



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

VÂNIA APARECIDA TERRA MALACHIAS

**ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELA IRRADIAÇÃO
AGUDA POR UVB NA PELE DE CAMUNDONGOS SWISS**

Londrina
2008

VÂNIA APARECIDA TERRA MALACHIAS

**ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELA IRRADIAÇÃO
AGUDA POR UVB NA PELE DE CAMUNDONGOS SWISS**

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

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini
Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Londrina
2008

VÂNIA APARECIDA TERRA MALACHIAS

**ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELA IRRADIAÇÃO
AGUDA POR UVB NA PELE DE CAMUNDONGOS SWISS**

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. Dr. Décio Sabatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rubens Cecchini
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 06 de junho de 2008.

DEDICATÓRIA

À Deus, minha fortaleza, pela concretização deste trabalho e por todas as realizações, principalmente o nascimento da minha filha Nicole, durante este período abençoado; à minha querida filha Nathália, meu marido e companheiro, Ronaldo, que foram meus parceiros neste projeto e que são meus amores e a razão da minha vida.

Aos meus pais, Deonízia e Miguel, pelos bons exemplos e ensinamentos e ao meu querido irmão Paulo Henrique pela contribuição.

Ao meu sogro Airton e sogra Diva, que possibilitaram a realização deste trabalho, acolhendo os netos com muito amor, paciência e muita colaboração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rubens Cecchini e à Prof^a Dr^a Alessandra Lourenço Cecchini Armani, pela imprescindível orientação durante a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Rúbia Casagrande, pelas informações que contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório, de mestrado e amigos do transcorrer do curso, por terem participado, marcadamente, desta inesquecível etapa da minha vida: Aida Mehanna, Cristiane Akemi Iamamoto, Débora F. Vituri Rodrigues da Silva, Fábio Leandro Santos Fenner, Luiz Antônio Custódio, Jair Tonon, Josiane Mendes, Leila Regina Arias Rotunno, Marcelo Abba Macioszek, Patrícia da Silva Peres, Patrícia Sayuri Suzuki, Juliana Rubira, Rosália Hernandez Fernandes Vivan. Em especial Alissana Ester Iakmiu Camargo, Flávia Alessandra Guarnier, Francielle Caroline Rodrigues, Priscila Cassolla e Alexandre Yukio Saito por todo auxílio e colaboração.

Aos técnicos de laboratório de patologia, Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião Dionízio Filho, pela assistência técnica prestada e colaboração.

Ao corpo docente do Mestrado em Patologia Experimental, por ter contribuído para a minha formação científica: Prof^a Dr^a Alessandra Lourenço Cecchini Armani, Prof^a Dr^a Eiko Itano Nakagawa, Prof. Dr. Emerson José Venâncio, Prof^a Dr^a Halha Ostrensky Saridakis, Prof^a Dr^a Helenir Medri de Souza, Prof^a Dr^a Ionice Felipe, Prof^a Dr^a Ivete Conchon Costa, Prof^a Dr^a Maria Angélica Ehara Watanabe, Prof. Dr. Mario Augusto Ono, Prof.^a Dr.^a Marli Martins Pinge, Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, Prof. Dr. Rubens Cecchini, Prof^a Dr^a Tânia Longo Mazzuco.

MALACHIAS, Vania Aparecida Terra. **Estresse oxidativo induzido pela irradiação aguda por UVB na pele de camundongos Swiss**. 2008. 69f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

As radiações ultra-violetas (UV) são as principais responsáveis pela maioria das lesões cutâneas devido à excessiva exposição solar. O UVB é o agente físico mais descrito por induzir manifestações agudas e crônicas, como respostas inflamatórias, envelhecimento e doenças cutâneas malignas, através da formação de radicais livres. Existem mecanismos celulares que inibem o excesso de espécies reativas do oxigênio (EROs), como o sistema enzimático da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px) e não enzimático como as vitaminas E, C, β -caroteno, ácido urocânico, ácido lipóico, entre outros. A procura por substâncias que evitem os efeitos oxidativos na pele tem sido intensa. O objetivo desse estudo foi caracterizar o padrão oxidativo no modelo experimental de irradiação aguda por UVB, que possa contribuir com futuras pesquisas que utilizam este modelo na verificação das propriedades de fármacos. Para tanto, camundongos Swiss tricotomizados foram submetidos à dose aguda por UVB ($2,98\text{J}/\text{cm}^2$). As peles foram removidas após 6 e 24 horas da irradiação. De acordo com análise macroscópica das peles dos camundongos, o UVB provocou eritema e na histologia o aparecimento de *sunburn cells* (SBCs), indicando uma alta atividade sinalizadora de morte celular (apoptose) de queratinócitos. Foram medidos os níveis de hidroperóxidos lipídicos, de proteínas oxidadas e a capacidade antioxidante total (TRAP), a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT). Os resultados do grupo 6 horas mostraram diminuição significativa dos níveis de hidroperóxidos lipídicos avaliados por quimiluminescência (QL) estimulada por terc-butil hidroperóxido comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ($4,4 \pm 1,3$ nM MDA/mg proteína; controle $11,4 \pm 1,04$ nM MDA/mg proteína; $p < 0,01$) assim como foi menor os níveis de proteínas carbonílicas (PCs) ($8,15 \pm 0,53$ nM/mg proteína; controle: $9,07 \pm 0,52$ nM/mg proteína; $p < 0,05$). Houve aumento significativo do TRAP ($1,5 \pm 0,11$ μM Trolox; controle: $1,18 \pm 0,06$ μM Trolox; $p < 0,05$) e da atividade da SOD ($1,34 \pm 0,09$ USOD/mg proteína; controle: $0,95 \pm 0,06$ USOD/mg proteína; $p < 0,01$), indicando aumento das defesas antioxidantes de baixa massa molecular e enzimáticas. Isto mostra que as defesas antioxidantes foram estimuladas pela irradiação e eficientes contra a lipoperoxidação. O mesmo não ocorreu no grupo 24 horas, quando os resultados mostraram aumento nos níveis de hidroperóxidos lipídicos, comparados ao grupo controle ($p < 0,05$), quantificados por QL. TBARS apresentou queda significativa ($6,4 \pm 1,10$ nM MDA/mg proteína; controle: $11,4 \pm 1,04$ nM MDA/mg proteína; $p < 0,05$), assim como as proteínas carbonílicas ($7,74 \pm 0,31$ nM/mg proteína; controle: $9,07 \pm 0,52$ nM/mg proteína; $p < 0,01$). Níveis diminuídos também foram evidenciados para a TRAP ($0,86 \pm 0,04$ μM de Trolox; controle: $1,24 \pm 0,06$ μM Trolox; $p < 0,05$), para a atividade da CAT ($0,27 \pm 0,01$ abs/mg proteína; controle: $0,39 \pm 0,01$ abs/mg proteína; $p < 0,001$) e da SOD ($0,92 \pm 0,05$ USOD/mg proteína), quando comparada ao grupo 6 horas, ($1,34 \pm 0,09$ USOD/mg proteína; $p < 0,05$). Portanto, o estresse oxidativo foi observado após 24 horas da irradiação quando houve aumento da lipoperoxidação provavelmente pela formação de EROs, devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio consequência da dismutação do ânion superóxido pela SOD e o consumo das defesas antioxidantes. Sugere-se que o modelo experimental que utiliza dose aguda por UVB, seja adequado para testes com fármacos com propriedades antioxidantes, desde que seja levado em consideração o tempo de instalação do estresse oxidativo após 24 horas de irradiação, já que após 6 horas, os mecanismos antioxidantes cutâneo são eficientes.

Palavras-chaves: Pele. Estresse oxidativo. Eros. Antioxidantes. UVB. Irradiação aguda.

MALACHIAS, Vania Aparecida Terra. **Oxidative stress induced by UVB acute irradiation of the skin of Swiss mice.** 2008. 69p. Dissertation (Master's Degree Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2008.

f
ABSTRACT

The ultra-violet radiation (UV) is the main responsible for most of the skin lesions due to excessive sun exposure. UVB is described to induce acute and chronic manifestation, as inflammatory responses, ageing and malignant skin diseases, through the formation of free radicals. There are cellular mechanisms that inhibit reactive oxygen species (ROS), the antioxidants defenses, such as the enzyme system of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and non-enzymatic such as vitamins E, C and β - carotene, urocanic acid, lipoic acid and others. The search for substances that prevent the oxidative effects in the skin, has been extended. The aim of this study was to characterize the oxidative pattern in the experimental model of acute UVB irradiation, to contribute to future research that use this model to analyses drugs properties. Swiss shaved mice were submitted of acute dose of UVB (2.98 J/cm^2). The skin was removed after 6 and 24 hours of irradiation. According to macroscopic analysis of skin, UVB caused erythema and the appearance of sunburn cells (SBCs), indicating a high activity of cell death (apoptosis) of keratinocytes. We measured the levels of lipid hydroperoxides, oxidized proteins and total antioxidant capacity (TRAP), the SOD and CAT activity. The results of 6 hours group showed significant decrease in the levels of lipid hydroperoxides levels as evaluated by chemiluminescence (CL) stimulated by tert-butyl when compared to the control group, ($p < 0.05$), as well as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ($4.4 \pm \text{MDA } 1.3 \text{ nM / mg protein}$; control MDA $11.4 \pm 1.04 \text{ nM / mg protein}$, $p < 0.01$) and proteins carbonylation (PCs) ($8.15 \pm 0.53 \text{ nM / mg protein}$; control: $9.07 \pm 0.52 \text{ nM / mg protein}$, $p < 0.05$) lower levels. TRAP increased significantly ($1.5 \pm 0.16 \mu \text{ M Trolox}$; control: $1, 24 \pm 0.06 \mu \text{ M Trolox}$, $p < 0.05$), as well as SOD activity ($1.34 \pm 0.09 \text{ USOD / mg protein}$; control: $0.95 \pm 0.06 \text{ USOD / mg protein}$, $p < 0.01$), indicating elevation in antioxidant defenses stimulated by irradiation and an efficient protection against lipoperoxidation. In the 24 hours group, the results showed remarkable increasing in lipid hydroperoxides levels when compared to control group ($p < 0.05$). TBARS showed significant drop ($6.4 \pm 1.10 \text{ MDA nM / mg protein}$; control: $11.4 \pm 1.04 \text{ nM MDA / mg protein}$, $p < 0.05$) as well as PCs ($7.74 \pm 0.31 \text{ nM / mg protein}$; control: $9, 07 \pm 0.52 \text{ nM / mg protein}$, $p < 0.01$). Significant low levels of TRAP was observed ($0.95 \pm 0.07 \mu \text{ M Trolox}$; control: $1.24 \pm 0.06 \mu \text{ M Trolox}$, $p < 0,05$), to CAT activity ($0.27 \pm 0.01 \text{ abs / mg protein}$; control: $0.39 \pm 0.01 \text{ abs / mg protein}$, $p < 0,001$) and to SOD activity ($0.92 \pm 0.05 \text{ USOD/mg protein}$) when compared to 6 hours group, ($1.34 \pm 0.09 \text{ USOD / mg protein}$, $p < 0.05$). In conclusion, the oxidative stress was observed after 24 hours of irradiation. In this period we demonstrated increasing on lipid peroxidation probably due to ROS, for the accumulation of hydrogen peroxide as consequence of superoxide anion dismutation by SOD and consumption of antioxidants defenses. We suggested that experiments with acute dose of UVB are viable for tests with antioxidants drugs, considering the installation time of oxidative stress after 24 hours of irradiation. After 6 hours, the antioxidants mechanisms showed efficient.

Keywords: Skin. Oxidative stress. ROS. Antioxidants. UVB. Acute irradiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático das camadas da pele e seus componentes	14
Figura 2 – Penetração dos raios UVA e UVB nas camadas da pele	19
Figura 3 – Fontes de espécies reativas na pele e mecanismos de defesa	21
Figura 4 – Formação das principais espécies reativas na pele provocada pela radiação UV e sua inativação pelos sistemas antioxidantes da pele	26
Figura 5 – Caixa de irradiação.....	34
Figura 6 – Remoção da pele do dorso do camundongo após sacrifício.	36
Figura 7 – Gráfico representativo do TRAP, mostrando a emissão de fótons pelo nº de leituras	38
Figura 8 – Aspecto da pele do dorso do camundongo	41
Figura 9 – Fotomicrografia mostrando alterações histológicas após a irradiação da pele por UVB	42
Figura 10 – Avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência dos homogenatos de pele dos camundongos irradiados.....	43
Figura 11 – Quantificação dos níveis de TBARS na pele de camundongos irradiados.....	44
Figura 12 – Quantificação de PCs dos homogenatos de pele de camundongos irradiados.....	45
Figura 13 – Quantificação dos níveis de TRAP dos homogenatos de pele de camundongos irradiados	46
Figura 14 – Atividade da SOD nos sobrenadantes de pele de camundongos irradiados.....	47
Figura 15 – Atividade da CAT nos sobrenadantes de pele de camundongos irradiados.....	48
Figura 16 – Mecanismo de formação de lipoperóxidos de membrana e de aldeídos de baixa massa molecular como o MDA.....	51
Figura 17 – Principais alterações observadas na pele de camundongos após 6 horas da irradiação aguda por UVB.....	54
Figura 18 – Principais alterações observadas na pele de camundongos após 24 horas da irradiação aguda por UVB.....	56

LISTA DE SIGLAS

ABAP – 2,2-azo-bis(2-amidinopropano diidroclorido)
AP-1 – proteína ativadora 1
Bax – proteína pro-apoptótica
Bcl-2 – proteína oncogênica que inibe apoptose
BHT – butilato de hidroxitolueno
CAT – catalase
COX-II – ciclooxigenase II
DNPH – dinitrofenil hidrazina
DTNB – ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
EROs – espécies reativas de oxigênio
ERNs – espécies reativas de nitrogênio
GSH – glutatona reduzida
GSH-Px – glutatona peroxidase
GSH-Rd – glutatona redutase
GSSG – glutatona oxidada
GT – glutatona total
HCl – ácido clorídrico
HClO – ácido hipocloroso
H₂SO₄ – ácido sulfúrico
H₂O – água
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
I CAM-1 – molécula de adesão intercelular
IE – índice de estresse
IFN- γ – interferon gama
IL – interleucina
I κ B – subunidade do NF- κ B
iNOS – óxido nítrico sintase indutível
J – joule
KCl – cloreto de potássio
KH₂PO₄ – Merck
L[•] – radical de ácido graxo
LOO[•] – radical peroxil
LO[•] – radical alcóxil
LOOH – peróxido orgânico
MDA – dialdeído malônico

Mn-SOD – manganês superóxido dismutase
MPO – mieloperoxidase
mtDNA – ácido desoxi-ribonucléico mitocondrial
NaCl – cloreto de sódio
NAOH – hidróxido de sódio
NACO₃ – carbonato de sódio
NA₂HPO – monoidrogenofosfato de sódio
NK – Natural Killer
NF- κB – fator nuclear Kapa B
NMF – fator natural de hidratação
NO[•] – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
NTB – ácido 2-nitro-5-tiobenzóico
¹O₂ – oxigênio singlet
[•]O₂⁻ – ânion radical superóxido
[•]OH – radical hidroxil
ONOO⁻ – peroxinitrito
PCs – proteínas carbonílicas
PCA – ácido pirrolidino carboxílico
p21 – proteína reguladora do ciclo celular
p53 – gene supressor de tumor
QL – quimiluminescência
SOD – superóxido dismutase
SBCs – células queimadas do sol
TCA – ácido tri-cloro acético
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α – fator de necrose tumoral α
TRAP – capacidade antioxidante total
Ub – ubiquitina
URL – unidade relativa de luz
USOD – unidades de SOD
UV – ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 A PELE	12
1.1.1 Estrutura básica da pele	13
1.1.2 Epiderme	14
1.1.3 Derme.....	16
1.2 FATORES RESPONSÁVEIS PELO ESTRESSE OXIDATIVO NA PELE.....	17
1.3 BALANÇO REDOX NA PELE.....	21
1.4 FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS NA PELE PROVOCADA PELA RADIAÇÃO UV	24
1.5 EFEITOS OXIDATIVOS DA RADIAÇÃO UV NA PELE	27
1.6 MANIFESTAÇÕES AGUDAS E CRÔNICAS NA PELE APÓS RADIAÇÃO UV	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 REAGENTES	32
3.2 ANIMAIS	33
3.3 FONTE DE IRRADIAÇÃO UVB.....	33
3.4 RETIRADA DA PELE DOS ANIMAIS E PREPARO DO HOMOGENATO	35
3.5 QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR TERT-BUTIL HIDROPERÓXIDO	36
3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO	36
3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS CARBONÍLICAS	37
3.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL POR QUIMILUMINESCÊNCIA....	38
3.9 ATIVIDADE DA CATALASE	39
3.10 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	39
3.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	40
3.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA	40
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40

4 RESULTADOS	41
4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	41
4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	41
4.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA PELE.....	43
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	57
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Os raios ultravioleta do tipo A e B (UVA e UVB), são os principais responsáveis pela maioria das lesões cutâneas devido à excessiva exposição à radiação solar. As manifestações da exposição aguda incluem eritema e queimadura solar. 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).

