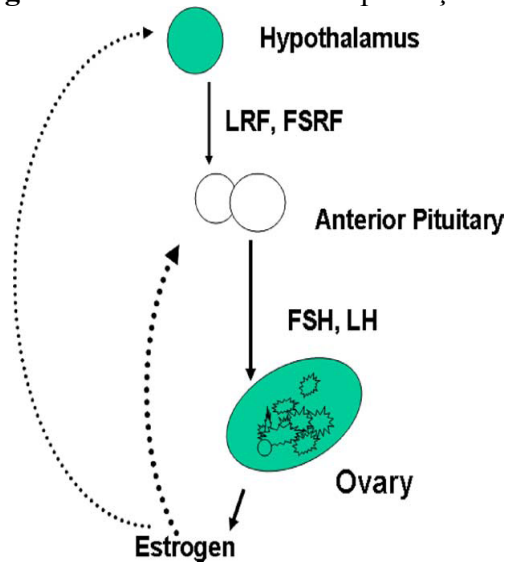
Figura 3 - Estrutura molecular do 17 β -Estradiol.
17 β -estradiol



Fonte: Payne e Hales (2004).

A regulação ocorre pelo eixo pituitária – hipotálamo e depende da ação integrada desses órgãos com os ovários. A liberação pulsada de gonadotrofina pelo hipotálamo estimula a pituitária anterior que secreta os hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). Nos ovários o LH estimula as células Theca a produzir a androstenediona enquanto o FSH estimula a conversão de androstenediona em Estradiol (Figura 4) (HALL & PHILLIPS, 2005).

Figura 4 - Mecanismo de produção e regulação do Estradiol.



Fonte: Hall e Phillips (2005).

A pele constitui o maior alvo não reprodutivo no qual o estrogênio atua (HALL & PHILLIPS, 2005). A influência do estrogênio nos diferentes sistemas orgânicos e especialmente nos sistemas reprodutores, nervoso, cardiovascular e ósseo tem sido bem documentada, entretanto, a área menos explorada é quanto o efeito do estrogênio na pele (VERDIER_SEVREIN, BONTÉ & GILCHREST, 2006).

Sabe-se que os estrógenos produzem efeitos significativos na fisiologia da pele, aumentando a atividade mitótica de queratinócitos e estimulando a proliferação celular, aumentando a espessura da derme por estimulação da síntese de colágenos pelos fibroblastos dérmicos (STEVENSON & THORNTON, 2007). Um grande número de estudos têm mostrado que os estrógenos aceleram a cicatrização de feridas (ASHCROFT & ASHWORTH, 2003), enquanto um número significativo de mulheres relataram uma melhora de doenças inflamatórias da pele como a psoríase durante a gestação (DUNNA & FINLAY, 1989; BOYD *et al.* 1996; RAYCHAUDHURI *et al.* 2003). Estrógenos também oferecem alguma proteção contra o fotoenvelhecimento (WEINSTOCK, 1994; TSUKAHARA *et al.* 2001, 2004) e estudos epidemiológicos indicam que a taxa de mortalidade de câncer não-melanoma (WEINSTOCK, 1994) e melanoma (MILLER & MACNEIL, 1997) é significativamente menor em mulheres.

Os anos após a menopausa representam um estado de privação do estrogênio, resultando em efeitos deletérios sistêmicos (BRINCAT *et al.*, 1987; STEVENSON & THORNTON, 2007). Os efeitos da privação do estrogênio na pele podem

incluir a formação de rugas, ressecamento, atrofia, flacidez, má cicatrização de feridas e atrofia vulvar (HALL & PHILLIPS, 2005).

Diversos estudos têm mostrado que a terapia com estrogênio melhora a hidratação e elasticidade da pele, aumenta a densidade das fibras colágenas, reduz rugas de expressão e aumenta a espessura quando comparada com mulheres que não fazem uso de estrogênio terapia (RITTIÉ *et al.* 2008).

Rauramo & Punnonen em 1969, verificaram em mulheres privadas dos hormônios sexuais femininos um espessamento da epiderme assim como uma menor capacidade de retenção hídrica epidérmica. Outros estudos têm demonstrado, em concordância com o estudo citado acima, a diminuição da capacidade de retenção hídrica no estrato córneo (PIERARD-FRANCHIMONT *et al.*, 1995) assim como há relatos na literatura da diminuição da superfície lipídica da pele em mulheres na menopausa (CALLENS *et al.*, 1996; SATOR *et al.*, 2001). Portanto, essas mudanças sugerem que a privação ou redução acentuada dos hormônios femininos prejudica a função da barreira epidérmica em atuar na prevenção da perda de água e na manutenção da estrutura do tecido subcutâneo.

Brinck *et al.* (1987) publicou em seu estudo que ocorre uma diminuição de 1% a 2% de colágeno dérmico por ano após a menopausa. Diversos estudos sugerem que a perda de colágeno está mais relacionada com a ausência dos estrógenos do que com o envelhecimento cronológico, refletindo dessa maneira o importante papel do estrogênio para a manutenção das estruturas dérmicas. A terapia de reposição hormonal na pele de camundongos demonstraram um aumento de glicosaminoglicanas dérmicas após duas semanas de terapia (GROSMAN, HVIDBERG & SCHOU, 1971).

A flacidez e o aparecimento de rugas são dois sinais cutâneos do envelhecimento e estão relacionados com a perda da elasticidade da pele (HALL & PHILLIPS, 2005). Diversos estudos revelam os efeitos do estrogênio na elasticidade da pele através de métodos não invasivos. Bologna *et al.* (1989) através de um estudo por microscopia eletrônica verificou a degeneração estrutural das fibras elásticas dérmicas em mulheres num estágio recente de privação hormonal. Através de estudos histológicos, Punnonen *et al.* (1987) observaram um aumento local na concentração e tamanho das fibras elásticas em 50% das mulheres na pós-menopausa que receberam um tratamento de 2mg/d de estradiol abdominal por três semanas.

Outras alterações verificadas na pele de mulheres na pós-menopausa são quanto à cicatrização de feridas cutâneas. Muitos idosos apresentam um atraso na cicatrização de feridas e têm-se demonstrado que o estrogênio possui um papel fundamental nesse

processo (JORGENSEN & SCHMIDT, 1962; CALVIN *et al.*, 1998). Num estudo randomizado duplo-cego para o tratamento de feridas cutâneas com estrogênio trans-dérmico verificou-se após biópsia da área tratada uma melhora no processo de cicatrização de feridas tanto em homens quanto em mulheres idosos quando comparados com o grupo controle (ASHCROFT *et al.*, 1999). Uma excessiva resposta inflamatória resultando em proteólise tem sido implicada no atraso da cicatrização de feridas de pessoas idosas que apresentam elevados níveis de enzimas proteolíticas como a elastase em associação com alta contagem de neutrófilos (HERRICK, ASHCROFT & IRELAND, 1997). Inicialmente pensava-se que os estrógenos atuavam aumentando os níveis de TGF- β 1, uma citocina envolvida na proliferação, diferenciação celular e na produção da matriz extracelular (ASHCROFT *et al.*, 2000). Entretanto, tem-se evidenciado que os estrógenos agem diminuindo a quimiotaxia e adesão neutrofílica, assim como os níveis de elastase nas feridas, permitindo o aumento da produção de matriz extracelular (ASHCROFT *et al.*, 1999).

Muitos estudos têm proposto que os estrógenos são importantes moduladores das funções protetoras cerebrais, podendo ativar receptores alvo estrógeno-responsivos nas regiões promotoras de determinados genes (AGUIAR *et al.*, 2008). Esses receptores atuam como fatores de transcrição e podem, por exemplo, aumentar a expressão e atividade de enzimas antioxidantes como a SOD mitocondrial e extracelular, favorecendo a defesa antioxidante do tecido (MnSOD e ecSOD) (STREHLOW *et al.*, 2003; AGUIAR *et al.*, 2008).

Ozamack e Sayan (2009) verificaram em seu estudo com ratas ooforectomizadas que a combinação de tratamento de estrógenos e progesterona apresenta um notável efeito neuroprotetor reduzindo o estresse oxidativo cerebral. Aguiar *et al.* (2008), observou uma significativa alteração no perfil oxidativo cerebral e sanguíneo de ratas ooforectomizadas durante o processo de envelhecimento, sugerindo a importância do hormônio feminino enquanto protetores contra lesões oxidativas. Entretanto, ainda não há na literatura estudos que identifiquem essa mesma função do estrogênio na pele.

A privação dos estrógenos também é responsável pelo aumento da atividade de peroxidases sanguíneas (CAT e GPx) e diminuição das defesas antioxidantes não-enzimáticas plasmáticas, acompanhada de aumento da produção de proteínas carboniladas (BEHR, SCHNORR & MOREIRA, 2011). Da Rocha *et al.* (2011) verificou em seu modelo experimental com ratas ooforectomizadas, o aumento de GSH e da atividade da Glutathione S-transferase assim como a diminuição da atividade da CAT no fígado dos animais que sofreram tal privação hormonal.

Várias pesquisas têm sido realizadas para contribuir e melhorar a abordagem em relação aos diversos efeitos e alterações sistêmicas apresentadas na redução dos estrógenos, porém, não há relatos de estudos sobre o estresse oxidativo na pele quando há privação desse hormônio.

Neste trabalho utilizamos um modelo experimental de irradiação crônica UVB na pele em animais submetidos à privação do estrogênio, procurando avaliar os aspectos do balanço entre a formação de espécies reativas e as variações no sistema antioxidante endógeno enzimático e não enzimático.

REFERÊNCIAS

- ACHIM, L.; MICHAEL, J. F.; RAJINDAR, S.S. Effects of coenzyme Q10 and α -tocopherol administration on their tissue levels in the mouse: elevation of mitochondrial α -tocopherol by coenzyme Q10. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, n° 11/12, p. 1375–1382, 1999.
- AGUIAR, R. B.; DICKEL, O. E.; CUNHA, R. W.; MONSERRAT, J. M.; BARROS, D. M.; MARTINEZ, P. E. Estradiol valerate and tibolone: effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats. *Biogerontology*. v. 9, p. 285–298, April 2008.
- ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. the epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology B, Lausanne*, v. 63, p. 8 – 18, Oct. 2001.
- ASHCROFT, G.S.; ASHWORTH, J.J. Potential role of estrogens in wound healing. *Am. J. Clin. Dermatol.* v. 4, p. 737–743, 2003.
- ASHCROFT, G.S.; DODSWORTH, J.; BOXTEL, E.; TARNUZZER, R.W.; HORAN, M.A.; SCHULTZ, G.S.; FERGUSON, M.W. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. *Nat Med.* n. 3, p. 1209-15, 1997.
- ASHCROFT, G.S.; GREENWELL-WILD, T.; HORAN, M.A.; WAHL, S.M.; FERGUSON, M.W. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol.* v. 155, p. 1137-46, 1999.
- ASHCROFT, G.S.; LEI, K.; JIN, W.; LONGENECKER, G.; KULKARNI, A.B.; GREENWELL-WILD, T.; HALE-DONZE, H.; MCGRADY, G.; SONG, X.Y.; WAHL, S.M. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med.* n. 6, p. 1147-53, 2000.
- BEAK, S. M.; PAEK, S. H.; JAHNG, Y.; LEE, Y. S.; KIM, J. A. Inhibition of UVA irradiation-modulated signaling pathways by rutaecarpine, a quinazolinocarboline alkaloid, in human keratinocytes. *Eur. J. Pharmacol.* n. 498, v.19, 2004.
- BEHR, G.A.; SCHNORR, C.E.; MOREIRA, J.C. Increased blood oxidative stress in experimental menopause rat model: the effects of vitamin A low-dose supplementation upon antioxidant status in bilateral ovariectomized rats. *Fundam Clin Pharmacol.* Jan. 2011.
- BIALY, T.L.; ROTHE, M.J.; GRANT-KELS, J.M.; KOHEN, R. dietary factors in the prevention and treatment of nonmelanoma skin cancer and melanoma. *Dermatologic Surgery*. v. 28, n. 12, p. 1143, Dec. 2002.
- BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin cancer and melanoma. *Dermatologic Surgery*. New York, v. 28, n. 12, p. 1143, Dec. 2002.
- BOLOGNIA, J.L.; BRAVERMAN, I.M.; ROSSEAU, M.E.; SARREL, P.M. Skin changes in menopause. *Maturitas*. v. 11, p. 295-304, 1989.
- BORGES, F. *Dermato Funcional – Modalidades Terapêuticas nas disfunções estéticas*. 2ª Ed. SP: Editora Phorte. 2010.

BOYD, A.S.; MORRIS, L.F.; PHILLIPS, C.M.*et al.* Psoriasis and pregnancy: hormone and immune system interaction. *Int J Dermatol.* v. 35, p. 169–172, 1996.

BRINCAT, M.; VERSI, E.; MONIZ, C.F.; MAGOS, A.; DE TRAFFORD, J.; STUDD, J.W. Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. *Obstet Gynecol*, n. 70, p. 123–7, 1987.

CALLENS, A.; VAILLANT, L.; LECOMTE, P.; BERSON, M.; GALL, Y.; LORETTE, G. Does hormonal aging exist? A study of the influence of different hormone therapy regimens on the skin of postmenopausal women using non-invasive measurement techniques. *Dermatology.* v.193, p. 289-94, 1996.

CALVIN, M.; DYSON, M.; RYMER, J.; YOUNG, S.R. The effects of ovarian hormone deficiency on wound contraction in a rat model. *Br J Obstet Gynaecol.* v. 105, p.223-7, 1998.

CECCHINI, R.; ARUOMA, O.I.; HALIWWELL, B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes or from DNA damage by bleomycin or o-phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Radical Research Communications*, Switzerland, v. 10, n. 415, p. 245-258, 1990.

DA ROCHA, J.T.; PINTON, S.; MAZZANTI, A.; MAZZANTI, C.M.; BECKEMANN, D.V.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Effects of diphenyl diselenide on lipid profile and hepatic oxidative stress parameters in ovariectomized female rats. *J Pharm Pharmacol.* n.63, v. 5, p. 663-9. Maio 2011.

DECCACHE, D.S. Formulação dermocosmética contendo DMAE glicolato e filtros solares: desenvolvimento de metodologia analítica, estudo de estabilidade e ensaio de biometria cutânea. Rio de Janeiro, 2006. 152f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

DUNNA, S.F.; FINLAY, A.Y. Psoriasis: improvement during and worsening after pregnancy. *Br J Dermatol.* v.120, p. 584, 1989.

FUKUZAWA, K.; GEBICKI, J. M. Oxidation of alpha-tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 226, n°. 242–251, 1983.

GROSMAN, N.; HVIDBERG, E.; SCHOU, J. The effect of estrogenic treatment on the acid mucopolysaccharide pattern in skin of mice. *Acta Pharmacol Toxicol.* v. 30, p. 458-64, 1971.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M.H.G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, SP, v. 30, n 1, p. 206 – 213, Janeiro 2007.

GUARNIER, F. A.; CECCHINI, A.L.; SUZUKAWA, A.A.; MARAGNO, A.L.; SIMÃO, A.N.; GOMES, M.D.; CECCHINI, R. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with walker 256 solid tumor. *Muscle Nerve*, v. 42, p. 950–958, Maio 2010.

HALL, G.; PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: The effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol.* n. 53, p. 555-68, 2005.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free Radicals in biology and medicine, 4^a ed., *Oxford Science Publications*: Oxford, 2007.
- HARRIS, M. I. C. Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento. 2^a ed. SP: Senac, 2005.
- HECK, D.E.; VETRANO, A.M.; MARIANO, T.M.; LASKIN, J.D. UVB light stimulates production of reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 278, n. 25, p. 22432-22436, May. 2003.
- HELENIUS, M.; HANNINEN, M.; LEHTINEN, S.K.; ANTERO, S. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsiveNF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. v. 28, n.3, p. 487-498, Mar. 1996.
- INAL, M. E.; KAHRAMAN, A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet induced oxidative stress in rats. *Toxicology*. Limerick, v. 154, n. 1/3, p. 21-29, Jul. 2003.
- ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. *Toxicolog*. n.189, v. 21, 2003.
- INOMATA, S.; MATSUNAGA, Y.; AMANO, S.; TAKADA, K.; KOBAYASHI, K.; TSUNENAGA, M.; NISHIYAMA, T.; KOHNO, Y.; FUKUDA, M. Possible Involvement of Gelatinases in Basement Membrane Damage andWrinkle Formation in Chronically Ultraviolet B-exposed Hairless Mouse. *J Invest Dermatol*. v. 120, n. 1, p.128-134, Jan. 2003.
- JORGENSEN, O.; SCHMIDT, A. Influence of sex hormones on granulation tissue formation and on healing of linear wounds. *Acta Chir Scand*. v. 124, p. 1-10, 1962.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 11^a ed. v. 5. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- JURKIEWICZ, B. A.; BUETTNER, G. R. EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human. *Photochem. Photobiol*. v. 64, p. 918, 1996.
- KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. *Dermatologia estética*. São Paulo: Atheneu, 2004.
- KOHEN, R. skin antioxidants: their role in aging in oxidative stress-New approaches for their evaluation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Paris, v. 53, n. 4, p. 181-192, May 1999.
- KOHEN, R; GATI, I. skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology*. v. 148, n.2, p. 149-157, Aug. 2000.
- KOHEN, R; FANBERSTEIN, D.; TIROSH, O. Reducing equivalents in the aging process. *Archives of gerontology and Geriatrics*. v. 24, n. 2, p. 103-123, Mar. 1997.
- KUMAR, V; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7^a ed. RJ: Elsevier, 2005.
- KVAN, E.; DAHLE, J. Pigmented melanocytes are protected against ultraviolet –A – induced membrane damage. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 121, n.3, p. 564-569, Sep. 2003.