A exposição dos seres humanos à radiação ultravioleta (UV) causa grande preocupação devido aos vários relatos sobre os efeitos nocivos causados pela exposição solar. Estudos epidemiológicos revelam que pessoas que trabalham sob exposição solar apresentam maior incidência de problemas de pele, desde a formação de rugas até o desenvolvimento de câncer (HARRIS, 2005).

Considerando que poucos tecidos no corpo estão sujeitos ao estresse oxidativo como a pele (KOHEN; GATI, 2000), muitos autores sugerem o efeito benéfico dos antioxidantes tópicos, que seriam uma opção para diminuir os danos neste órgão mediados pela radiação UVB (CASAGRANDE et al., 2006).

O modelo experimental de irradiação aguda por UVB é muito utilizado para evidenciar as propriedades antioxidantes de fármacos (WIDYARINI et al., 2001). Neste trabalho utilizamos este mesmo modelo, procurando avaliar os aspectos do balanço entre a formação de espécies reativas e as variações no sistema antioxidante endógeno enzimático e não enzimático. Foram caracterizados os padrões oxidativos relevantes do modelo, que poderão contribuir com futuras pesquisas que utilizam esse protocolo experimental.

1.1 A PELE

A pele é uma estrutura complexa, composto por vários tipos celulares e estruturas interdependentes, que funcionam como uma barreira, com o objetivo de proteger os órgãos internos dos agressores ambientais (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

A principal diferença entre a pele e demais sistemas epiteliais é o fato dela estar exposta a um ambiente externo extremamente agressivo, ao passo que a epiderme que reveste os órgãos internos está protegida, por exemplo, da radiação solar, poluição, agentes químicos, etc (HARRIS, 2005; 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 e agentes externos, absorção e secreção de líquidos, controle de temperatura, barreira à prova d'água, metabolismo de vitamina D, funções estéticas e sensoriais e proteção contra a radiação UV (HARRIS, 2005; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005;).

1.1.1 Estrutura básica da pele

A pele ou tegumento cutâneo reveste externamente o corpo, variando em espessura e cor nas diferentes regiões, assim como na presença de pêlos, glândulas e unhas, possuindo um padrão de estrutura básica. Além disso, a pele recebe um grande suprimento de rede de vasos provenientes dos músculos e tecido adiposo (HARRIS, 2005).

Resumidamente, a superfície externa da pele é formada por um epitélio pavimentoso estratificado, denominada epiderme. A epiderme é sustentada e nutrida por uma camada espessa de tecido conjuntivo denso, fibro-elástico, denominado derme, que é ricamente vascularizada e possui numerosos receptores sensoriais. A derme está ligada aos tecidos subjacentes por uma camada de tecido conjuntivo frouxo, hipoderme ou camada subcutânea e que contém quantidade variável de tecido adiposo. Os folículos pilosos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e unhas são anexos cutâneos em virtude de sua origem embrionária a partir de brotamentos que originando-se na epiderme, penetram na derme e hipoderme (Figura 1) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

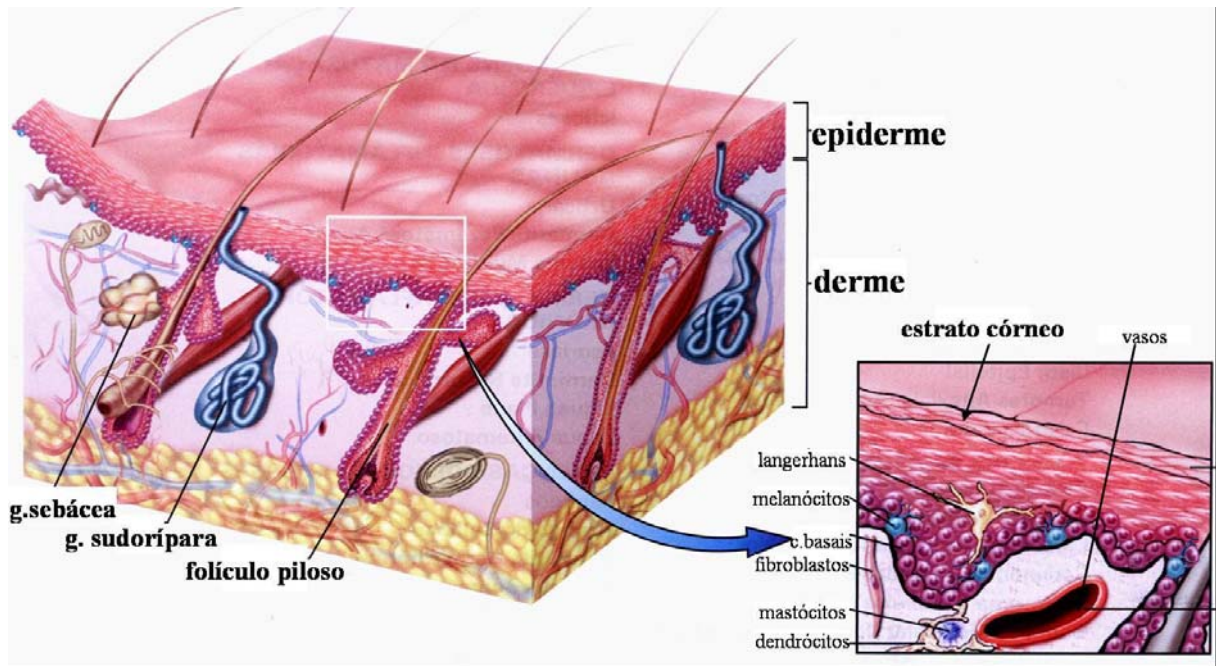


Figura 1 – Desenho esquemático das camadas da pele e de seus componentes.

Fonte: Kumar, Abbas e Fausto (2005).

1.1.2 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa, compactada, impermeável e não possui um sistema de irrigação sanguínea direta, sendo que os nutrientes são transportados por capilaridade (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A epiderme é constituída por quatro camadas distintas (estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal). A camada basal é constituída por células matrizes (stem cells) e células proliferativas, que são células germinativas, que darão origem aos queratinócitos e melanócitos (Figura 1) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os queratinócitos sofrem alterações conforme passam de uma camada a outra durante o processo de maturação até serem eliminados e na medida em que as camadas mais superficiais são eliminadas, as mais profundas (camada basal) são restauradas. O processo de renovação demanda um período de aproximadamente duas a três semanas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O principal componente da epiderme é o queratinócito, célula especializada que, além de produzir queratina, sofre um processo de estratificação ou queratinização, gerando os corneócitos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A parte superior da epiderme (estrato córneo) é o resultado final de um processo que consiste em uma matriz de queratina (células mortas), que formam uma barreira protetora efetiva. Estas células são constantemente perdidas e renovadas (Figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O estrato córneo é a barreira mais importante para a penetração de espécies químicas através da pele. Os corneócitos são envoltos por um envelope protéico, embebidos numa matriz lipídica. A camada lipídica é formada por ligações ésteres entre os resíduos glutamato e hidroxiceramidas. O principal componente do envelope protéico é uma proteína denominada involucrina (HARRIS, 2005).

Os corneócitos revestidos pela involucrina, na pele saudável, possuem altas concentrações (até 10% de seu peso seco) de fator natural de hidratação (NMF), composto por moléculas de baixo peso molecular, higroscópicas e que se ligam à água, prevenindo sua evaporação. São principalmente aminoácidos, como os ácidos pirrolidono-carboxílico (PCA), um potente umectante ou ácido urocânico, absorvente de raios UV. Também constituem o NMF o ácido láctico e a uréia (HARRIS, 2005).

O fator natural de hidratação é produzido pela degradação da profilagrina, proteína insolúvel produzida pelos queratinócitos do estrato espinhoso e do estrato granuloso. Durante a degradação da profilagrina ocorre a liberação dos aminoácidos histidina e glutamina formando o ácido pirrolidono-carboxílico (HARRIS, 2005).

Na epiderme, a enzima histidina desaminase é responsável pela síntese do ácido urocânico a partir do aminoácido histidina. A atividade desta enzima e os níveis de ácido urocânico se elevam após estímulo cutâneo com UV. É provável que o suor também tenha ação fotoprotetora, porque tem grande quantidade de ácido urocânico (BICKERS; ATHAR, 2006).

A epiderme possui ainda outros tipos celulares como os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel. É transpassada pelas estruturas dos anexos invaginados na derme, os folículos pilossebáceos e as glândulas sudoríparas (HARRIS, 2005; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os melanócitos (Figura 1) são células dendríticas que se originam a partir da crista dos neurônios, com a função de produzir melanina, um pigmento que pode variar do amarelo ao marrom ou preto, responsável pelas diferentes tonalidades da pele (SCOTT et al., 2001; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A melanina é um dos filtros solares mais perfeitos que existem, pois absorve radiações de 250 a 1200 nm, protegendo as células basais dos efeitos nocivos da radiação UV. Por isso, indivíduos com menor capacidade de produção de melanina são mais propensos à manifestação de câncer de pele. Em função da exposição à radiação UV, o organismo aumenta a atividade dos melanócitos, observando-se uma quantidade aumentada de melanina na pele e conseqüentemente, seu escurecimento (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

1.1.3 Derme

A derme, parte estrutural do tegumento do corpo, é formada por tecido conjuntivo, responsável, parcialmente, pela termorregulação, pelo suporte da rede vascular e pela defesa imunológica em associação com as células de Langerhans da epiderme (Figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Dentro da derme, além dos apêndices da epiderme (pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas), há também vasos sanguíneos, nervos e componentes celulares contendo células matrizes, fibroblastos, miofibroblastos; mastócitos e macrófagos, sustentados por uma rede fibrosa de tecido conectivo, contendo elastina, colágeno e proteoglicanas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Uma das proteínas extracelulares mais importantes do corpo humano é o colágeno, constituído por uma família de proteínas e são os componentes fibrilares principais dos tecidos conectivos. Na pele humana, as fibras de colágeno formam uma grande massa de matriz extracelular e representam 70% a 80% do peso da derme (HARRIS, 2005; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A síntese do colágeno depende da produção do protocógeno, um precursor insolúvel secretado pelos fibroblastos no meio intracelular. Várias etapas bioquímicas ocorrem para garantir a formação das fibras de colágeno, uma delas é a

hidroxilação dos resíduos de lisina e prolina, a qual apresenta-se dependente da presença de oxigênio, ferro e vitamina C (HARRIS, 2005).

As fibras elásticas são responsáveis pelas propriedades retráteis da pele. Apesar de fortemente associadas ao colágeno, em peles normais, são constituintes minoritários da derme (2% a 4%). São sintetizadas nos fibroblastos e compõem-se de microfibrilas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Formando o meio para os constituintes celulares e fibrosos da derme, a substância de cimentação (matriz extracelular) é um gel aquoso, constituído basicamente de fibronectina e glicosaminoglicanas, que são ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de dermatana, os quais são sintetizados pelos fibroblastos e possivelmente, pelas células musculares e mastócitos (HARRIS, 2005; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Além de fornecer meio para a acomodação de células e fibras, a matriz extracelular serve ainda para o transporte de água e eletrólitos e está intimamente relacionada à permeabilidade e osmolaridade intersticial dos fluidos (HARRIS, 2005).

1.2 FATORES RESPONSÁVEIS PELO ESTRESSE OXIDATIVO NA PELE

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

A pele está continuamente exposta a uma combinação de fatores, tais como agentes químicos, físicos e microbiológicos, muitos dos quais induzem a formação de EROs e ERNs (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; CASAGRANDE et al., 2006), ficando a pele sujeita ao estresse oxidativo por fontes endógenas e exógenas.

As principais fontes endógenas são as enzimas que podem, indiretamente, produzir EROs. A enzima xantina oxidase, a qual converte xantina a ácido úrico, também converte oxigênio a radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) durante este

processo e a enzima óxido nítrico sintase que pode produzir radicais do óxido nítrico (NO^\bullet) diretamente na pele (KOHEN; FANBERSTEIN; TIROSHI, 1997; KOHEN, 1999; KOHEN; GATI, 2000).

Outros processos de fonte endógena de EROs são a ativação das células do sangue durante o processo inflamatório, como os neutrófilos e durante a isquemia-reperfusão, cuja formação de alta produção de EROs resulta em danos oxidativos (KOHEN; FANBERSTEIN; TIROSHI, 1997; KOHEN, 1999; KOHEN; GATI, 2000).

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; TIROSHI, 1997; KOHEN; GATI, 2000).

Ademais, as agressões externas incluem agentes químicos (ex. cremes, loções, desodorantes e cosméticos de modo geral), águas contaminadas (ex. cloro, metais dissolvidos), e agentes excretados no suor, como os metais de transição (ferro, cobre), capazes de catalisar reações com radicais livres e de estimular o crescimento bacteriano (GUTTERIDGE et al., 1985; ATHAR, 2002).

A radiação UV é o agente físico mais descrito responsável pela maioria das lesões cutâneas devido a excessiva exposição a radiação solar e conseqüente formação de radicais livres. As manifestações da exposição aguda incluem eritema e queimadura solar. A exposição crônica é considerada um dos agentes mais importantes para o desenvolvimento de doenças cutâneas malignas e o envelhecimento (ARMSTRONG; KRICKER, 2001; MORÊTE; RODRIGUES; PINTO, 2002; BICKERS; ATHAR 2006).

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 inflamações até graves queimaduras (KVAM; DAHLE, 2003; HARRIS, 2005).

Os raios solares contêm a radiação ultravioleta A, B e C. Os raios UVC incidem 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 (Figura 2) (SCOTT et al., 2007).

Ao observarmos os efeitos do UV solar, temos que considerar não apenas a resposta cutânea dentro de cada comprimento de onda, mas também a quantidade de energia solar que existe nos respectivos comprimentos de onda. Por exemplo, embora a pele responda violentamente com formação de eritema em 290nm, apenas 0,8% da energia solar total, que chega à Terra, está dentro desse comprimento de onda (KIRCHHOFF et al., 2000).

A radiação UVB (280-320 nm) é o agente físico mais descrito como formador de radicais livres 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 5,0J/cm² para produzir uma dose mínima eritematosa, e o eritema atinge máxima intensidade de seis a 20 horas após a exposição (YING; PARRISH; PATHAK, 1974).



Figura 2 – Penetração dos raios UVA e UVB nas camadas da pele.

Fonte: Adaptado Fuchs (1998).

Dentre as EROs formadas na pele, podemos destacar o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), os radicais peroxil e alcóxil ($\text{LOO}\cdot$ e $\text{LO}\cdot$), o oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos (LOOH). Além das EROs, também estão envolvidos em processos redox outras espécies intermediárias, as ERNs, tais como $\text{NO}\cdot$, peroxinitrito (ONOO^-) e espécies reativas

de enxôfre, com importância biológica significativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Essas espécies são fundamentais em diversos processos fisiopatológicos e bioquímicos, mantendo a sobrevivência e a homeostase celular, com um equilíbrio refinado entre sua formação e remoção. Porém, quando há alterações acentuadas neste equilíbrio, um estado pró-oxidante é gerado, levando, assim, ao chamado estresse oxidativo (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

No que diz respeito à remoção das espécies reativas, vários mecanismos de defesas antioxidantes foram desenvolvidos durante o processo de evolução dos seres humanos (KOHEN; GATI, 2000). Na pele, as células possuem mecanismos enzimáticos de resposta rápida, bem como moléculas antioxidantes de baixo peso molecular para contrabalançar o efeito deletério causado pelo estresse oxidativo, como apresentado na figura 3 (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Portanto, o equilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas na pele pode sofrer ação dos agentes exógenos ou endógenos, induzindo um estado de estresse oxidativo, o qual pode ser combatido pelos sistemas antioxidantes presentes no tecido cutâneo (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

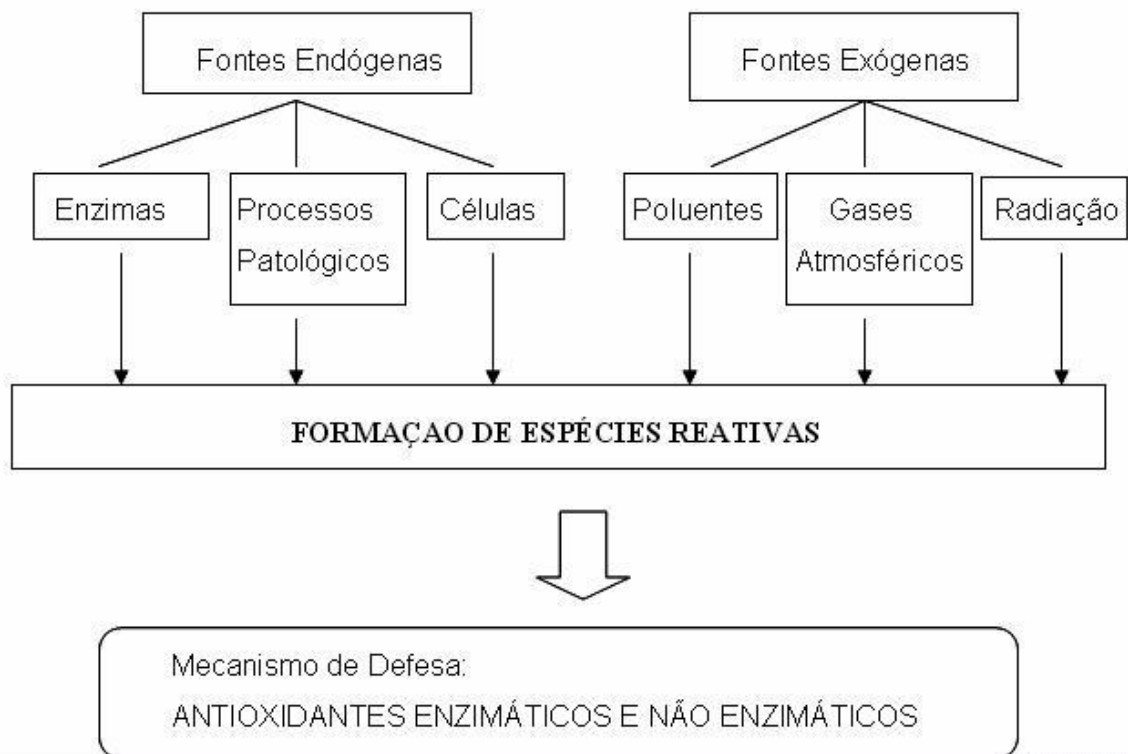


Figura 3. Fontes de espécies reativas na pele e mecanismos de defesa.

Fonte: Guaratini, Medeiros e Colepicolo (2007).

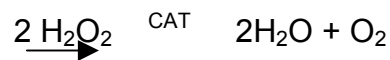
1.3 BALANÇO REDOX NA PELE

O sistema antioxidante cutâneo é formado por substâncias enzimáticas e não-enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a glutathiona peroxidase (GSH-Px), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (KOHEN; FANBERSTEIN; TIROSH, 1997). As enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa intracelular, por prevenirem as reações em cadeia dos radicais livres pela diminuição na concentração disponível destes para iniciar o processo oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

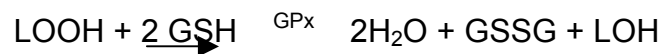
A SOD contribui para um dos mecanismos antioxidantes mais eficientes, catalisando a dismutação do radical $\bullet\text{O}_2^-$ em H_2O_2 na presença de próton H^+ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) e evita os danos que poderiam ser causados por este radical. Diversos tipos de SOD são descritos na literatura, alguns estão localizados no citosol, em organelas celulares específicas e extracelularmente, em

sítios ativos que podem conter diferentes íons, como cobre, zinco, manganês ou ferro (FRIDOVISH, 1998).

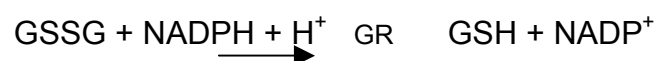
A CAT e a GSH-Px são as principais responsáveis pela remoção imediata de H_2O_2 . A CAT encontrada em todos os órgãos do corpo, especialmente nos hepatócitos e eritrócitos, está presente em grandes concentrações nos peroxissomos e em baixas concentrações nas mitocôndrias, catalisando a decomposição específica de H_2O_2 , gerando moléculas de água e oxigênio (O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FRIDOVISH, 1998).



A GSH-Px, por sua vez, é fundamental no metabolismo de H_2O_2 e de outros peróxidos, pois catalisa reações de doação de elétrons, no qual se utiliza da glutathiona reduzida (GSH) como agente redutor, formando a glutathiona oxidada (GSSG) (ROVER et al, 2001).



A GSH é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento tiol-SH presente na cisteína (MATSUBARA; MACHADO, 1991). Quando a GSH é oxidada pela reação da GSH-Px, há a interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, com formação de GSSG. A queda nos níveis de GSH pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão GSH/GSSG alta. Para isso, a GSSG formada é reduzida novamente a GSH à custa de NADPH, pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).



Os antioxidantes não enzimáticos ou de baixo peso molecular, também contribuem com a manutenção do balanço redox celular. Nesta classe,

incluem-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). Dentre os antioxidantes de baixo peso molecular que protegem a pele contra as EROs, incluem o ascorbato, glutathione, tocoferol e ubiquinol (PODDA, et al., 1998).

Dentre as substâncias endógenas, podemos destacar alguns hormônios, como estradiol e estrógeno, que apresentam atividade antioxidante semelhante à vitamina E, devido, provavelmente, à sua porção fenólica, comum a ambas as moléculas (KVAM; DAHLE, 2003). A melatonina, reguladora do relógio biológico nos mamíferos também apresenta atividade antioxidante, provavelmente, devido à desidrogenação do grupamento–NH da sua estrutura, além de induzir a síntese de antioxidantes enzimáticos *in vivo* como a glutathione peroxidase (SLOMINSKI et al., 2002). Destacam-se, também, o ácido lipóico, um cofator essencial em vários complexos enzimáticos que apresenta atividade antioxidante e que pode atuar como regenerador de forma oxidadas de glutathione; ascorbato e α -tocoferol; bem como a melanina, um pigmento formado pela oxidação e polimerização da tirosina, com papel antioxidante, protegendo a pele principalmente contra $\bullet\text{O}_2^-$ e $\text{LOO}\bullet$ (KVAM; DAHLE, 2003).

Além de todo o sistema antioxidante endógeno exemplificado, a pele conta ainda com um eficiente mecanismo de reparo, caso os danos já tenham ocorrido, envolvendo enzimas e substâncias de baixo peso molecular (KROKAN; STANDAL; SLUPPHAUG, 1997; ICHIHASHI et al., 2003).

Em especial, a pele submetida à radiação UV conta com a proteção natural de cada indivíduo, que pode ser atribuída:

- ao processo de queratinização que condiciona a espessura e a coesão da camada córnea;
- ao acúmulo cutâneo e subcutâneo de carotenos, pelo ácido urocânico;
- à pigmentação melânica constitucional promovida, exclusivamente, pela eumelanina, a qual dispersa, absorve e transforma a energia fotônica em calor ou vibração e é também um captador de radicais livres (MORÊTE; RODRIGUES; PINTO, 2002).

1.4 FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS NA PELE PROVOCADA PELA RADIAÇÃO UV

Sugere-se que as radiações UVA e UVB são responsáveis pela diminuição de sistemas antioxidantes cutâneos, bem como pelo aumento de sistemas oxidantes, alterando assim o balanço redox celular e conseqüentemente a homeostasia cutânea (YASUI; SAKURAI, 2000).

Contudo, os danos causados a pele pela indução do estresse oxidativo são altamente controlados devida a rápida eliminação das EROs, pelos mecanismos antioxidantes eficientes da pele (KOHEN; FANBERSTEIN; TIROSHI, 1997; KOHEN; GATI, 2000).

Embora o sistema antioxidante da pele seja muito eficiente, a radiação UV pode provocar lesão celular pela formação de radicais livres, por meio dos mecanismos descritos a seguir:

1 - As interações entre as ondas provenientes da radiação solar e a pele podem ocorrer por meio de ação direta da radiação sobre as estruturas celulares, como faz a UVB ou UVA (HARRIS, 2005). O $^1\text{O}_2$, uma espécie eletronicamente excitada, pode ser produzida por diversas reações químicas e fotoquímicas e devido a sua eletrofilicidade, pode reagir com compostos insaturados, sulfetos e aminas, sendo os ácidos graxos insaturados, DNA e proteínas importantes alvos biológicos (Figura 4) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2 - Os danos na pele, provocados pela radiação aguda por UVB, podem acontecer também de forma indireta, provavelmente resultado do aumento de radicais livres produzidos durante a resposta inflamatória imediata com eritema e infiltrado de leucócitos (CASAGRANDE et al., 2006).

Os neutrófilos ativados por citocinas pró-inflamatória, geram $\bullet\text{O}_2^-$ por uma reação catalisada pela enzima NADPH oxidase. No neutrófilo, a SOD catalisa a dismutação do $\bullet\text{O}_2^-$ em H_2O_2 , a partir do qual podem ser gerados $\bullet\text{OH}$ e ácido hipocloroso (HClO). O $\bullet\text{OH}$ é produzido por meio de uma reação que requer Fe^{2+} , também conhecida como reação de Haber-Weiss. O HClO é gerado a partir de uma reação

catalisada pela mieloperoxidase (MPO), a partir do qual, podem ser formados derivados altamente tóxicos, as cloroaminas (Figura 4) (SHINDO; WITT; PACKER, 1993; VINTEN-JOHANSEN, 2004).

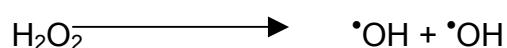
Ainda durante as repostas inflamatórias o NO• desempenha importante papel como componente vasodilatador e na modulação das respostas imunes na pele. O NO• na presença de •O₂ forma o ONOO⁻ que pode provocar danos oxidativos na pele (Figura 4) (FUCHS et al., 2001).

3 - As espécies reativas podem ser formadas, ainda, indiretamente, por reações da luz com fotossensibilizadores endógenos cutâneos, como por exemplo, o ácido urocânico (BICKERS; ATHAR, 2006). Como resultado da sensibilização endógena pode ocorrer a produção do •O₂⁻ ou ¹O₂ (Figura 4) (MARTIN; BURCH, 1990).

Substâncias exógenas aplicadas sobre a pele, na forma de cosméticos ou drogas fotossensibilizadoras ingeridas que atingem a pele, incluindo alguns fenotiazínicos (usado em tranqüilizantes), como também as fluoroquinolonas e os antibióticos (tetraciclina), podem promover a geração de ¹O₂, •OH e outras espécies reativas de oxigênio, com efeitos nos queratinócitos da epiderme e células de Langerhans (Figura 4) (MAGLIO et al., 2005).

4 - Moléculas oxidantes também podem ser geradas devido aos danos na mitocôndria pela radiação UVB, produzindo •O₂⁻, H₂O₂ e •OH (WELLER et al, 2003).

5 - Uma outra situação é que, apesar da luz UV não depositar energia suficiente nas moléculas de água para ionizá-las, se H₂O₂ estiver disponível, a UVB causa fissão homolítica, gerando o radical hidroxil (•OH), altamente reativo (Figura 4) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).



6 - Outro mecanismo de formação de espécies reativas foi sugerido por Heck et al. (2003), quando identificaram uma catalase presente em queratinócitos capaz de formar EROs em resposta a radiação

UV, em especial UVB. Usando cromatografia de troca iônica, afinidade metálica e exclusão de tamanho, uma proteína de 240 kDa e capacidade de gerar EROs foi isolada de cultura de queratinócitos previamente submetidos à irradiação UVB. A proteína exibiu grande absorção na extensão de 320 a 360nm com pico adicional entre 400 e 410 nm, sugerindo a presença do grupamento heme. Seqüenciamento usando cromatografia líquida iônica acoplada à espectrometria de massa identificou a proteína como catalase. Observações que os efeitos da luz UVB na catalase são altamente sensíveis ao pH e dependentes de oxigênio, mas que não requerem substratos adicionais, sugerem que as EROs podem ser formadas pela transferência de fótons derivados da água que subsequente interagem com o oxigênio molecular (Figura 4).

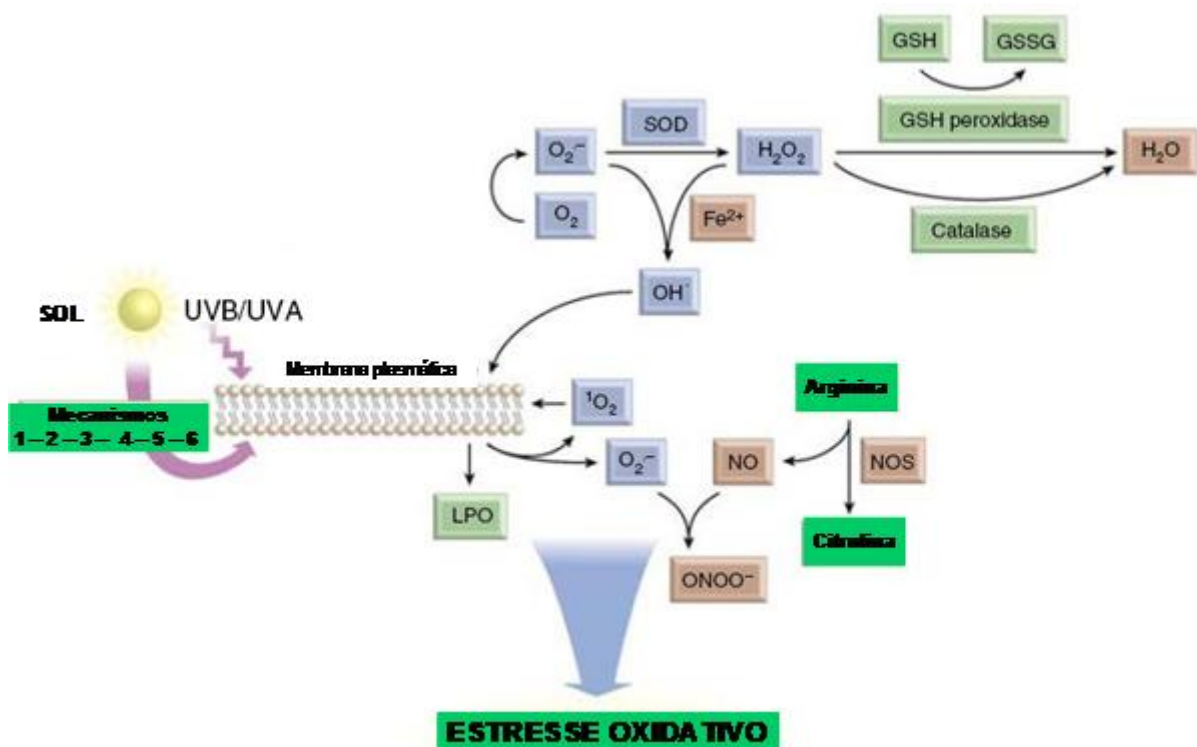


Figura 4 – Formação das principais espécies reativas na pele, provocada pela radiação UV e sua inativação pelos sistemas antioxidantes da pele.

Fonte: Adaptado Bickers e Athar (2006).