LODÉN, M; MAIBACH, H. I. Dry skin and Moisturizers: Chemistry and Function (Boca Raton: CRC Press), p. 447, 2000.

LINTON, S.; DAVIES, M. J.; DEAN, R. T. Protein oxidation and ageing. *Experimental Gerontology*. Elmsford, v. 36, n. 9, p. 1503-1518, Sep. 2001.

MANZI, F. R.; BÓSCOLO, F. N.; ALMEIDA, S. M.; TUJI, F. M. estudo morfológico do efeito radioprotetor da vitamina E (DL α -Tocoferil) na reparação tecidual de ratos. *Radiol. Bras*, n. 36, v. 6, p. 367-371, 2003.

MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; DE CASTRO IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem*, v. 32, p. 595–603, 1999.

MCCALL, M. R.; FREI, B. Can Antioxidant Vitamins Materially Reduce Oxidative Damage in Humans? *Free Rad Biol Med*, v. 26, p. 1034–53, 1999.

MCCAY, P. B. Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Annu. Rev. Nutr.* v. 5, p.323–340, 1985.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intra cellular iron. *The Biochemical Journal*. London, v. 218, p. 273-275, Feb. 1984.

MILLER, J.G.; MACNEIL, S. Gender and cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*, v. 136, p. 657–665, 1997.

MUKAI, K.; KIKUCHI, S.; URANO, S. Stopped-flow kinetic study of the regeneration reaction of tocopheroxyl radical by reduced ubiquinone-10 in solution. *Biochim. Biophys. Acta* v.1035, p. 77–82, 1990.

MUKHERJEE, S.; DATE, A.; PATRAVALE, V.; KORTING, H.C.; ROEDER, A.; WEINDL, G. Retinoids In The Treatment Of Skin Aging: An Overview Of Clinical Efficacy And Safety. *Clinical Interventions in Aging*. Germany, v.1, n.4, p. 327 – 348, 2006.

NIKI, E.; SAITO, T.; KAWAKAMI, A.; KAMIYA, Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J. Biol. Chem.* v. 259, p. 4177–4182, 1984.

OZACMAK, V. H.; SAYAN, H. The Effects of 17β Estradiol, 17α Estradiol and Progesterone on Oxidative Stress Biomarkers in Ovariectomized Female Rat Brain Subjected to Global Cerebral Ischemia. *Physiol. Res.*, n.58, p. 909-912, 2009.

PAYNE, A.H.; HALES, D.B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endor Rev.* n. 25, p. 947–70, 2004.

PERES, P. S.; TERRA, V. A.; GUARNIER, F. A.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L.Photoaging and chronological aging profile: understanding oxidation of the skin. *Photochemistry and photobiology: Biology A* 00-00-2011 (in press).

PIERARD-FRANCHIMONT, C.; LETAWE, C.; GOFFIN, V.; PIERARD, G.E. Skin water-holding capacity and transdermal estrogen therapy for menopause: a pilot study. *Maturitas*. v. 22, p.151-4, 1995.

- PODDA, M.; TRABER, M.G.; WEBER, G.; YAN, L.J.; PACKER, L. Uv-irradiation depletes antioxidantess and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 24, n. 1, p. 55-65, Jan. 1998.
- PUNNONEN, K.; LEHTOLA, K.; AUTIO, P.; KIISTALA, U.; AHOTUPA, M. Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 30, p. 43-48, 1995.
- PUNNONEN; R.; VAAJALAHTI, P.; TEISALA, K. Local estriol treatment improves the structure of elastic fibers in the skin of postmenopausal women. *Ann Chir Gynaecol*. v. 202(Suppl), p. 39-41, 1987.
- RAHMAN, K. Studies on Free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors. *Clinical Interventions in Aging*. England, v. 2, p. 219–236, 2007.
- RASILAINEN, S.; NIEMINEN, J. M.; LEVONEN, A. L.; OTONKOSKI, T.; LAPATTO, R. Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide *Biochem. Pharmacol*. v. 63, p. 1297, 2002.
- RAURAMO L, PUNNONEN R. Wirkung einer oralen oestrogen-therapie mit oestriolsuccinat auf die Haut kastrierter Frauen. *Z Haut Geschl Kr*. v. 44, p.463-70, 1969.
- RAYCHAUDHURI, S.P.; NAVARE, T.; GROSS, J.; RAYCHAUDHURI, S.K. Clinical course of psoriasis during pregnancy. *Int J Dermatol*. v. 42, p. 518–520, 2003.
- RITTIÉ, L.; KANG, S.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. F. Induction of Collagen by Estradiol Difference Between Sun-Protected and Photodamaged Human Skin In Vivo. *Arch Dermatol*. v. 144, n. 9, p. 1129-114, 2008.
- ROTTA, O. *Guia de dermatologia: clínica, cirúrgica e cosmiátrica*. 1. ed. São Paulo: Manole, 2008.
- ROVER, L.J.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 112-119, Jan. 2001.
- SAIJA, A.; TOMAINO, D.; TRMBETA, A.; DE PASQUALE, A.; UCELLA, N.; BARNUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 199, p. 39-47, Apr. 2000.
- SATOR, P. G.; SCHMIDT, J. B.; SATOR, M. O.; HUBER, J. C.; HONIGSMANN, H. The influence of hormone replacement therapy on skin aging: a pilot study. *Maturitas*. v. 39, p.43-55, 2001.
- SCHRECK, R.; ALBERMANN, K.; BAEUERLE, P.A. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radicals Res. Commun*. n. 17, p. 221–237, 1992.
- SCOTT, G., DENG, A.; RODRIGUEZ-BURFORD, C.; SEIBERG, M.; HAN, R.; BABIARZ, L.; GRIZZLE, W.; BELL, W., PENTLAND, A. Protease-activated Receptor-2, a Receptor

Involved in Melanosome Transfer, Is Upregulated in Human Skin by UV Irradiation. *The Journal of Investigative Dermatology*. 117(6), Chapel Hill, p. 1412-1419, 2001.

SCOTT, L.; SCOTT, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCOS, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 153-166, Abr. 2007.

STEVENSON, S.; THORNTON, J. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. *Clinical Interventions in Aging*. n. 2, v. 3, p. 283–297, 2007.

STREHLOW, K.; ROTTER, S.; WASSMANN, S.; ADAM, O.; GROHE´ C.; LAUFS, K.; BO´HM, M.; NICKENIG, G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res*. n. 93, v. 2, p. 170–177, 2003.

SUMINO, H.; ICHIKAWA, S.; KASAMA, S.; TAKAHASHI, T.; KUMAKURA, H.; TAKAYAMA, Y.; KANDA, T.; MURAKAMI, M.; KURABAYASHI, M. Effects of raloxifene and hormone replacement therapy on forearm skin elasticity in postmenopausal women. *Maturitas*. n. 62, p. 53–57, 2009.

TSUKAHARA, K.; MORIWAKI, S.; OHUCHI, A.; FUJIMURA, T.; TAKEMA, Y. Ovariectomy accelerates photoaging of rat skin. *Photochem Photobiol*, v. 73, p. 525–531, 2001.

TSUKAHARA, K.; NAKAGAWA, H.; MORIWAKI, S.; KAKUO, S.; OHUCHI, A.; TAKEMA, Y.; IMOKAWA, G. Ovariectomy is sufficient to accelerate spontaneous skin ageing and to stimulate ultraviolet irradiation-induced photoageing of murine skin. *Br J Dermatol*, v. 151, p. 984–994, 2004.

TERRA, V. A.; SOUZA-NETO, F. P.; PEREIRA, R. C.; SILVA, T. N. S.; 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. *The Journal of Photochemistry and Photobiology B*, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.01.003.

VERDIER-SE´VRAIN, S.; BONTE´, F.; GILCHREST, B. Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatology*. n. 15, p. 83–94, 2006.

VILLIOTOU, V.; DELICONSTANTINOS, G. Nitric oxide, peroxynitrite and nitroso-compounds formation by ultraviolet a (UVA) irradiated human squamous cell carcinoma: potential role of nitric oxide in cancer prognosis. *Anticancer Res*. n. 15, p. 931– 942, 1995.

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 Letters*. v. 185, n. 1, p. 21-29, Nov. 2002.

WEINSTOCK, M.A. Epidemiologic investigation of nonmelanoma skin cancer mortality: the Rhode Island Follow-Back Study. *J Invest Dermatol*. v. 102, p.6S–9S, 1994.