1.5 EFEITOS OXIDATIVOS DA RADIAÇÃO UV NA PELE

Lesões oxidativas são produzidas quando os radicais livres atacam os próprios constituintes celulares, numa reação típica de oxirredução. Os radicais livres atacam os principais constituintes celulares, como os lipídeos das membranas celulares, as proteínas estruturais e enzimas e o próprio DNA. Os constituintes celulares são oxidados e degradados através de reações em cadeia, quando são formados novos radicais livres intermediários que atacam outros compostos sucessivamente, causando lesões nas estruturas celulares (HARRIS, 2005).

Durante as reações em cadeia, a indução da peroxidação de ácidos graxos pode induzir à formação de hidroperóxidos lipídicos, que na presença de Fe^{2+} , podem ainda ser oxidados a LO^{\bullet} , vindo a sofrer quebra na ligação C--C seguinte e originar compostos intermediários, aldeídos de baixo peso molecular, dialdeído malônico (MDA), α -hidroxinonenal e hidrocarbonetos, como etano e n-pentano (OHKAWA; NOBUKO; YAGI, 1979), que podem atacar grupamento amino de proteína e fosfolipídio, modificando moléculas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os aldeídos formados pela lipoperoxidação podem, ainda, interagir com o DNA formando adutos que têm sido associados ao câncer.

A peroxidação lipídica traz conseqüências homeostáticas severas para as membranas atacadas, refletidas, principalmente, na perda de sua integridade, devido à alteração na sua permeabilidade a íons e pequenas moléculas e perda nas suas características de fluidez (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Esta agressão acaba por interferir em mecanismos celulares importantes, incluindo sistemas enzimáticos, expressão gênica, entre outros (CREMONESE; PEREIRA-FILHO; MAGALHAES, 2001).

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das espécies reativas do 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).

No caso das proteínas, quando há ação das EROs, suas estruturas secundárias e terciárias são rompidas, com subsequente aumento de hidrofobicidade e perda de função. $\cdot\text{OH}$ é particularmente proteotóxico, pois pode reagir com o carbono de qualquer aminoácido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Parte dos danos no DNA é mediada pela formação do $\cdot\text{OH}$. Este radical promove modificação de bases púricas e pirimídicas, muitas das quais são mutagênicas ou impedem a ação dos processos de regulação e de transcrição gênica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Existem muitos relatos sobre os efeitos oxidativos devido à radiação UV. Tem sido sugerido que a reação das espécies reativas formadas pelas UVA e UVB com componentes celulares podem resultar em lipoperoxidação, oxidação de proteínas e de DNA (LINTON; DAVIES; DEAN, 2001; BICKERS; ATHAR, 2006).

Segundo Inal e Kahraman (2000), a exposição prolongada da pele à luz UV resulta em grande diminuição dos antioxidantes, na formação de EROs e no aumento dos produtos da lipoperoxidação, responsáveis pelo dano oxidativo da pele. Essa diminuição do sistema de defesa antioxidante é muito mais grave na epiderme do que na derme, resultando na supressão do sistema imune, inibição do reparo no DNA, podendo causar papilomas e carcinomas de células basais.

Contrário a todos os relatos sobre a lipoperoxidação pela exposição ao UVB, Maglio et al. (2005), descreveram uma diminuição da peroxidação lipídica na pele por doses agudas, mesmo tendo constatado produção mitocondrial de $\cdot\text{O}_2^-$ e um aumento na expressão de iNOS. Este aumento induziria uma via de sinalização protetora contra a peroxidação lipídica na pele de animais irradiados, como descrito por outros autores (DELICONSTANTINOS; VILLIOTOU; STAVRIDES, 1996; LEE et al., 2000; WELLER et al., 2003). Maglio et al. (2005) justificaram que muitos dos estudos sobre os efeitos da irradiação UVB na pele, nos quais evidenciaram o estresse oxidativo e a lipoperoxidação, foram realizados em ensaios com cultura de células, sem levar em consideração os efeitos de fatores sistêmicos. No modelo utilizado, com camundongo hairless, a resposta inflamatória foi mediada por fatores como a histamina, prostaglandina e citocinas.

1.6 MANIFESTAÇÕES AGUDAS E CRÔNICAS NA PELE APÓS RADIAÇÃO UV

Provavelmente muitas das doenças na pele provocada pela exposição a radiação UV é conseqüência da geração de radicais livres e mobilização do metal de transição ferro, durante as manifestações da exposição aguda ou crônica à radiação solar. As EROs formadas nestas condições, desempenham um papel importante nas doenças cutâneas, incluindo a inflamação, carcinogênese na pele, envelhecimento e danos nas células epiteliais (WHEELER et al., 1986).

Com relação às manifestações da exposição aguda a radiação UV, sabe-se que tanto os raios UVA quanto os UVB podem induzir ativação de vários fatores de transcrição nas células da pele, incluindo AP-1 e NF-kB (TYRRELL, 1996). O NF-kB é um fator sensível ao estresse oxidativo que ativa múltiplos genes envolvidos na expressão de muitos mediadores pro-inflamatórios, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX-2), e de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, proliferação e apoptose (Bax, Bcl2, p53, p.21, etc) (FUCHS, 1998; CARINI, et al., 2000; BIKERS; ATHAR, 2006). Tem sido sugerido que a modulação do NF-kB, sensível à redução pelas EROs, é o principal evento na indução de reações inflamatórias (FUCHS et al., 2001). A ativação de AP-1 e NF-kB, pode ser promovida por $^1\text{O}_2$ ou outras espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Kabashima, et al. (2007), relataram que uma única exposição à radiação UVB (dose de 5 J/cm^2) em camundongos tricotomizados causa uma importante inflamação na pele com conseqüente edema após 24 horas da irradiação. O eritema solar é provocado por uma vasodilatação e aumento do volume sanguíneo na derme após exposição à radiação solar, sendo reconhecido visualmente como um vermelhidão da pele. A queimadura solar surge quando a reação de eritema é muito intensa, acompanhada de calor, dor e edema. A vasodilatação após a exposição por UV leva ao acúmulo de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e células T (KABASHIMA et al., 2007).

De fato, tem sido sugerido que inflamação induzida pela radiação UV é conseqüência da estimulação de citocinas pro-inflamatórias pelos queratinócitos (WIDYARINI et al., 2001). Após a exposição pela radiação UV, as citocinas da

superfície celular e os receptores para fatores de crescimento (EGF), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são ativados (FISHER et al, 2002).

Fuchs et al. (2001) sugeriram que em resposta às citocinas inflamatórias ou endotoxinas durante a resposta inflamatória, há uma superregulação da iNOS associada com o aumento da atividade da NOS. Kuhn et al. (1998) demonstraram a expressão aumentada de iNOS na pele quando exposta a radiação UVB, resultando em formação excessiva de NO^{*}, que além de provocar lesões oxidativas na pele, pode estar relacionado com a produção do eritema após a exposição à irradiação UVB (DELICONSTANTINOS; VILLIOTOU; STAVRIDES, 1995).

Tron et al. (1998), relataram que os efeitos da imunossupressão também são observados após a irradiação UV. Demonstrou-se em camundongos e humanos que a pele irradiada por UV é caracterizada por uma perda de epiderme e diminuição das células de Langerhans e uma infiltração de leucócitos inflamatórios na derme. Foi observado infiltração de macrófagos na epiderme após 6 horas da irradiação por UV, acompanhada de produção e secreção de IL-10 após 72 horas e efeitos da imunossupressão em 24 horas (TRON et al., 1998).

Sobre os efeitos crônicos tem sido relatado que, como resultado da geração das espécies reativas, ocorre uma alteração no sistema imunológico pela diminuição da capacidade de eliminar células alteradas, devido a mudanças na produção de citocinas pelos queratinócitos e outras células cutâneas, por alterações na expressão de moléculas de adesão e perda de funções celulares. A UVB inibe também a função das células natural killer (NK) em processos de apoptose e lise celular. Esta última alteração correlaciona-se diretamente com a carcinogênese em condições de desequilíbrio na expressão do gene p53 (CLYDESDALE; DANDIE; MULLER, 2001). Desse modo, o UVB pode ser responsável pelo câncer na pele humana, como os carcinomas de células basais e escamosas, até melanomas malignos (ARMSTRONG; KRICKER, 2001).

Quanto ao envelhecimento cutâneo sabe-se que grande parte das transformações cutâneas que eram somente atribuídas ao processo de envelhecimento cronológico, devem-se entre outros fatores a exposição solar crônica (HELENIUS et al., 1996). Na pele, a UVB induz a síntese de metaloproteinases, as quais podem degradar o colágeno e outros componentes do tecido conectivo. A indução destas enzimas pode ser mediada por AP-1 e NF- κ B (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os padrões oxidativos na pele, provocados por dose aguda de irradiação UVB.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a oxidação de lipídeos e proteínas, as alterações dos sistemas enzimáticos e não enzimáticos, a capacidade antioxidante total e as alterações morfológicas da pele, provocadas por dose aguda de irradiação UVB, em modelo de camundongo Swiss tricotomizado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Para este estudo foram utilizados os seguintes reagentes:

- Albumina sérica bovina (Sigma);
- 2,2-azo-bis-2-amidinopropano diidrocloreto (ABAP) (Aldrich);
- BHT (Sigma)
- DNFH (Merck)
- DTNB (Merck)
- EDTA (Reagen)
- Eosina (Merck);
- Etanol (Merck)
- Etil acetato (Merck)
- Éter etílico (Nuclear);
- Guanidina (Sigma)
- KCl (Reagen Quimibrás);
- KH_2PO_4 (Merck);
- H_2O_2 (Synth);
- H_2SO_4 (Quimex);
- Hematoxilina (Merck);
- Luminol (5-Amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinadiona, Sigma);
- N_2 (Air Liquide Brasil LTDA);
- n-butanol (Grupo Química)
- NaCl (Reagen Quimibrás);
- Na_2CO_3 (Merck);
- Na_2HPO_4 (Merck); NaH_2PO_4 (Merck);
- NaOH (Merck); Pirogalol (Sigma);
- Parafina (Paraplast)
- Reagente fenólico de Folin-Ciocalteus (Merck);
- Terc-butyl hidroperóxido (Sigma);
- Tris (Sigma);

- Trolox (Aldrich);
- TBA - SIGMA
- TCA (Merck)
- Xilol (Fynth)

3.2 ANIMAIS

O ensaio com animais foi autorizado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina.

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando 20-25g, tricotomizados no dorso por aparelhos Wahl Professional e Panassonic ER389, sem causar lesão mecânica na pele. Modelos experimentais que utilizam camundongos tricotomizados, foram anteriormente relatados conforme Lu et al. (2004) e Gorman et al. (2005), demonstrando ser viável e não limitando o número de ensaios.

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Patológicas, com ciclo claro-escuro de 12 horas, alimentados com ração balanceada e supridos com água *ad libitum*.

3.3 FONTE DE IRRADIAÇÃO UVB

A fonte de luz utilizada foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W, que emite irradiação na faixa de comprimento de onda de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A lâmpada foi acoplada a uma caixa de dimensões 1,30 m X 0,43 m X 0,45 m (Figura 5A). A caixa acomodava 6 gaiolas, com um camundongo em cada uma (Figura 5B). As gaiolas tinham redes que permitiam a movimentação dos animais, porém garantiam que a irradiação fosse concentrada no dorso dos mesmos. Irradiância média da lâmpada = $2,3718 \cdot 10^{-4} \text{ W/cm}^2$, colocada 15 cm acima do animais. Como a irradiância da lâmpada não era uniforme em toda a sua extensão, as gaiolas foram trocadas de

lugar a cada 35 minutos, de modo que todos os camundongos recebessem a mesma dose de irradiação.

A dose aguda de UVB utilizada ($2,98 \text{ J/cm}^2$) por três horas e trinta minutos, provocou eritema logo após a irradiação, intensificando-se a partir de seis horas, estando de acordo com outros autores (DELICONSTANTINOS; VILLIOTOU; STRAVRIDES, 1996; MAGLIO et al., 2005) Heck et al. (2003), analisaram os efeitos da luz UVB na geração de oxidantes intracelulares em queratinócitos humanos e murinos, evidenciando que a luz UVB, numa extensão de $0,1\text{-}1,0 \text{ J/cm}^2$, causou um aumento acentuado na formação de EROs em ambos os tipos celulares. Esta resposta foi dependente da dose de luz UVB.

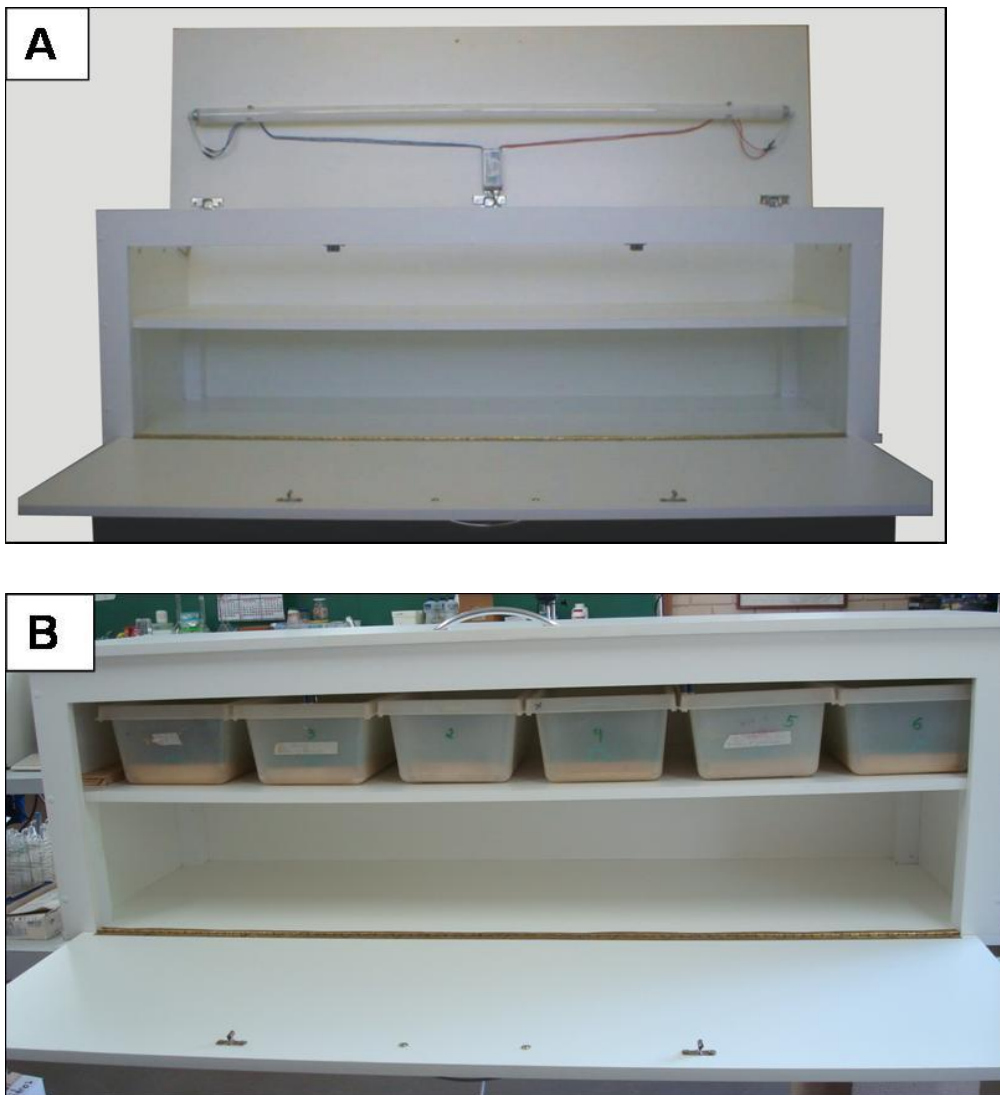


Figura 5 – Caixa de irradiação. A - Caixa de irradiação acoplada lâmpada B - Caixa de irradiação contendo 6 caixas de plástico

Os animais foram separados em três grupos:

-Grupo Experimental (grupo 6 horas) – camundongos receberam a dose de irradiação ($2,98 \text{ J/cm}^2$) durante 3 horas e 30 minutos, e tiveram a pele removida após 6 horas.

-Grupo Experimental (grupo 24 horas) – camundongos receberam a dose de irradiação ($2,98 \text{ J/cm}^2$) durante 3 horas e 30 minutos, e tiveram a pele removida após 24 horas.

-Grupo Controle (Controle) – os camundongos foram submetidos às mesmas condições dos animais experimentais, portanto colocados na caixa de irradiação, por 3 horas e 30 minutos, sem receber a dose aguda de UVB.

3.4 RETIRADA DA PELE DOS ANIMAIS E PREPARO DO HOMOGENATO

Os grupos controles e experimentais foram sacrificados por deslocamento cervical. A pele do dorso desses animais (4X3 cm – figura 6A) foi removida (Figura 6B), pesando no total de 600 a 700mg, cortada em pedaços e armazenada em nitrogênio líquido.

Para as análises, as peles foram homogeneizadas em um aparelho modelo Van Potter com 2 movimentos de pistilo 5 vezes, por 45 segundos, com intervalos de 15 segundos, na concentração de 10 mg/mL, para os testes de quimiluminescência (QL), capacidade antioxidante total (TRAP) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 30 mg/mL, para o teste de proteínas carbonílicas (PCs) ou 50 mg/mL, para os testes da atividade da SOD e da CAT, em tampão de pH apropriado para cada técnica. O homogenato de 50 mg/mL foi submetido à centrifugação a $10500 \times g$ por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado nas análises. As amostras foram mantidas no gelo durante os experimentos.

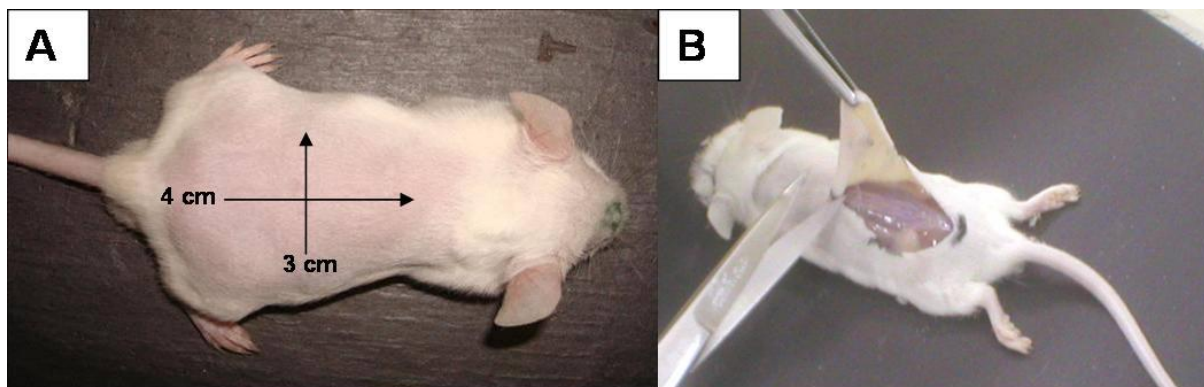


Figura 6 – Remoção da pele do dorso do camundongo após sacrifício. A -Camundongo tricotomizado B - Remoção da pele

3.5 QUIMILUMINESCÊNCIA (QL) INDUZIDA POR TERT-BUTIL HIDROPERÓXIDO

Para avaliar o grau de estresse oxidativo prévio da pele, foi utilizado o método de QL induzida por tert-butil hidroperóxido, descrito por Flecha, Llesuy, e Boveris (1991), modificado pela adição de hemina (ZAMBURLINI et al.; 1995a; ZAMBURLINI et al.; 1995b). Os homogenatos foram preparados na concentração de 10 mg de tecido em 1,0 mL de tampão. As amostras (100 μ L) foram incubadas com 870 μ L de tampão fosfato de potássio monobásico pH 7,4 e 10 μ L de hemina 1 mM a 37°C por 5 minutos. A reação foi iniciada pela injeção de 20 μ L de tert-butil, preparado no momento do uso e mantido em banho de gelo e ao abrigo da luz. A emissão de luminescência pela amostra foi determinada em luminômetro Turner Designs TD-20/20, com resposta entre 300-650nm, durante 2 minutos, em ambiente de baixa luminosidade. Os resultados foram expressos em Unidades Relativas de Luz (URL) / mg de tecido.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Os produtos da lipoperoxidação de membrana foram determinados pela formação de TBARS, segundo Biswas et al. (1985), modificado por Cecchini, Aruoma e Halliwell (1990).

Neste trabalho empregou-se uma alteração do método colorimétrico proposta por Jentzsch et al. (1996), no qual se utiliza butilado de hidroxitolueno (BHT), para impedir a oxidação do homogenato durante o experimento, garantindo que a lipoperoxidação observada fosse anterior ao mesmo. As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas no banho-maria 95°C por 30 minutos. Após resfriamento em banho gelado, a fase orgânica foi extraída pela adição de n-butanol, seguido de agitação vigorosa por 40 segundos, centrifugação a 2167 x g por 15 minutos e utilizada para a quantificação espectrofotométrica de TBARS.

A quantificação do cromóforo formado entre o TBA e o MDA foi realizada pela diferença das absorvâncias a 535 e 572 nm da seguinte maneira:

$$X = \text{Abs}_{535\text{nm}} - \text{Abs}_{572\text{nm}}$$

$$X_{\text{amostra}} - X_{\text{branco}} = Y$$

$$\frac{Y \times 1000}{156 \times \text{mg proteína}/100\mu\text{L}} = N \text{ nM TBARS/mg proteína}$$

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS CARBONÍLICAS (PCs)

As PCs foram quantificadas de acordo com o método de Reznick e Packer (1994), que utiliza o método colorimétrico através da reação com a dinitrofenilhidrazina (DNFH).

Homogenatos de 30mg/mL em tampão fosfato de potássio monobásico 50mM, 1mM EDTA, pH 7,4 foram feitos e submetidos à ação da DNFH. Na seqüência, foram realizadas precipitações seguidas de proteína com ácido tricloacético (TCA) 20 e 10%, e tratamento com etanol etil-acetato (1:1 – v/v) para remoção do excesso de DNFH. Os pellets finais foram ressuspensos em guanidina 6M e um pico de absorvância obtido na leitura da cor amarelada do sobrenadante e foi lido em espectrofotometria de varredura entre 355-390 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de carbonil/mL/mg de proteínas totais.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP) POR QUIMILUMINESCÊNCIA

A TRAP foi avaliada conforme descrito por Repetto et al. (1996). Esta técnica avalia os níveis de antioxidantes totais de um tecido, principalmente antioxidantes de baixa massa molecular. Neste método, o ABAP, um sistema gerador de radical alcooxil por decomposição térmica, produz fótons que são amplificados pelo luminol e medidos em luminômetro (Turner Designs TD 20/20). A reação é inibida por análogos da vitamina E outros antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis

A adição 100 μ L de homogenato 50mg/mL do miocárdio também diminuiu a quimiluminescência a níveis basais (tempo de indução, T_i) proporcionalmente a concentração de antioxidantes até radicais de luminol serem gerados.

O sistema foi calibrado com um análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox). Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e homogenato permitiu obter valores de TRAP com uma concentração relativa a concentração do Trolox (Figura 7).

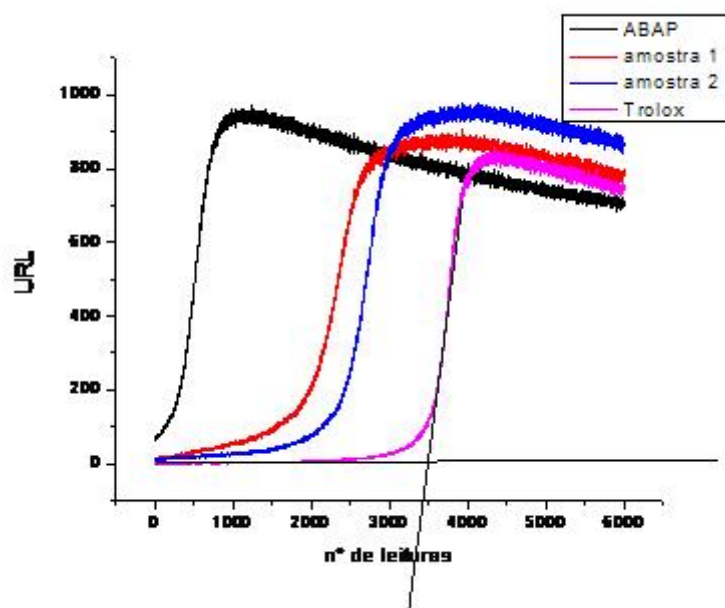


Figura 7 – Gráfico representativo do TRAP, mostrando a emissão de fótons pelo nº de leituras . A interseção das retas representa a fase de indução da reação.

Para obtenção do resultado a seguinte equação foi usada:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = D \times T_{\text{amostra}} / T_{\text{Trolox}}$$

onde:

D - é uma fator de diluição;

T_{amostra} - é o tempo de indução da amostra;

T_{Trolox} - é o tempo de indução provocado pela adição 1 μM de Trolox.

3.9 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com o método de Cohen, Dembiec e Marcus (1970), modificado por Aebi (1984). A absorbância de um padrão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), adicionado à água deionizada e a tampão TRIS HCL 1M pH 8,0 foi lida a 240 nm. Em seguida, 100 μL da amostra do sobrenadante do homogenato de 50mg/mL foi adicionado ao meio e foi verificada a queda da absorbância do peróxido de hidrogênio durante 3 minutos. Os resultados foram expressos em abs/mg proteína/minuto. A decomposição do H_2O_2 está relacionada diretamente com a queda da absorbância a 240 nm.

3.10 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método descrito por Marklund e Marklund (1974), baseado na inibição da autooxidação do pirogalol em solução aquosa. A SOD inibe a autooxidação do pirogalol por catalisar a dismutação do $\cdot\text{O}_2^-$ em H_2O_2 . Esta oxidação foi acompanhada pelo aparecimento de cor amarela no meio de reação, monitorada a 420 nm por 6 minutos. Na reação valores de sobrenadante (100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL) do homogenato de 50mg/mL, inibem a autooxidação do pirogalol. Os resultados representam a relação entre os valores obtidos das amostras e do controle (pirogalol). A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogalol é definida como

uma unidade de atividade enzimática (U). Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

3.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A quantificação de proteínas dos homogenatos foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) modificado por Miller (1959), utilizando soro albumina bovina como padrão.

3.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Amostras de pele do dorso nos animais foram submetidas a tratamento histológico. Para tanto, o tecido foi desidratado em concentrações crescentes de álcool e xilol e embebido em parafina. Os cortes de 5 μ m foram feitos utilizando o micrótomo Reichert-Jung, corados com hematoxilina-eosina e observados em microscópio óptico.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados representam a média e erro padrão da média de 6 a 11 animais por grupo. A análise de significância foi realizada pelos testes one-way ANOVA e Bonferroni como post hoc. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. e $p < 0,01$. Para os resultados de QL estimulada por tert-butil a análise foi avaliada por two-way ANOVA e Bonferroni como post hoc. O programa Origin 6.0 e GraphPad Prisma 4 foram utilizados para as análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Observou-se eritema 6 horas (Figura 8 B) após a irradiação aguda por UVB, permanecendo 24 horas após a irradiação (Figura 8 C), comparado ao controle não irradiado (A).



Figura 8 – Aspecto da pele do dorso do camundongo. (A). Antes da irradiação UVB; (B). Após 6 horas de irradiação UVB; (C). Após 24 horas de irradiação UVB.

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na análise histológica da pele do grupo controle foi observado parênquima organizado, adipócitos pequenos e ausência de *sunburn cells* (SBCs), conforme pode ser observado na figura 9 A. Na análise histológica da pele dos grupos irradiado 6 e 24 horas, o parênquima estava menos organizado, com presença de SBCs (Figura 8 B e C).

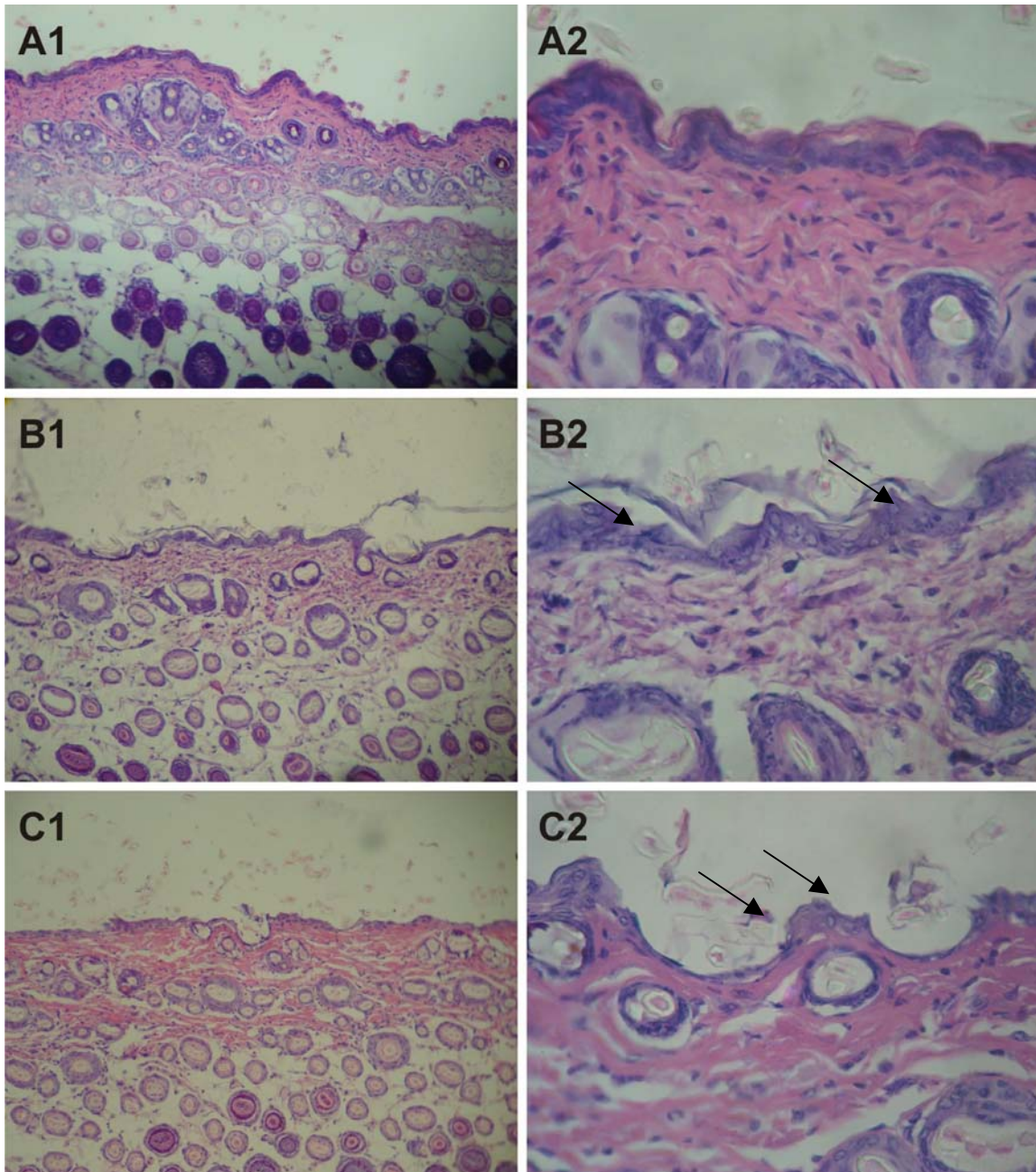


Figura 9 – Fotomicrografia mostrando alterações histológicas após a irradiação da pele por UVB. (A) Pele sem irradiação; (B) após 6 horas da irradiação; (C) após 24 horas da irradiação (He 100x em A1-B1-C1 e 400x em A2-B2-C2). Em B2 e C2, mostra a ruptura da integridade da epiderme e a presença de SBCs (setas).