YASUI, H.; SAKURAI, H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, n. 269, v. 1, p. 131-136, *Mach* 2000.

YING, C. Y.; PARRISH, J. A.; PATHAK, M. A. additive erythemogenic effects of middle (280-320nm) and long (329-400nm) wave ultraviolet light. *Journal of investigative dermatology*, Baltimore, v. 63, p. 273-278, 1974.

2 JUSTIFICATIVA

Este estudo é de grande relevância por permitir uma primeira caracterização do papel dos estrógenos nas lesões de pele mediadas por estresse oxidativo induzido por radiação UVB crônica. Muitos estudos têm descrito o papel antioxidante do estrogênio em vários tecidos, entretanto, não há descrição na literatura sobre um modelo de redução de estrógenos e a sua relação com o estresse oxidativo na pele. Através desse estudo espera-se contribuir para a compreensão do papel do estrogênio na pele frente as lesões oxidativas, assim como para o desenvolvimento de futuras abordagens terapêuticas e preventivas contra as espécies reativas de oxigênio induzidas por radiação UVB, quando há redução acentuada do estrogênio.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a resposta da pele às lesões oxidativas induzidas pela irradiação UVB crônica em modelo experimental com níveis de estrógeno reduzido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a influência dos estrógenos no estresse oxidativo na pele de ratas ooforectomizadas;
2. Verificar a ação da radiação UVB crônica na pele de ratas ooforectomizadas;

ARTIGO

The article will be submitted to Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.

Role of Estrogens in the Skin Lesions Mediated by Oxidative Stress Induced by Chronic UVB

N.S. Ribeiro¹, V.A. Terra, T. N. X. da Silva, A. N. C. Simão, R. Cecchini, A. L. Cecchini*

Conflict of Interest

The authors state no conflict of interest.

Bullets and statements

> The estrogens reduction increased the lipid peroxidation of the skin. > The α -tocopherol confirmed the involvement of ROS in cell injury. > The reduced levels of estrogen interfere in catalase activity in the skin of animals subjected to chronic UVB irradiation. > The Estrogens protect the skin in the initial process of membrane lipid peroxidation against ROS produced by chronic UVB radiation.

ABSTRACT

The deprivation or significant reduction of female hormones is associated with increased oxidative stress and metabolic disorders among women. Imbalance in the redox profile similar to those observed in women during the decline ovarian hormonal activity can be obtained in an animal model through rat bilateral oophorectomy. The UVB radiation promotes skin injury mediated by reactive oxygen species (EROs) leading to photooxidative damage. The aim of this study is to assess the response of skin to oxidative damage induced by chronic UVB irradiation in an experimental model with low estrogen levels. The results showed an increase of lipid peroxidation (CL) in oophorectomized animals (O) when compared with controls (S).

¹ Laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, PR-445, km 380, Campus Universitário, 86051-990 Londrina, PR, Brasil

* **Corresponding author**

A. L. Cecchini

Departamento de Patologia Geral

Laboratório de Patologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina

Universidade Estadual de Londrina, 86051-990 Londrina, Brazil

Phone (+55-43) 3371-4521

Fax (+55-43) 3371-4267

E-mail: alcecchini@uel.br

There was a significant increase of lipid peroxide formation in oophorectomized group submitted to UVB radiation (OUV) when compared with O, as in control group submitted to UVB (SUV) when compared with S and SUV treated with α -tocopherol. To confirm the involvement of ROS, the oophorectomized animals and submitted to UVB radiation were treated with α -tocopherol (OUV α T) and lipid hydroperoxide levels returned to basal values. MDA levels were increased in groups OUV and OUV α T when compared with O as in SUV and SUV α T when compared with S, not showing the involvement of estrogens in late lipid peroxidation. The catalase activity showed a strong tendency of increase in OUV group when compared O group and, in SUV group when compared with S did not present the same behavior, suggesting that reduced levels of estrogen interfere in catalase activity in the skin of animals subjected to chronic UVB irradiation. The total radical antioxidant capacity (TRAP) remained unchanged, revealing that no changes occur in the low molecular antioxidants defenses even in reduction of estrogens. Through QL, a technique sensitive enough to indicate oxidative stress it was shown that estrogens play a role in protecting the skin in the initial process of membrane lipid peroxidation. This study provides the first approach to the reduction of estrogen by the ovaries removed (oophorectomy) of rats in relation to oxidative stress in the skin induced by UVB irradiation.

Keywords: Oxidative stress. Skin. UVB irradiation. Estrogens.

1. Introduction

The skin is an organ exposed to several aggressions, many of which induce the formation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (NRs) species. These species are essential in many biochemical and physiological processes, providing cellular homeostasis and survival. When there are pronounced changes in this balance, towards an increase of its production pro-oxidant state is produced, it leads to the oxidative stress [1]. The biological membranes, are oxidated and suffer changes in organizational structure, functional, enzymatic and permeability of cell membranes [2, 3].

However the skin has rapid response mechanisms such as low molecular weight antioxidants to counteract the deleterious effects caused by oxidative species that maintain the redox balance within cells [1, 4]. Endogenous antioxidants play a crucial role in the maintenance of cellular function [5]. The most efficient enzymatic antioxidants involve glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) [6]. The non-enzymatic antioxidants include vitamin E (α -Tocopherol) and C, thiol antioxidants (glutathione and lipoic acid), melanin, carotenoids, flavonoids and other natural compounds [7]. There are countless studies reporting that the α -tocopherol may attenuate oxidative stress, mainly to protect membranes against lipid peroxidation. It has been shown that α -tocopherol reacts with the peroxy radical ($RO_2\bullet$) and the superoxide

anion($O_2^{\bullet-}$), protecting the body from oxidation of the essential constituents of tissues and preventing the formation of toxic products of oxidation [8, 9, 10, 11, 12].

There are many reports on the oxidative effects due to UV radiation. It has been suggested that the reaction of reactive species formed by UV light with cellular components can result in lipid peroxidation, protein oxidation and DNA alterations [13, 14]. Sun exposure is responsible for the decrease of skin antioxidant systems as well as by increased oxidative stress by different mechanisms, thereby altering the cellular redox balance and thus skin homeostasis [15, 16]. In a study to evaluate the impact of chronic UVB exposure on ROS production and oxidative damage to macromolecules such as lipid and DNA as found that the levels of H_2O_2 and MDA were substantially increased in the mouse skin chronically exposed [17].

The influence of estrogens on several body systems and especially reproductive tissues, nervous and cardiovascular systems, and skeleton has been documented; however, a less explored area is the effect of estrogens on skin [18]. The estrogens have been shown to accelerate cutaneous wound healing [19], while a significant number of women notice an improvement in inflammatory skin disorders such as psoriasis during pregnancy [20, 21, 22]. Estrogens also offer some degree of protection against skin photoaging [23, 24, 25]. The postmenopausal years represent a state of estrogen deprivation, resulting in deleterious effects on several organ systems. The effects of estrogen deprivation on skin may include wrinkling, dryness, atrophy, laxity, poor wound healing, hot flashes, and vulvar atrophy [26].

Deprivation of female hormones is associated with increased oxidative stress and metabolic changes in women, promoting an increase in body weight, uterine atrophy, decreased plasma triglycerides and increased cholesterol levels, as well as a reduction of uric acid. It is also responsible for increasing blood peroxidase activity (catalase and glutathione peroxidase) and decreased non-enzymatic antioxidant defenses in plasma, accompanied by increased production of protein carbonyl [27]. Many authors have proposed that estrogens are important modulators of brain protective functions, [28] playing an important role against oxidative damage [29]. Several studies have been conducted to contribute and improve the approach to the various effects and systemic abnormalities in the reduction of estrogen, but, there are no studies in the literature to identify the same function of estrogen in the skin and the relation on oxidative stress.

This is the first study to evaluate the reduction of estrogen on oxidative stress in the skin of oophorectomized rats, and the injury caused by chronic UVB exposure on skin of rats with reduced estrogens.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

All chemicals were obtained from the Merck or Sigma laboratories.

2.2 Animals

Female Wistar rats, 10 weeks old and weighing 95-115g ($n=8$ /group) were obtained from the Animal House of the Biological Sciences Center at Londrina State University and had access to water and food *ad libitum*. They were treated in accordance with the National Institute of Health guidelines for the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Londrina State University (process – 07558).

2.3 Surgical procedure

The rats were bilaterally oophorectomized under ketamine hydrochloride (100mg/Kg i.m.) and xilazine (5mg/kg i.m.). Groups which included bilateral incisions, but without gonad removal was named Sham groups.

2.4 Treatments

All animals were allowed to recover for 7 days before treatment started and the treatments began 1 week after surgery according Aguiar *et al.*[29] and lasted for 3 weeks. The group of animals used for the experiments were oophorectomized (O), oophorectomized submitted to chronic UVB irradiation (OUV) and oophorectomized treated with α -tocopherol and submitted to chronic UVB irradiation (OUV α T). The Sham groups were sham (S), sham submitted to chronic UVB irradiation (SUV) and sham treated with α -tocopherol and submitted to chronic UVB irradiation (SUV α T).