4.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA PELE

A figura 10 ilustra a quimiluminescência estimulada por terc-butil hidroperóxido emitida pelos grupos experimentais, refletindo o nível de hidroperóxido emitida pelo grupo 24 horas. A curva do grupo 6 horas é significativamente menor, enquanto que a curva do grupo 24 horas mostrou significativamente maior, comparadas ao grupo controle, com $*p < 0.05$. Além disso, a comparação entre os grupos experimentais mostrou significância ($\#p < 0,05$).

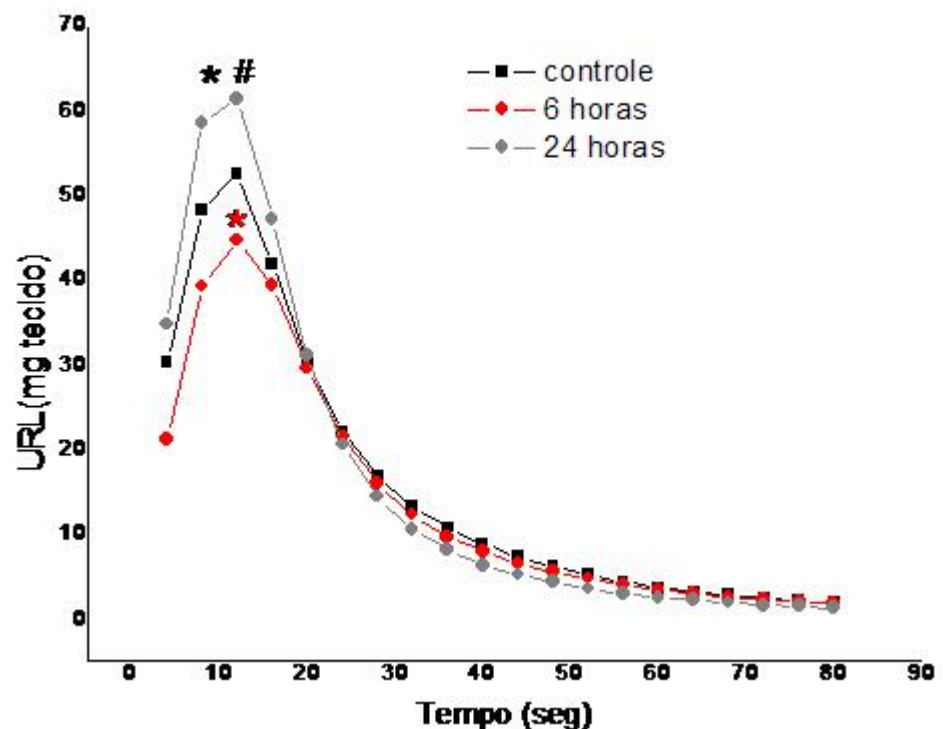


Figura 10 – Avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência estimulada por terc-butil hidroperóxido dos homogenatos de pele de camundongos irradiados. O gráfico representa a emissão de fótons entre 0 a 80 segundos. As curvas são estatisticamente diferentes. A comparação foi feita pelo teste two-way ANOVA e Bonferroni como post hoc, são $*p < 0.05$ comparado ao grupo controle; $\#p < 0,05$ comparado ao grupo 6 horas (n=6 para os três grupos).

Os níveis de TBARS (figura 11), diminuíram significativamente no grupo 6 horas ($4,4 \pm 1,3$ nM MDA/mg proteína) e 24hs ($6,4 \pm 1,10$ nM MDA/mg proteína) quando comparados ao grupo controle ($11,4 \pm 1,04$ nM MDA/mg proteína) com $*p < 0,01$ grupo 6 horas e $*p < 0,05$ grupo 24 horas.

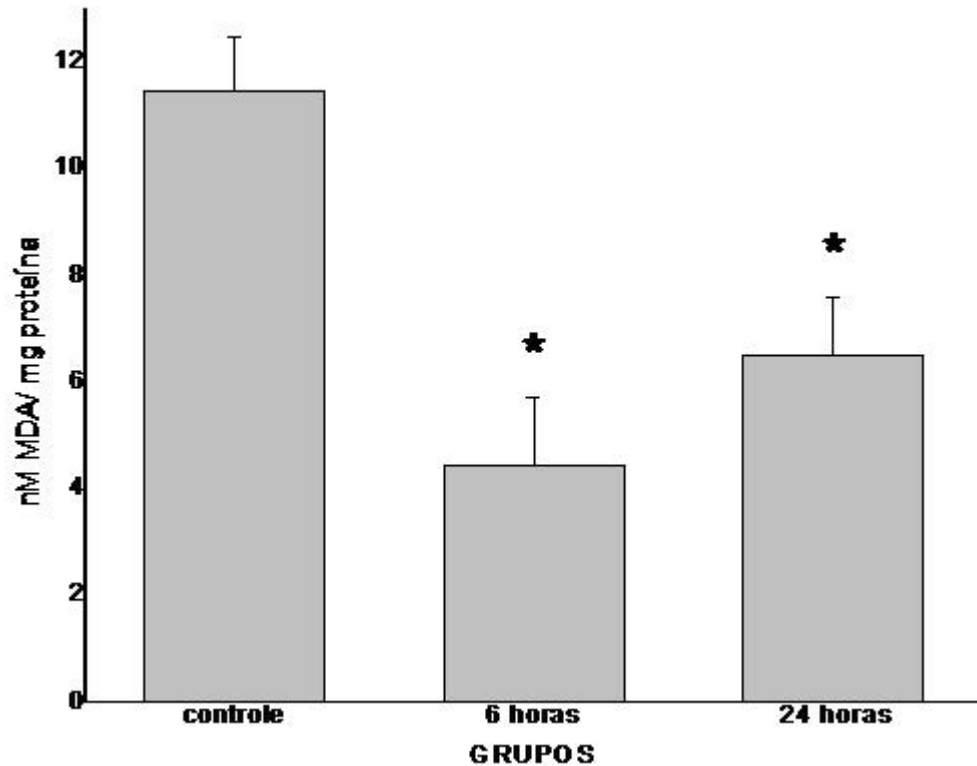


Figura 11 – Quantificação dos níveis de TBARS dos homogenatos de pele de camundongos irradiados. Os resultados representam a média \pm o erro padrão. Valores de p foram determinados pelo test one-way ANOVA e Bonferroni como post hoc, são $*p < 0,01$ grupo 6 horas (n=6) e $*p < 0,05$ grupo 24 horas (n=7) quando comparado ao controle (n=12).

Os níveis de proteínas carbonílicas (figura 12) diminuíram significativamente no grupo 6 horas ($8,15 \pm 0,53$ nM/mg proteína) e 24 horas ($7,74 \pm 0,31$ nM/mg proteína) em relação ao grupo controle ($9,07 \pm 0,52$ nM/mg proteína) com $*p < 0,05$ grupo 6 horas e $*p < 0,01$ grupo 24 horas.

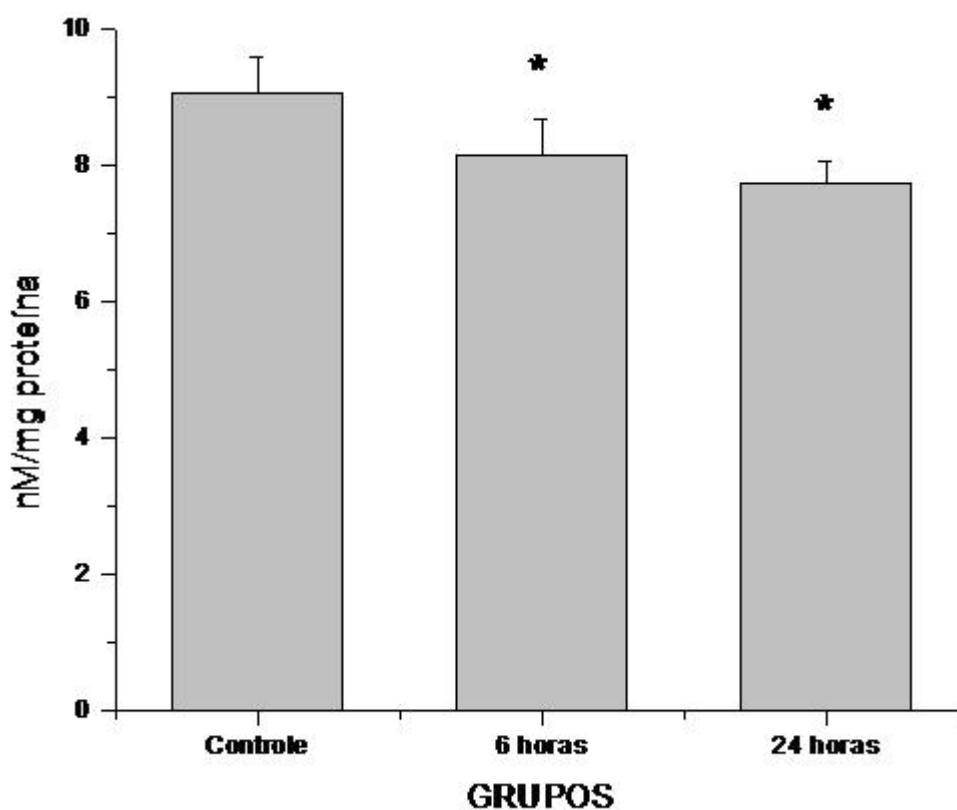


Figura 12 – Quantificação de PCs dos homogenatos da pele de camundongos irradiados. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Valores de p foram determinados pelos testes one-way ANOVA e Bonferroni como post hoc, são * $p < 0,05$ grupo 6 horas ($n=6$) e * $p < 0,01$ grupo 24 horas ($n=6$) quando comparado ao controle ($n=7$).

Os níveis de TRAP (figura 13) foram significativamente elevados no grupo 6 horas ($1,50 \pm 0,11 \mu\text{M}$ Trolox) e significativamente diminuídos no grupo 24 horas ($0,86 \pm 0,04 \mu\text{M}$ de Trolox), comparados ao grupo controle ($1,18 \pm 0,06 \mu\text{M}$ Trolox) com * $p < 0,05$. A diferença entre os grupos experimentais mostrou significativa com # $p < 0,01$.

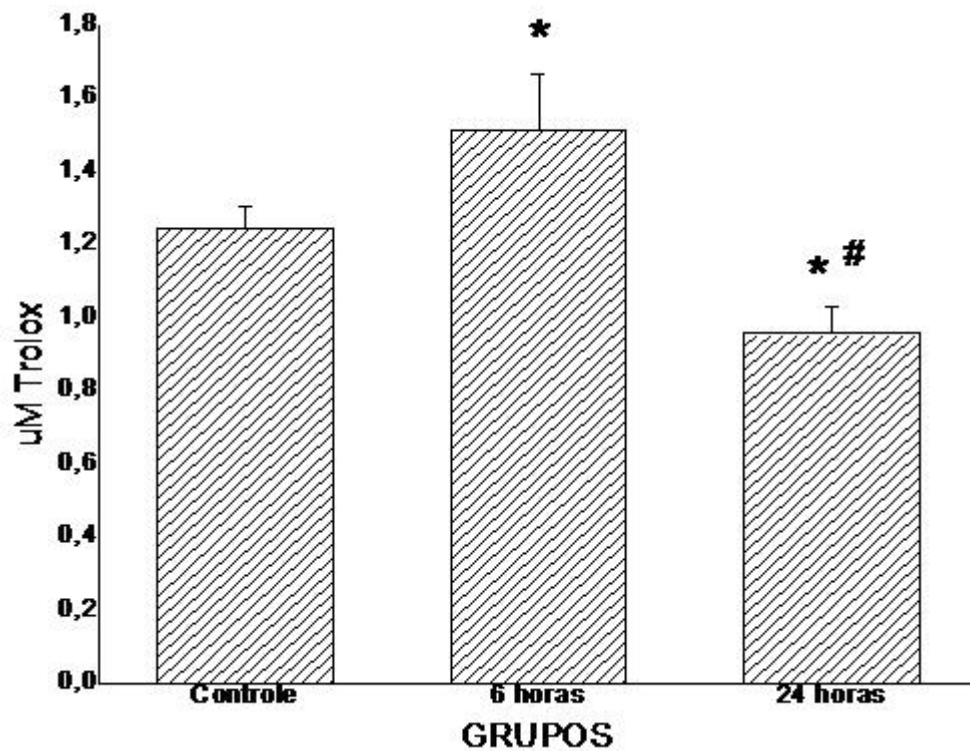


Figura 13 – TRAP dos homogenatos da pele de camundongos irradiados. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Valores de p foram determinados pelo test one-way ANOVA e Bonferroni como post hoc, são: * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (n=8); # $p < 0,01$ comparado ao grupo 6 horas (n=8); (grupo 24 horas n=6).

A atividade da SOD (figura 14) apresentou um aumento significativo no grupo 6 horas ($1,34 \pm 0,09$ USOD/mg proteína) com * $p < 0,01$, enquanto que não houve nenhuma diferença no grupo 24 horas ($0,92 \pm 0,05$ USOD/mg proteína) comparados ao grupo controle ($0,95 \pm 0,06$ USOD/mg proteína). A diferença entre os grupos experimentais mostrou significativa com # $p < 0,05$.

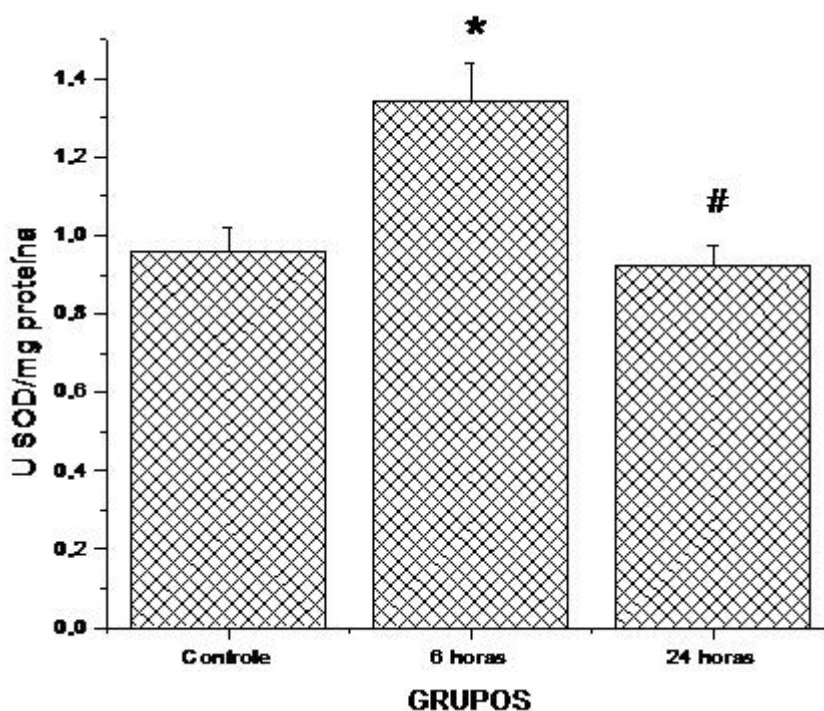


Figura 14 – Atividade da SOD nos sobrenadantes da pele de camundongos irradiados. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Valores de p foram determinados pelo test one-way ANOVA e Bonferroni como post hoc, * $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (n=12) e # $p < 0,05$ comparado ao grupo 6 horas (n=6 para os grupos irradiados).

A atividade da CAT (figura 15) diminuiu significativamente no grupo 24 horas ($0,27 \pm 0,01$ abs/mg proteína) com * $p < 0,01$, enquanto que não se observou diferença no grupo 6 horas ($0,38 \pm 0,02$ abs/mg proteína), comparados ao grupo controle ($0,39 \pm 0,01$ abs/mg proteína). A diferença entre os grupos experimentais mostrou significativa com # $p < 0,01$.