The groups OUV α T, and SUV α T were treated with α -tocopherol (α -T; 100mg/kg, 3 days/week, intraperitoneally), dose according to Guarnier *et al.* [30]. The animals were tricotomized before irradiation and were irradiated three times a week, receiving a dose of 54 mJ/cm² in 1st and 2nd session, 72 mJ/cm² in 3rd session, 108 mJ/cm² in 4th session, 144mJ/cm² in 5th and 6th session, 162 mJ/cm², 180 mJ/cm² and 198 mJ/cm² in 7th, 8th and 9th sessions respectively, according the method described by Inomata *et al* [31], whose cumulative dose was 1.314mJ/cm².

The irradiation chamber was adjusted with a PHILIPS TL/12 40W UVB fluorescent lamp, which emits irradiation from 270 to 400 nm with maximum peak around 313 nm. UVB output was measured using a Research Radiometer model IL-1700 (International Light, USA; calibrated by IL service staff) with a radiometer sensor for UV (SED005) and UVB (SED240), which detected that UVB was 73% of the total UV irradiation in the present experimental conditions. The UVB irradiation rate was 0.47×10^{-4} mW/cm².

The lamp was embedded in a 1.30 m x 0.43 m x 0.45 m box, in which the caged rats were placed, 35 cm beneath the lamp. The groups UV α T received the α -tocopherol and then underwent irradiation session. the blood of animals were collected for the measurements of 17- β estradiol levels and the dorsal skin samples were removed 24 h after the last treatment according to the method described by Peres *et al.*[32], and the skin was stored in a freezer at - 86° for later analysis.

2.5. Blood samples

The blood was collected and the serum was analyzed for dose of 17- β estradiol. The dosages of Estradiol were determined by chemiluminescent microparticle immunoassay (ARCHITECT®, ABBOTT Park, IL, USA).

2.6 Tissue preparation

Skins were placed on ice and homogenized four times for 45-s periods at 15-s intervals in an Ultraturrax homogenizer containing 100 mg/ml or 50 mg/ml of tissue in 30 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer and 120 mM KCl at pH 7.4. The supernatant from total homogenate was obtained by centrifugation at 11.000 x g for 20 min at 4°C. The 100 mg/mL supernatant was used for *tert*-butyl hydroperoxide-stimulated chemiluminescence, catalase activity and total radical antioxidant parameter (TRAP) assays, while the 50 mg/mL supernatant was used for the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay.

2.7 Evaluation of oxidative stress and antioxidants

The destabilization of cell membrane lipids formed peroxides that were measured by a very sensitive chemiluminescence (CL) method, which was initiated by the addition of tert-butyl hydroperoxide to the tissue homogenate in a Turner Designs luminometer, model TD-20/20, with a response range of 300–650 nm [33]. The CL generates curves that demonstrate the quantity of membrane peroxides formed as it shifts towards the y axis. The results were expressed in relative light units/g tissue (RLU/g tissue).

The final lipoperoxidation products were analyzed by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), as described by Oliveira and Cecchini [34]. Briefly, low molecular weight aldehydes, such as malondialdehyde (MDA), react with thiobarbituric acid (TBA) to generate a colored product that absorbs light at 532 nm. MDA levels were measured, and the results expressed in nanomoles per gram of protein (η M TBARS/mg protein).

2.8 Evaluation of antioxidants defenses

Catalase (CAT) activity was assayed spectrophotometrically, as previous described [35]. Briefly, CAT present in the skin homogenate was determined using a standard H_2O_2 system. Catalase results were expressed as ABS per minute per milligram per protein.

The total radical antioxidant capacity (TRAP) was also detected by CL. Initially, light emission in a reaction medium containing 2-azobis-(2-amidinopropane) and luminol, an alkoxy generating system, was measured. Another curve was measured with the addition of a standard antioxidant, Trolox, a hydrosoluble vitamin E, which hinders the curve peak due to its antioxidant property. Then, the tissue supernatant was added and the time of total quenching was compared with trolox quenching, and the results expressed as μ M Trolox [36].

2.9 Total protein concentration

Total protein concentrations were measured by the method of Lowry et al. [37], modified by Miller [38]. Bovine serum albumin (BSA) was used as standard for both methods. The concentration of protein was used as a correction factor.

3 Statistical analysis

Reported values are presented as mean \pm SEM. All differences between groups were analyzed by the Student t test, except for the CL curves, which were qualitatively analyzed by Two-way ANOVA and quantitatively analyzed by the *Bonferroni* post hoc test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4.0 and 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). Significance level was set as $p < 0.05$.

3 Results

Table 1 shows the serum concentration of estradiol in oophorectomized (O) and sham (S) groups. The estradiol levels (Table 1) decreased significantly in O group (15.00 ± 1.50 pg/mL; $p = 0.042$) compared with control (S) (10.6 ± 0.92 pg/mL).

Figure 1 shows the formation of lipid hydroperoxide of cell membrane of all groups studied and it's possible to observe the curve qualitative behavior towards lipid hydroperoxide formation and antioxidant presence.

Lipid peroxide (LOO^\bullet) formation in rat skin following UVB irradiation and treated or not with α -Tocopherol was evaluated (Fig. 1). The entire curve was employed to perform statistical comparison by Two-way ANOVA ($p < 0.0001$) followed by the *Bonferroni post-hoc* test and the comparison between S (9898 RLU/mg protein ± 416) and O (11140 RLU/mg protein ± 430.4) (Fig. 1A) presented 5 points significantly different while O (11140 RLU/mg protein ± 430.4) and OUV (14580 RLU/mg protein ± 1926) curves showed 22 points (Fig. 1B), S (9898 RLU/mg protein ± 416) and SUV (10840 RLU/mg protein ± 1116) presented 15 points (Fig. 1C) and, S (9898 RLU/mg protein ± 416) and SUV α T (8112 RLU/mg protein ± 685.9) presented 40 points (Fig. 1C). This means that the curves present different behavior of lipid hydroperoxide and antioxidant formation.

Late lipid peroxidation in cell membranes of skin was determined by the formation of TBARS (Fig. 2) in the reaction mixture and was significantly different with increased levels of TBARS in groups OUV (4.662 ± 0.7451 η M TBARS/mg protein; $p = 0.009$) when compared with O (2.247 ± 0.3144 η M TBARS/mg protein); OUV α T (6.328 ± 1.066 η M TBARS/mg protein; $p = 0.002$) compared with O (2.247 ± 0.3144 η M TBARS/mg protein); SUV (4.942 ± 0.690 η M TBARS/mg protein; $p = 0.002$) compared with S (2.38 ± 0.118 η M TBARS/mg protein) and SUV α T (5.174 ± 0.591 η M TBARS/mg protein; $p = 0.0004$) compared with S (2.38 ± 0.118 η M TBARS/mg protein).

Catalase activity, an enzymatic parameter, was not increased significantly in any group. The group OUV (0.244 ± 0.031 Abs/minutes/mg protein; $p = 0.056$) when compared with O (0.164 ± 0.023 Abs/minutes/mg protein) showed a strong tendency towards significance.

The total radical antioxidant capacity (TRAP) was measured and was not significant difference between any group (Fig.4).

4 Discussion

The decrease of female hormones has been reported to be associated with increased oxidative stress and metabolic disorders among women worldwide. Disarrangements in the redox state similar to those observed in women during the decline of ovarian hormonal activity can be obtained experimentally through rat bilateral oophorectomy[27].

UVB light may promote damage DNA [39] and the damage mediated by ROS is an important mechanism leading to photooxidative injury in skin cells [32, 40]. The lipid peroxidation is the most frequent event resulting from free radical attack of biological structures. This process occurs mainly in the cell membrane and is an event in cell degeneration [32]. In this study the animals were submitted to oophorectomy that led to estrogens reduction. The estradiol levels decreased significantly in oophorectomized groups (O) when compared with controls (S). This result showed the model efficacy.

Chemiluminescence (CL) is a very sensitive assay (CL) that was used in this study to analyze the levels of lipid peroxides in skin of rat oophorectomized on UVB chronic irradiation [32, 33, 34, 41, 42]. The increase in CL is closely related to the formation of lipoperoxides during early stages of cell damage, resulting in increased photon emission [30, 32, 33, 42, 43, 44, 45]. The cumulative oxidative damage or the later membrane oxidation was evaluated by formation of low molecular weight aldehydes, such as MDA measured by TBARS [32].

Several studies have described the protector antioxidant role of estrogen in various tissues such as brain tissue, blood and liver. Da Rocha *et al.* [46] showed oxidative damage in liver of the animals oophorectomized. The authors found a decreased in ascorbic acid levels, an increased in glutathione content and in glutathione S-transferase activity. The catalase activity was reduced.

In brain tissue the estrogen has been described as a potent and direct antioxidant related to its capacity to break the chain, stopping lipid peroxidation propagation and also its accumulation [47]. Dilek *et al.* [48] reported that in the animals oophorectomized, the brain cortical, erythrocyte and plasma, presented higher levels of lipid peroxidates and the glutathione (GSH) levels was reduced in brain cortical and erythrocyte.

CL results showed increased lipid peroxidation for the oophorectomized groups (O) when compared with controls (S). This data suggest that the estrogen have a protective role against lipid peroxidation in early stages of cellular membrane destruction. In groups OUV compared with O, SUV compared with S there was a significant increased of lipid peroxide formation what indicated that chronic UVB irradiation increased the oxidative cells injury.

To confirm these results and the involvements of ROS, the animals was treated with α -Tocopherol and the lipoperoxides levels returned to basal values. The α -Tocopherol is an antioxidant described in the literature and known to protect cell membranes from oxidative damage and to be the primary lipid soluble, chain-breaking antioxidant in vivo that protects cell lipids from lipid peroxidation [49]. Besides, there was a dislocation of the CL curve to the right in the group OUV treated with α -Tocopherol (OUV α T) (Fig. 1B). This particular behavior was due the antioxidant present in rat skin that decreased the initial velocity reaction (V_0 -initial velocity). CL takes into account a kinetic analysis of the ascending part of the chemiluminescence curve under the assumption that variation in V_0 value depends on the level of preexisting lipid peroxide and the antioxidant in the tissue [50]. Considering the very fast overall rate constant of the lipoperoxidation propagation reaction of about $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [51], the α -Tocopherol treatment, through its insertion into the cell membrane probably increased this rate constant.

The TBARS levels were higher in groups OUV and OUV α T when compared with O and the same pattern was found in sham groups. These data reveal that concerning the formation of products of late lipid peroxidation there was no involvement of estrogens in skin protection. The TBARS results are in agreement to other studies using different experimental models involving acute [52, 53] and chronic [54, 55, 56] UVB exposure.

It is well established that catalase (CAT) has an activity in response to the degradation of hydrogen peroxide by the reaction: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, a process also known as catalytic action. The overall distribution of catalase protein seemed to almost correspond to that of H_2O_2 accumulation, indicating the role of normal skin catalase as a marker of

epidermal differentiation, as well as its role in redox damage[57]. Although the group OUV did not show significant difference when compared with control(O), we found a strong tendency ($p = 0.056$) towards the increase of catalase activity. Classically, estrogen may activate receptors that target estrogen receptor-responsive areas in the promoter regions of certain genes[29]. These receptors act as transcription factors and may, for example, enhance the expression and activity of antioxidant enzymes [58, 29]. In S group when compared with SUV it was not observed any difference between CAT activity. In other hand, when the comparison was made between O and OUV, a strong tendency towards CAT activity could be evidenced, suggesting that this enzyme could be used as an antioxidant against the oxidative stress in estrogen reduction under chronic UVB exposure.

TRAP evaluates the total radical antioxidant parameter of the tissue and reflects the balance between low molecular-weight antioxidants and reactive oxygen species [59]. Punnonen *et al.* [56] found no significant change in TRAP after chronic exposure epidermal. Another model of chronic UVB exposure in hairless mice, showed a significant decrease of TRAP both in chronological aging and photoaging of the skin [32]. Our results, in agreement with Punnonen *et al.*[56], did not show significance difference in any group in TRAP, revealing that the low molecular-weight antioxidants defenses were not used against oxygen reactive species in UVB chronic irradiation in the present model. There are other antioxidants that can be possible used for the skin protection in this model, for example, trans-urocanic acid and cis-urocanic acid, two epidermal compounds that have been described as major natural $\cdot\text{OH}$ scavengers [60].

Taken together, these results indicate that the oxidative stress is present in the skin of rats with estrogens reduction. In oophorectomized rats subjected to chronic UVB irradiation, it was evidenced that estrogens protect the skin against reactive oxygen species in early stages of cell injury and represents a novel target for developing potential therapeutic and preventive approaches on the skin against reactive oxygen species induced by UVB irradiation.

Acknowledgments

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. The authors are very grateful to P.S.R.D. Filho and J.A. Vargas, Department of Pathological Sciences – Universidade Estadual de Londrina, for excellent technical assistance.

References

- [1] S. Rasilainen, J.M. Nieminen, A.L. Levonen, *et al.*, Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide, *Biochem. Pharmacol.* 63(7)(2002) 1297-1304.
- [2] A.C.M. Filho, M.E. Hoffman, R. Meneghini, Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intra cellular iron. *The Biochem. J.* 218 (1984) 273-275.
- [3] R. Cecchini, O.I. Aruoma, B. Halliwell, The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes or from DNA damage by bleomycin or o-phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Rad. Res. Commun.* 10 (4-5) (1990) 245-258.
- [4] Y. Shindo, E. Wit, D. Han, Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin, *J. Invest. Dermatol.* 102 (1994) 122–124.
- [5] K. Rahman, Studies on Free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors. *Clinical Interventions in Aging.* 2 (2007) 219–236.
- [6] J.M. Mates, C. Perez-Gomez, I.N. de Castro, Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem.* 32(1999) 595–603.
- [7] M.R. McCall, B. Frei, Can Antioxidant Vitamins Materially Reduce Oxidative Damage in Humans? *Free Rad Biol Med.* 26(1999) 1034–1053.
- [8] F.R. Manzi, F.N. Bóscolo, S.M. Almeida, *et al.*, Estudo morfológico do efeito radioprotetor da vitamina E (DL α -Tocoferil) na reparação tecidual de ratos. *Radiol. Bras,* 36 (6) (2003) 367-371.
- [9] E. Niki, T. Saito, A. Kawakami, *et al.*, Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 4177–4182.
- [10] K. Fukuzawa, J.M. Gebicki, Oxidation of alpha-tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 226 (1) (1983) 242–251.
- [11] P.B. Mccay, Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Annu. Rev. Nutr.* 5 (1985)323–340.

- [12] K. Mukai, S. Kikuchi, S. Urano, Stopped-flow kinetic study of the regeneration reaction of tocopheroxyl radical by reduced ubiquinone-10 in solution. *Biochim. Biophys. Acta* 1035 (1990) 77–82.
- [13] S. Linton, M.J. Davies, R.T. Dean, Protein oxidation and ageing. *Experimental Gerontology*. 36 (9) (2001) 1503-1518.
- [14] D.R. Bickers, M. Athar, Oxidative stress in the pathogenesis of skin cancer and melanoma. *Dermatologic Surgery*. 28 (12) (2002) 1143.
- [15] B.A. Jurkiewicz, G.R. Buettner, EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human. *Photochem. Photobiol.* 64 (6) (1996) 918-922.
- [16] H. Yasui, H. Sakurai, Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 269 (1) (2000) 131-136.
- [17] H. Wei, X. Zhang, Y. Wang, *et al.* Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Letters*. 185 (1) (2002) 21-29.
- [18] S. Verdier-Sévrain, F. Bonté, B. Gilchrist, Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatology*. 15 (2006) 83–94.
- [19] G.S. Ashcroft, J.J. Ashworth, Potential role of estrogens in wound healing. *Am. J. Clin. Dermatol.* 4 (2003) 737–743.
- [20] S.F. Dunna, A.Y. Finlay, Psoriasis: improvement during and worsening after pregnancy. *Br J Dermatol.* 120 (2989) 584.
- [21] A.S. Boyd, L.F. Morris, C.M. Phillips *et al.* Psoriasis and pregnancy: hormone and immune system interaction. *Int J Dermatol.* 35 (1996) 169–172.
- [22] S.P. Raychaudhuri, T. Navare, J. Gross, S.K. [Raychaudhuri](#), Clinical course of psoriasis during pregnancy. *Int J Dermatol.* 42 (2003) 518–520.
- [23] M.A. Weinstock, Epidemiologic investigation of nonmelanoma skin cancer mortality: the Rhode Island Follow-Back Study. *J Invest Dermatol.* 102 (1994) 6S–9S.
- [24] K. Tsukahara, S. Moriwaki, A. Ohuchi, *et al.* Ovariectomy accelerates photoaging of rat skin. *Photochem Photobiol*, 73 (2001) 525–531.