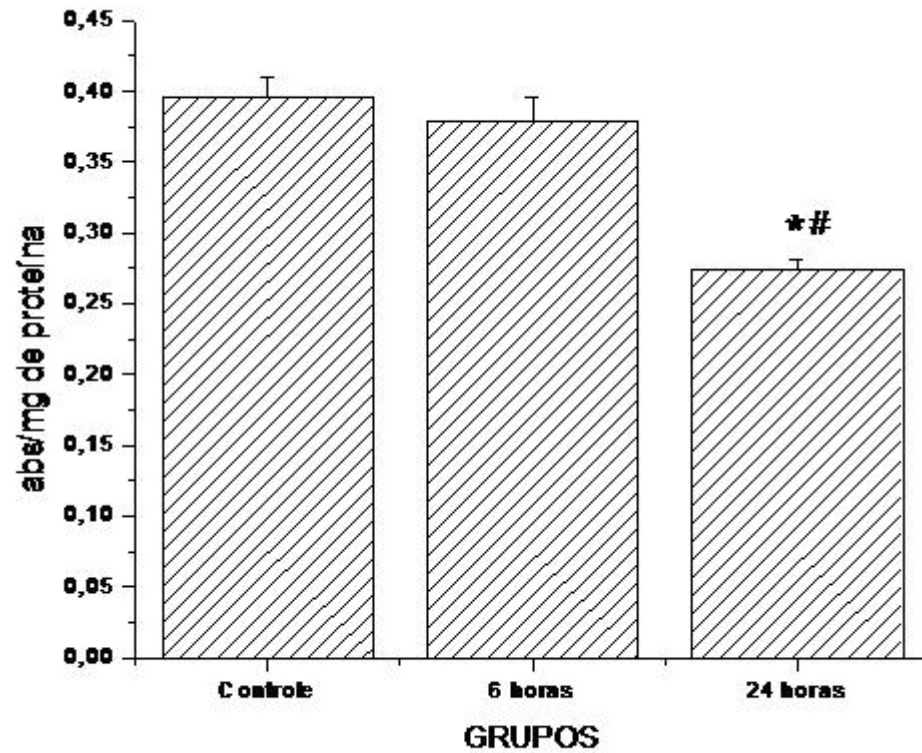


Figura 15 – Atividade da Catalase nos sobrenadantes de pele de camundongos irradiados. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Valores de p foram determinados pelo test one-way ANOVA e Bonferroni como post hoc, * $p < 0,001$ comparado ao grupo controle (n=16); # $p < 0,001$ comparado ao grupo 6 horas (n = 7) e grupo 24 hs (n = 8).

5 DISCUSSÃO

A pele está continuamente exposta a agentes químicos, físicos e microbiológicos muitos dos quais induzem a formação de EROs e ERNs, portanto sujeita ao estresse oxidativo (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; BICKERS; ATHAR, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O estresse oxidativo é conhecido como um desequilíbrio entre a produção EROs e ERNs e as defesas antioxidantes, podendo resultar tanto na diminuição destas defesas quanto no aumento da formação de espécies reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A radiação por UVB é o agente físico mais descrito capaz de induzir uma série de eventos na pele, induzindo lesão celular, através da formação de radicais livres, podendo ocorrer lesões cancerígenas e pré-cancerígenas, envelhecimento e processos inflamatórios (ARMSTRONG; KRICKER, 2001; BICKERS; ATHAR, 2006).

O modelo experimental onde camundongos são submetidos à dose aguda por UVB, foi utilizado neste estudo, para verificar as alterações morfológicas, no sistema antioxidante e o estresse oxidativo na pele provocado pela irradiação, que resultam nos danos extensivamente descritos na pele. O ensaio foi realizado com camundongos swiss tricotomizados, conforme outros autores (TRON et al., 1998; LU et al., 2004; GORMAN et al., 2005; SCHIRATO et al.; 2006).

De acordo com análise macroscópica da pele dos camundongos submetidos à dose aguda de $2,98\text{J}/\text{cm}^2$ de UVB, foi suficiente para provocar eritema que pode ser observado após 6hs e 24 hs da irradiação (Figura 8). A dose utilizada é semelhante às doses em outros estudos (SHINDO; WITT; PACKER, 1993; PODDA et al., 1998; LEE et al., 2000; WELLER et al., 2003; MAGLIO et al., 2005; JIN et al., 2007).

Apesar do UVB representar somente 4% do total da radiação UV solar, pode provocar o avermelhamento da pele com conseqüente resposta inflamatória, (ARMSTRONG; KRICKER, 2001). Uma única exposição à irradiação por UVB em camundongos causa uma importante inflamação na pele, com conseqüente edema após 24hs de irradiação (KABASHIMA et al., 2007). As manifestações da exposição aguda ao UVB na pele incluem eritema, queimaduras, aumento da pigmentação com vasodilatação e edema local, com a migração de

macrófagos e neutrófilos, devido a liberação de citocinas pelos queratinócitos, caracterizando o processo inflamatório (SAIJA et al., 2000).

Kabashima et al. (2007), relataram que uma única exposição à radiação UVB (dose de 5 J/cm²) em camundongos tricotomizados causa uma importante inflamação na pele, com conseqüente edema após 24 horas de irradiação. A vasodilatação, depois da exposição à radiação UV, leva ao acúmulo de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e células T.

As células em apoptose na pele são chamadas de SBC ou células queimadas do sol (BICKERS; ATHAR, 2006). O aparecimento de SBC e a ruptura da integridade da epiderme foi observado na análise histológica, 6 e 24 horas após a irradiação, indicando uma alta atividade sinalizadora de morte celular (apoptose) de queratinócitos.

Apesar dos queratinócitos serem mais resistentes aos danos induzidos pelos UVB do que outras células, estes promovem uma cascata de eventos na células, devido a indução de diferentes vias de sinalização celular, levando a um processo inflamatório ou a apoptose (LU et al., 2004). Tron et al. (1998), descreveram que a apoptose nos queratinócitos, devida à irradiação por UVB, é dependente de p53, num mecanismo restrito para a população de queratinócitos

As EROs na pele, provocadas por UVB podem ser produzidas principalmente pela fotossensibilização, levando a produção de $\cdot\text{O}_2^-$ ou $^1\text{O}_2$ (MARTIN; BURCH, 1990; BICKERS; ATHAR, 2006) e pela resposta inflamatória, gerando uma série de espécies reativas, como $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, HOCl e possivelmente $\text{NO}\cdot$ (SHINDO; WITT; PACKER, 1993; BICKERS; ATHAR, 2006).

Todos os componentes celulares são susceptíveis a ação das espécies reativas do oxigênio, porém as membranas biológicas são as mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, podendo acarretar alterações na organização estrutural, funcional, enzimática e na permeabilidade das membranas celulares e morte celular (MELLO FILHO; HOFFMAN; MENECHINI, 1984; CECCHINI; ARUOMA; HALLIWELL; 1990).

Neste estudo, a peroxidação lipídica no tecido cutâneo foi determinada por um teste colorimétrico clássico (TBARS) e pela quimiluminescência (QL), iniciada por terc-butil hidroperóxido. Ambos os métodos têm sido frequentemente utilizados para a avaliação da lipoperoxidação em vários tecidos

(CECCHINI; ARUOMA; HALLIWELL,1990; FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991; OLIVEIRA; CECCHINI; 2000; BARBOSA et al., 2003). Embora as duas técnicas verifiquem a lesão oxidativa, não devem ser comparadas já que os produtos das reações avaliados por elas, são diferentes. A QL avalia a formação de lipoperóxidos lipídicos, o que acontece num primeiro momento da reação de oxidação da membrana (figura 16A), enquanto TBARS quantifica a presença de aldeídos de baixa massa molecular como o MDA, que ocorre após a formação de hidroperóxidos lipídicos (figura 16B).

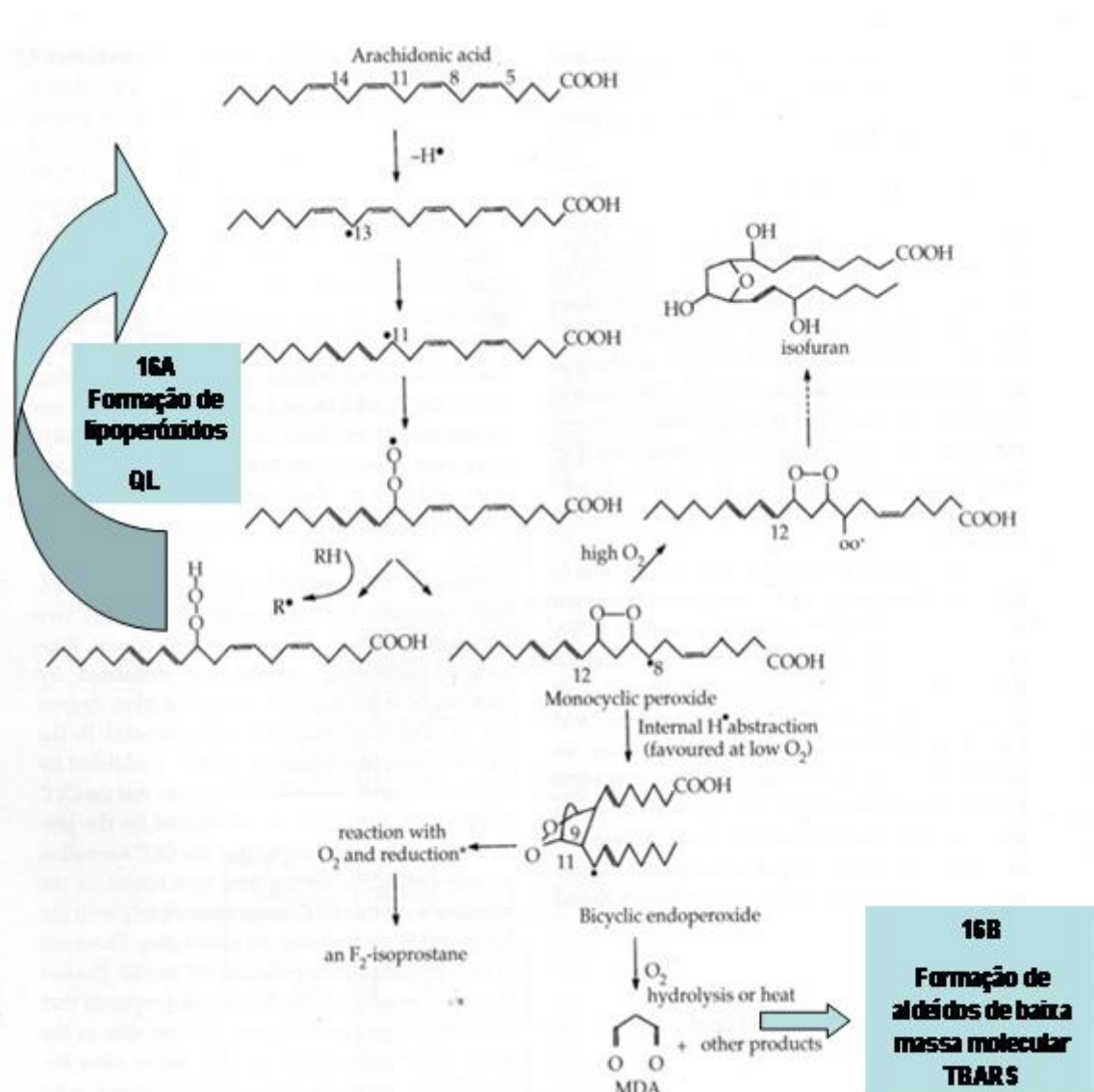


Figura 16 – Mecanismo de formação de lipoperóxidos de membrana e de aldeídos de baixa massa molecular como o MDA.

Fonte: Halliwell e Gutteridge (2007).

Além disso, quando ocorre lesão da membrana da célula, a formação de lipoperóxidos de membrana ou aldeídos de baixa massa molecular como o MDA, depende de alguns fatores, especialmente pela presença de agentes redutores como metais (Fe e Cu), de enzimas antioxidantes e da extensão da lesão (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Kitazawa e Iwasaki (1999), sugeriram que o Fe cutâneo catalisa a geração de radicais livres e a utilizaram um antioxidante quelador de Fe formado pelos aminoácidos glicina e L-serina conjugados com salicialdeído em cultura de fibroblastos expostos a uma dose aguda de irradiação por UVB, verificando a diminuição na formação de MDA.

A quantificação de lipoperóxidos de membrana analisados pela técnica da QL mostrou-se diminuído nas peles dos camundongos, removida após 6 horas da irradiação e aumentada nas peles dos animais, quando removidas após 24 horas e comparadas ao grupo controle.

A lesão oxidativa acumulativa medida através da técnica de TBARS, mostrou-se significativamente diminuída nos grupos 6 e 24 horas, quando comparadas ao grupo controle.

Maglio et al. (2005), num estudo realizado *in vivo* com dose aguda de $2,0 \text{ J/cm}^2$ de irradiação UVB, relatou uma diminuição de TBARS na pele, a partir de 6 horas até 24 horas, atribuindo ao óxido nítrico um efeito protetor contra a lipoperoxidação, estando de acordo com o estudo realizado por Lee et al. (2000) e com os resultados obtidos neste estudo.

Outras investigações utilizaram a técnica do TBARS como representante do dano lipoperoxidativo, porém a QL, mostrou-se um teste mais sensível (ZAMBURLINI et al., 1995a; ZAMBURLINI et al., 1995b), justamente por detectar os níveis de lipoperóxidos na pele, que ocorrem numa etapa que antecede a formação de aldeídos de baixa massa molecular (figura 16).

Os resultados sugerem portanto uma diminuição na formação de lipoperóxidos após 6 horas da irradiação por UVB, enquanto que após 24 horas houve aumento significativo na formação dos lipoperóxidos de membrana.

O TRAP avalia a capacidade antioxidante total e reflete o equilíbrio entre a ação conjunta de antioxidantes de baixo peso molecular e espécies oxidantes, portanto pode fornecer uma informação mais relevante do que a determinação da concentração isolada de um determinado antioxidante (GHISELLI; SERAFINI; NATELLA, 2000).

A capacidade antioxidante total do grupo 6 horas foi significativamente maior comparada ao grupo controle, assim como a SOD, indicando um aumento das defesas antioxidantes, embora a atividade da CAT, tenha permanecido inalterada. Jin et al., (2007), em seu estudo também observou um aumento da SOD uma hora após a dose de 4,5 J/cm² de irradiação UVB em cultura de queratinócitos. O aumento significativo da SOD pode ser atribuído pela produção de $\bullet\text{O}_2^-$, após 6 horas da irradiação. Mais detalhadamente os neutrófilos ativados por citocinas pró-inflamatória, geram $\bullet\text{O}_2^-$ (VINTEN-JOHANSEN, 2004). A SOD é uma enzima que pode ser induzida pelo aumento de produção de $\bullet\text{O}_2^-$, responsável por eliminar esta espécie reativa com conseqüente produção de H₂O₂. (KRUIDENIER et al, 2003a; KRUIDENIER et al, 2003b).

Segundo Kohen e Gati (2000), após a radiação UV ocorre ativação da enzima xantina oxidase resultando numa intensa produção de ácido úrico, que pode ser detectada na superfície da pele, podendo contribuir para o aumento do TRAP no grupo 6 horas, devido a capacidade do ácido úrico de proteger contra a lesão oxidativa, doando elétrons e atuando como um limpador (scavenger) de radicais livres (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

Os danos causados na pele pela formação de espécies reativas por UVB é altamente controlado pela rápida eliminação das EROs, atribuído ao mecanismo antioxidante eficiente da pele (KOHEN, 1999).

Portanto observou-se na pele de camundongos após 6 horas da irradiação aguda por UVB, aumento nos níveis de TRAP e atividade da SOD, diminuição dos níveis de QL, MDA e PCs, indicando que as defesas antioxidantes da pele foram estimuladas pela irradiação e eficientes contra a lipoperoxidação (Figura 17).