- [25] K. Tsukahara, H. Nakagawa, S. Moriwaki, *et al.* Ovariectomy is sufficient to accelerate spontaneous skin ageing and to stimulate ultraviolet irradiation-induced photoageing of murine skin. *Br J Dermatol*, 151 (2004) 984–994.
- [26] G. Hall, T.J. Phillips, Estrogen and skin: The effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol*. 53 (2005) 555-568.
- [27] G.A. Behr, C.E. Schnorr, J.C. Moreira, Increased blood oxidative stress in experimental menopause rat model: the effects of vitamin A low-dose supplementation upon antioxidant status in bilateral ovariectomized rats. *Fundam Clin Pharmacol*. (2011) in press.
- [28] V.H. Ozacmak, H. Sayan, The Effects of 17β Estradiol, 17α Estradiol and Progesterone on Oxidative Stress Biomarkers in Ovariectomized Female Rat Brain Subjected to Global Cerebral Ischemia. *Physiol. Res*. 58 (2009) 909-912.
- [29] R.B. Aguiar, O.E. Dickel, R.W. Cunha, *et al.*, Estradiol valerate and tibolone: effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats. *Biogerontology*. 9 (2008) 285–298.
- [30] F.A. Guarnier, A.L. Cecchini, A.A. Suzukawa, *et al.*, Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with walker 256 solid tumor. *Muscle Nerve*. 42 (2010) 950-958.
- [31] S. Inomata, Y. Matsunaga, S. Amano, *et al.*, Possible Involvement of Gelatinases in Basement Membrane Damage and Wrinkle Formation in Chronically Ultraviolet B-exposed Hairless Mouse. *J Invest Dermatol*. 120 (1) (2003) 128-134.
- [32] P.S. Peres, V.A. Terra, F.A. Guarnier, *et al.*, Photoaging and chronological aging profile: understanding oxidation of the skin. *Photochemistry and photobiology: Biology* (2011) in press.
- [33] B. Gonzalez-Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle, *Free Radical Biol. Med*. 10 (1991) 93–100.
- [34] F.J.A. Oliveira, R. Cecchini, Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*, *J. Parasitol*. 86 (5) (2000) 1067–1072.

- [35] S.A. Marklund, G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 469–474.
- [36] E. Lissi, C. Pascual, M. Del Castillo, Luminol luminescence induced by 2,20- azobis(2-amidinopropane) thermolysis, *Free Radical Res. Commun.* 17 (1992) 299–311.
- [37] O.H. Lowry, N.S. Rosenbrough, A.L. Farr, *et al.*, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1) (1951) 265–275.
- [38] G.L. Miller, Protein determination for large number of samples, *Anal. Chem.* 31 (5) (1959) 964.
- [39] F. Parhami, Possible role of oxidized lipids in osteoporosis: could hyperlipidemia be a risk factor?, *Prostag Leukotr. Essent. Fatty Acids* 68 (2003) 373–378.
- [40] S.C. Lee, J.W. Lee, J.E. Jung, *et al.*, Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid peroxidation in ultraviolet B-irradiated skin, *Br. J. Dermatol.* 142 (2000) 653-659.
- [41] D.S. Barbosa, R. Cecchini, M.Z. El Kadri, *et al.*, Decrease oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids, *Nutrition* 19 (2003) 837–841.
- [42] K. Zimiani, F.A. Guarnier, H.C. Miranda, *et al.*, Nitric oxide mediated oxidativestress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence, *Nitric Oxide* 13 (2005) 196–203.
- [43] A.N.C. Simão, A.A. Suzukawa, M. F. Casado, *et al.*, Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane), *Life Sci.* 78 (2005) 1202-1210.
- [44] A. Zamburlini, M. Maiorino, P. Barbera, *et al.*, Measurement of lipid hydroperoxides in plasma lipoproteins by a new highly-sensitive photon counting luminometer, *Bioch. Biophys. Acta.* 1256 (2) (1995) 233-240.
- [45] A. Zamburlini, M. Maiorino, P. Barbera, *et al.*, Direct measurement by single photon counting of lipid hydroperoxides in human plasma and lipoproteins, *Anal. Biochem.* 232 (1) (1995) 107-113.

- [46] J.T. da Rocha, S. Pinton, A. Mazzanti, *et al.*, Effects of diphenyl diselenide on lipid profile and hepatic oxidative stress parameters in ovariectomized female rats. *J Pharm Pharmacol.* 63(5)(2011) 663-9.
- [47] I.R. Siqueira, C. Fochesatto, A. de Andrade, *et al.*, Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 23 (2005a) 663–671.
- [48] M. Dilek, M. Naziroğlu, O. H. Baha, *et al.*, Melatonin modulates hippocampus NMDA receptors, blood and brain oxidative stress levels in ovariectomized rats. *J Membr Biol.* 233 (1-3) (2010) 135-42.
- [49] B.C. Schock, A.V. Vliet, A.M. Corbacho *et al.* Enhance inflammatory responses in a – Tocopherol transfer protein null mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 423 (2004) 162 – 169.
- [50] K. Zimiani, F.A. Guarnier, H.C. Miranda, *et al.*, Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence, *Nitric Oxide* 13 (2005) 196–203.
- [51] J. Fossey, D. Lefort, J. Sorba, *Free Radicals in Organic Chemistry.* Wiley, New York (1995).
- [52] M.K. Ozkur, M.S. Bozkurt, B. Balabanli, *et al.*, The effects of EGb 761 on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in sunburn, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 18 (3) (2002) 117–120.
- [53] J.H. Huang, C.C. Huang, J.Y. Fang, *et al.*, Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes, *Toxicol. In Vitro* 24 (1) (2009) 21–28.
- [54] N.R. Prasad, K. Jeyanthimala, S. Ramachandran, Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes, *J. Photochem. Photobiol. B* 95 (3) (2009) 196–203.
- [55] M.A. Zaid, F. Afaq, D.N. Syed, *et al.*, Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx, *Photochem. Photobiol.* 83 (4) (2007) 882–888.

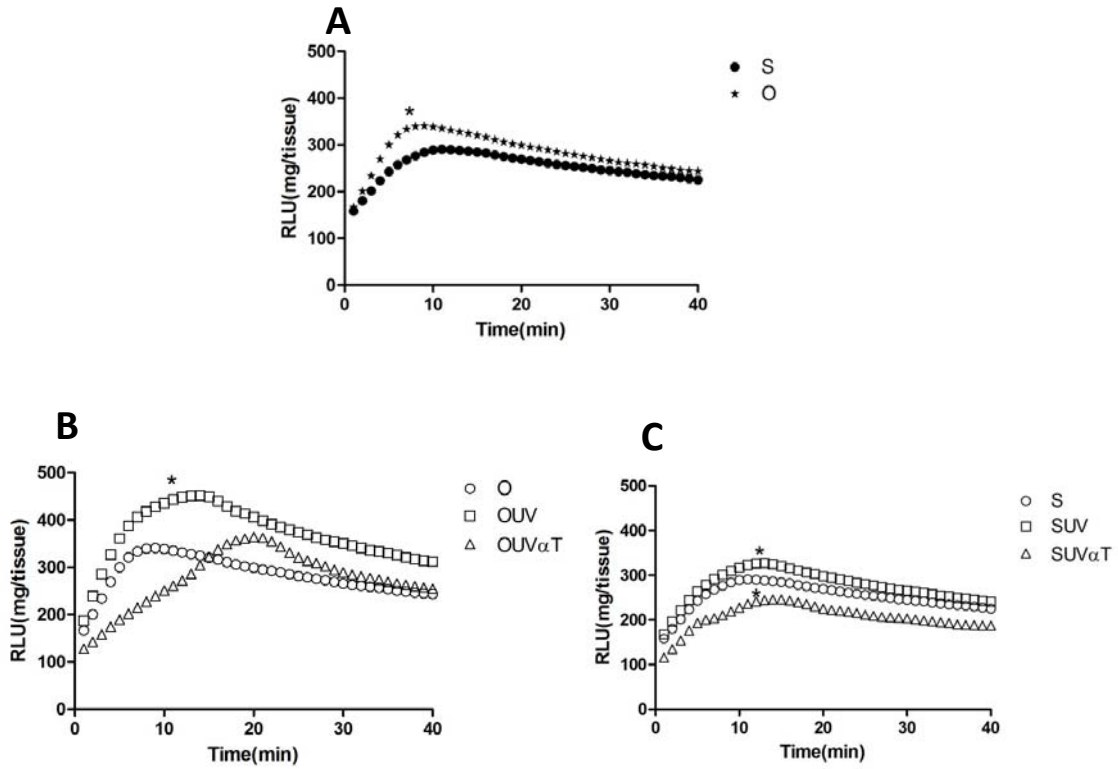
- [56] K. Punnonen, K. Lehtola, P. Autio, *et al.*, Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B* 30 (1995) 43–48.
- [57] S. Muramatsu, Y. Suga, Y. Mizuno, T. Hasegawa, *et al.*, Differentiation-specific localization of catalase and hydrogen peroxide, and their alterations in rat skin exposed to ultraviolet B rays, *J. Dermatol. Sci.* 37 (2005) 151–158.
- [58] K. Strehlow, S. Rotter, S. Wassmann, *et al.* Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res.* 93 (2) (2003) 170–177.
- [59] A. Ghiselli, M. Serafini, F. Natella, Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data, *Free Rad. Biol. Med.* 29 (11) (2000) 1106–1114.
- [60] A. Kammeyer, T.A. Eggelte, J.D. Bos, *et al.*, Urocanic acid isomers are good hydroxyl radical scavengers: a comparative study with structural analogues and with uric acid, *Biochim. Biophys. Acta.* 1428 (1999) 117–120.

Table 1 – Evaluation of 17- β Estradiol Levels in Oophorectomized and Control Groups.

GROUPS	17 – β ESTRADIOL (pg/mL)
SHAM	15.00 \pm 1.50
OOPHORECTOMY	10.60 \pm 0.92*

Values expressed as mean \pm SEM. * p < 0.05 compared with the control group.

Figure 1 - Evaluation of oxidative stress and antioxidant measured by chemiluminescence stimulated by *tert*-butyl hydroperoxide. Represent lipid peroxidation levels in skin of animals not irradiated and irradiated and/or treated with α -tocopherol expressed in relative light unit/mg protein (RLU/mg protein). Curves represent the means of 8 animals. The entire curves were employed to perform statistical comparison by Two-way ANOVA ($p < 0.0001$) followed by the Bonferroni *post hoc* test and were significant for groups S and O, O and OUV, S and SUV, S and SUV α T.



Statistical Analysis	S x O	O x OUV	S x SUV	S x SUV α T
Two-way ANOVA	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
Bonferroni's Test	P<0.001	P<0.0001	P<0.001	P<0.0001
	Points 5-9	Points 9-30	Points 9-23	Points 1-40

Figure 2 - Thiobarbituric acid reactivestances levels in skin homogenates of female oophorectomized rats, treated or not with α -Tocopherol and submitted or not to UVB chronic radiation. Results are expressed as mean \pm SEM (n=8) and analyze were performed at the same significance level ($p < 0.05$) and were significant for groups S and SUV, S and SUV α T, O and OUV, O and OUV α T.

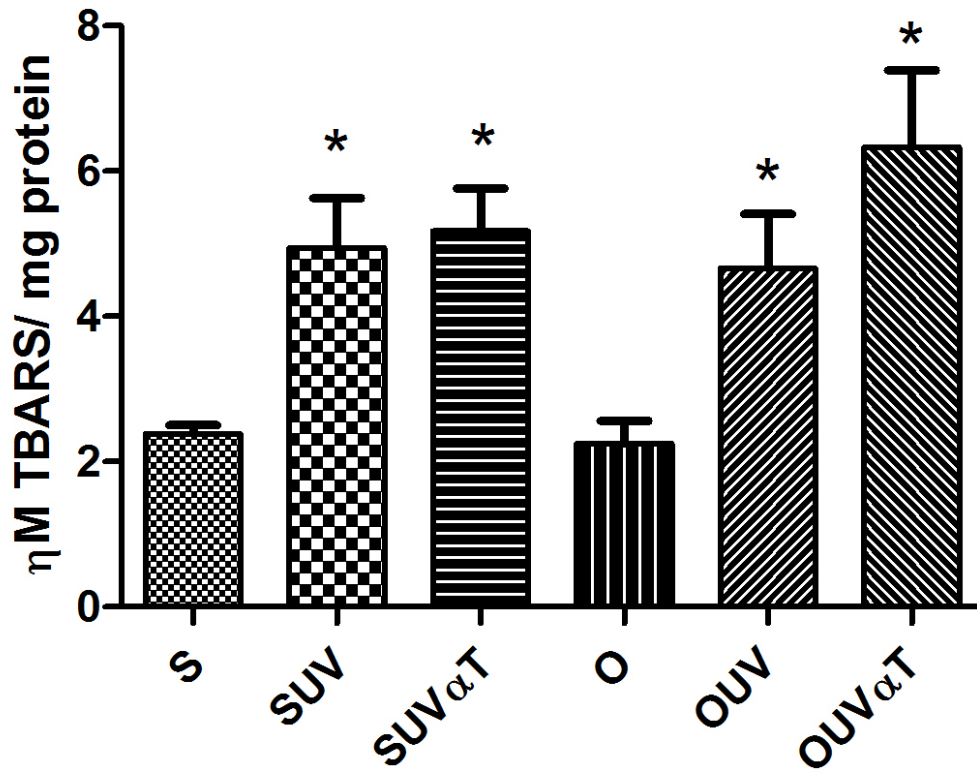


Figure 3 - Catalase activity in experimental and control groups. Results are expressed as mean \pm SEM (n=8). There was an increased in CAT activity in OUV group when compared with O group (# p = 0.056) although was not significant.

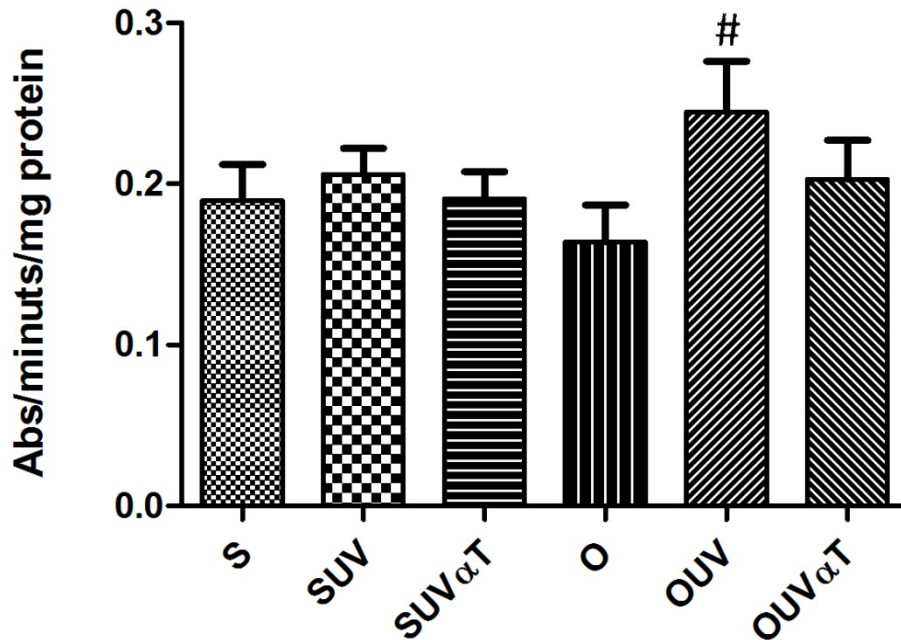
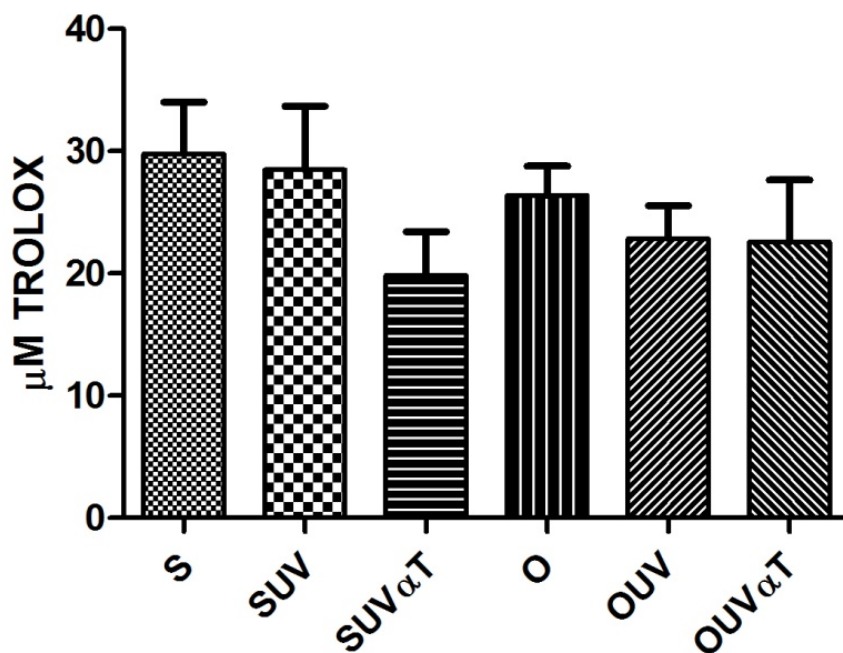


Figure 4 - Effect of UVB chronic radiation on total radical antioxidant capacity (TRAP) in supernatant of rat skin oophorectomized and controls treated and not with antioxidant. Results are expressed in μ M trolox and are presented as mean \pm SEM of 8 animals. Analysis was performed at the same significance level ($p < 0.05$) and was not significance for any group.



ANEXOS

ANEXO A

<http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws.home/504092/authorinstructions> -
Guide Photochemistry and Photobiology B: Biology for authors.