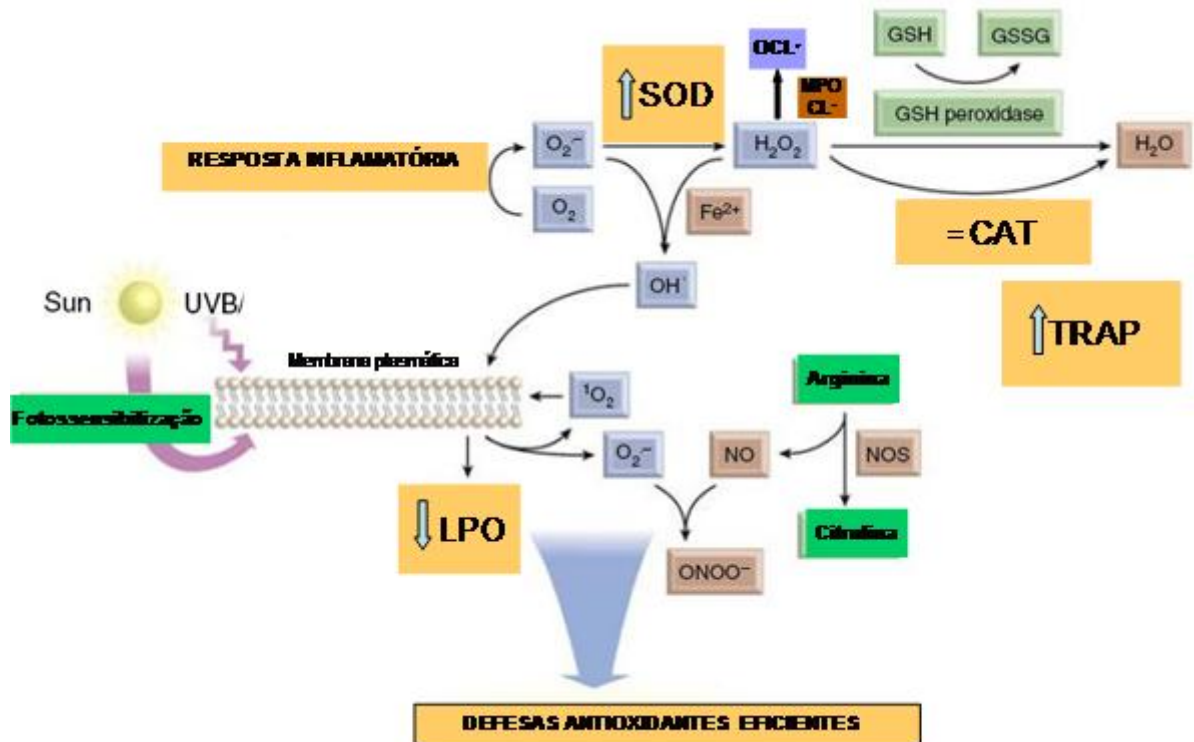


Figura 17 – Principais alterações observadas na pele de camundongos após 6 horas da irradiação aguda por UVB

Fonte: Adaptado Bickers e Athar (2006).

O mesmo não ocorreu no grupo 24 horas, mostrando diminuição significativa de TRAP, da atividade da CAT em relação ao controle e diminuição da atividade da SOD comparada ao grupo 6 horas e aumento significativo da QL, portanto as defesas antioxidantes foram consumidas e insuficientes para impedir o estresse oxidativo (Figura 18), embora os valores de TBARS e PCs tenham diminuído. A diminuição das PCs pode ser explicada se considerarmos o fato de se tratar de pele de camundongo jovem, capaz de remover proteínas oxidadas através do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (MERKER; SITTE; GRUNE, 1999). Fibroblastos velhos são muito mais vulneráveis ao acúmulo de proteínas oxidadas depois de sofrerem estresse oxidativo e não são capazes de removê-las de modo tão eficiente quanto fibroblastos jovens o são (MERKER; SITTE; GRUNE, 1999).

Um outro fato a ser considerado é que a carbonilação de proteínas freqüentemente acompanha a formação de MDA, pois estes dois compostos formam adutos que têm sido associados ao câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), portanto a diminuição nos níveis de proteínas carbonílica e TBARS é concordante.

Além disso Podda et al. (1998), evidenciou em cultura de pele, aumento de proteínas carboniladas somente em altas doses de irradiação UVB/UVA (16,8 J/cm²), sendo que em doses menores (4,2 J/cm².e 8,4 J/cm²), permanecem inalteradas, estando de acordo com os dados obtidos neste estudo cuja dose de irradiação UVB foi 2,98 J/cm².

A diminuição significativa da atividade da CAT no grupo 24 horas é compatível com o aumento de SOD no grupo 6 horas, voltando aos valores basais após 24 horas e com o eritema observado (Figura 8), indicando uma resposta inflamatória com conseqüente produção de $\bullet\text{O}_2^-$ e formação de H_2O_2 após 6 horas da irradiação, o que explica a CAT estar sendo consumida. A CAT e a GPx são as principais responsáveis pela remoção de H_2O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O consumo da CAT pode, portanto resultar num excesso de H_2O_2 . Uma outra hipótese é que a CAT é destruída pela luz visível (CHENG; PARCKER, 1979), resultando também no excesso de H_2O_2 . Ademais, H_2O_2 reflete uma resposta aguda da pele pela exposição por UVB e pode ser gerado por queratinócitos ou infiltrado de neutrófilos (WEI et al., 2002). Desta forma H_2O_2 , além de provocar diretamente a lesão tecidual, poderia estimular a quimiotaxia de neutrófilos, ativar o linfócito T, induzir a expressão de moléculas de adesão ou outros mediadores pró-inflamatórios (KRUIDENIER et al, 2003a; KRUIDENIER et al, 2003b). Os neutrófilos ativados por citocinas pró-inflamatória, geram $\bullet\text{O}_2^-$, através de uma reação catalisada pela enzima NADPH oxidase. A SOD catalisa a dismutação do $\bullet\text{O}_2^-$ em H_2O_2 , a partir do qual podem ser gerados $\bullet\text{OH}$ e HClO . O $\bullet\text{OH}$ é produzido através de reação Haber-Weiss que requer Fe^{2+} , (VINTEN-JOHANSEN, 2004). Finalmente, as evidências experimentais mostradas neste estudo sugerem que o excesso de H_2O_2 é responsável pelo estresse oxidativo, observado após 24 horas da irradiação aguda por UVB (Figura 19).

Portanto o estresse oxidativo foi observado após 24 horas da irradiação, quando houve um consumo das defesas antioxidantes totais e um aumento na formação de hidroperóxidos lipídicos. Sugere-se que o modelo experimental que utiliza dose aguda por UVB, seja adequado desde que os testes elaborados com fármacos, levem em consideração o tempo de instalação do quadro de estresse oxidativo, após 24 horas de irradiação, já que após 6 horas os mecanismos antioxidantes cutâneo são eficientes.

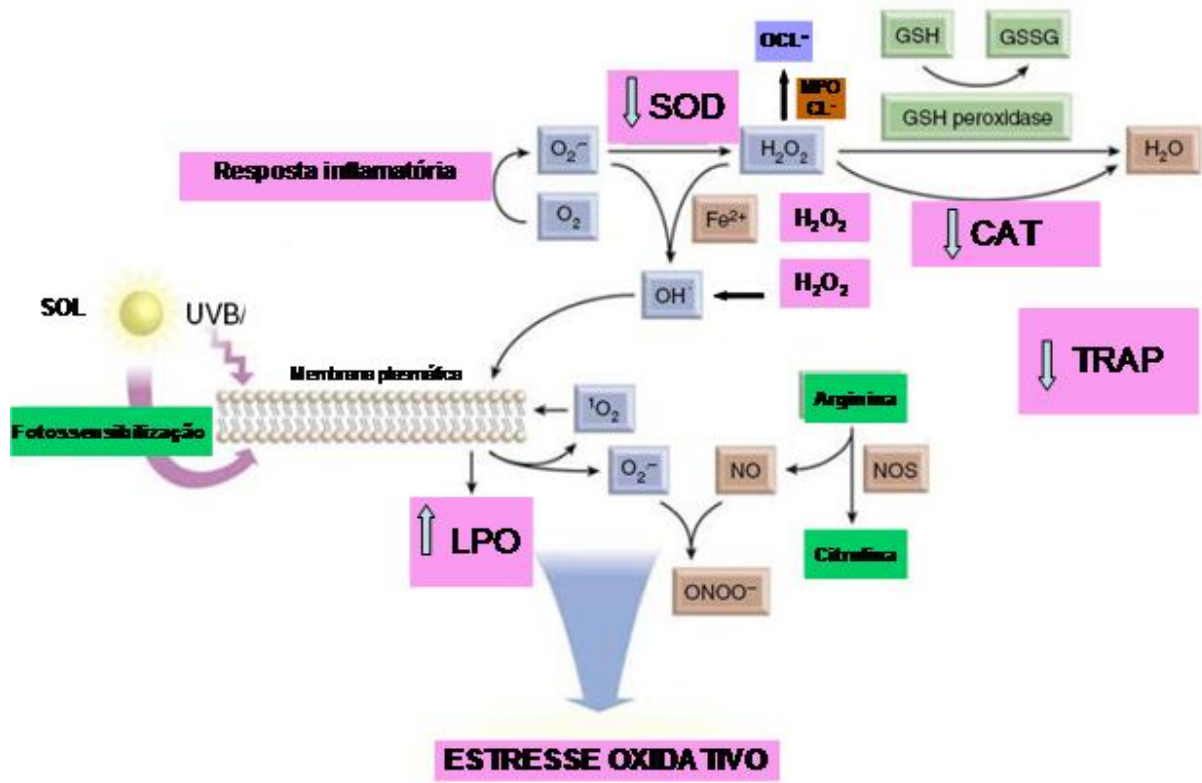


Figura 18 – Principais alterações observadas na pele de camundongos após 24 horas da irradiação aguda por UVB.

Fonte: Adaptado Bickers e Athar (2006).

6 CONCLUSÕES

Após 6 horas de irradiação aguda por UVB na pele de camundongos:

- Na análise macroscópica observou-se eritema e a análise morfológica mostrou leve desorganização da epiderme com aumento do número de SBCs, indicando atividade sinalizadora de morte celular de queratinócitos;
- Formação de hidroperóxidos lipídicos diminuiu, evidenciado pela queda na quimiluminescência;
- Diminuição nos níveis de TBARS, ou seja, de formação de aldeídos de baixa massa molecular (MDA);
- Houve queda significativa nos níveis de proteínas carbonílicas;
- O potencial antioxidante total aumentou;
- A atividade da SOD aumentou, enquanto a CAT permaneceu inalterada;
- Portanto, a redução na formação de lipoperóxidos ocorreu devido aos eficientes mecanismos antioxidantes enzimáticos e lipossolúveis da pele que foram estimulados pela irradiação UVB;

Após 24 horas de irradiação na pele de camundongos por UVB:

- Na análise macroscópica observou-se eritema e na morfológica maior ruptura da integridade da epiderme quanto comparada à pele do grupo 6 horas, com aumento do número de SBCs, indicando atividade sinalizadora de morte celular de queratinócitos;
- Formação de hidroperóxidos lipídicos aumentou;
- Diminuição nos níveis de TBARS (MDA);
- Houve queda nos níveis de proteínas carbonílicas;
- A capacidade antioxidante total diminuiu;
- Redução na atividade da SOD, comparada ao grupo 6 horas, voltando a valores basais;
- Redução na atividade da CAT;
- Portanto, o estresse oxidativo foi observado após 24 horas da irradiação quando houve aumento da formação de hidroperóxidos lipídicos

provavelmente pela formação de EROs, devido ao acúmulo de H_2O_2 , consequência da dismutação do $\bullet O_2^-$ pela SOD (aumentou após 6 horas da irradiação) e o consumo das defesas antioxidantes totais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que, quando submetida à lesão aguda por irradiação UVB, a pele possui capacidade antioxidante importante, capaz de impedir os efeitos lesivos de EROS. Entretanto, após 24 horas desta lesão aguda, com o consumo das defesas antioxidantes, já se pode evidenciar lesões cumulativas de lipídeos de membrana, com possível comprometimento da integridade da pele.

Tendo em vista que estudos ainda apontam o NO como possível causador ou protetor de danos oxidativos na pele, estudos complementares são necessários para se verificar a participação do NO neste modelo.

A presente pesquisa abre um novo caminho para intervenção com cosméticos para a pele.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, New York, v. 105, p. 121-126, 1984.

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.

ATHAR, M. Oxidative stress and experimental carcinogenesis. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 40, n. 6, p. 656-67, Jun. 2002.

AZUMA, H.; IKEBUCHI, K.; YAMAGUCHI, M.; MURAHASHI, H.; MOGI, Y.; SATO, N.; FUJIHARA, M.; HIRAYAMA, F.; IKEDA, H. Comparison of sensitivity to ultraviolet B irradiation between human lymphocytes and hematopoietic stem cells. **Blood**, New York, v. 96, n. 7, p. 2632-2634, Oct. 2000.

BARBOSA, D. S.; CECCHINI, R.; EL KADRI, M. Z.; RODRIGUES, M. A. M.; BURINI, R. C.; DICHI, I. Decrease oxidative stress in patients with ulcerative colitis. **Nutrition**, New York, v. 19, n. 10, p. 837-842, 2003.

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**, New York, v. 28, n. 12, p. 1143, Dec. 2002.

BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 126, n. 12, p. 2565-2575, Dec. 2006.

BISWAS, T.; PAL, J. K.; NASKAR, K.; GHOSH, D. K.; GHOSAL, J. Lipid peroxidation of erythrocytes during anemia of the hamsters infected with *Leshmania donovani*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v.146, n. 2, p. 99-105, May. 1995.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **The Biochemical Journal**, London, v. 134, n. 3, p. 707-716, Jul.1973.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R. M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Farmaco**, Pavia, v. 55, n. 88, p. 526-534, Aug. 2000.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JUNIOR, W. A.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology B**, Lausanne v. 84, n. 1, p. 21-27, Jul. 2006.

CECCHINI, R; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, 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.

CLYDESDALE, G. J.; DANDIE, G. W.; MULLER, H. K. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 79, p. 547–568, 2001.

COHEN, G.; DEMBIEC, D.; MARCUS, J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 34, p. 30-38, Mar. 1970.

CREMONESE, R. V.; PEREIRA-FILHO, A. A.; MAGALHAES, R. Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: technical modifications and lipoperoxidation effects. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 40-47. Jan. 2001.

CHENG, L. Y. L.; PACKER, L. Photodamage to hepatocytes by visible light. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 97, p. 124-128, 1979.

DELICONSTANTINOS, G.; VILLIOTOU, V.; STAVRIDES, C.J. Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes, **The Biochemical Journal**, London, v. 320, n. 3, p. 997-1003, Dec. 1996.

DELICONSTANTINOS, G.; VILLIOTOU, V.; STRAVRIDES, J. C. Release by UV-B radiation of NO from human keratinocytes: a potential role for NO in erythema production. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 114, n. 6, p. 1257-1265, Mar. 1995.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, Jan./Mar. 1997.

FISHER, G. J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S.; VOORHEES, J. J. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging”, **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 138, n. 11, p. 1462-1470, Nov. 2002.

FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicit: A radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 201, p. 1203-1209, Mar. 1998.

FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol-L-ascorbic acid and β -carotene en cutaneous photoprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25 p. 848-873, Nov. 1998.

FUCHS, J. V.; ZOLLNER, T. M.; KAUFMANN, R.; PODDA, M. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 30, p. 337-353, Feb. 2001.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 29, n. 11, p. 1106-1114, Dec. 2000.

GORMAN, S.; TAN, J. W. Y.; THOMAS, J. A.; TOWNLEY, S. L.; STUMBLES, P. A.; FINLAY-JONES, J. J.; HART, P. H. Primary defect in UVB-induced systemic immunomodulation in regional lymph nodes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Haugue v. 174, p. 6677-6685, 2005.

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

GUTTERIDGE, J. M.; ROWLEY, D. A.; HALLIWELL, B.; COOPER, D. F.; HEELEY, D. M. Copper and iron complexes catalytic for oxygen radical reactions in sweat from human athletes. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 145, n. 3, p. 267-273. Feb. 1985.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford, 2007.

HARRIS, M. I. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 2. ed. São Paulo: SENAC, 2005, 238p.

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**. Bethesda, 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 responsive NF- κ B transcription factor in mouse cardiac muscle. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 28, n. 3, p. 487-498, Mar. 1996.

HIROYUKI, Y.; HIROMU, S. Chemiluminescent Detection and Imaging of Reactive Oxygen Species in Live Mouse Skin Exposed to UVA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 269, n. 1, p. 131-136, Mar. 2000.

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, Limerick, v. 189, n. 1, p. 21-39, Jul. 2003.

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, Nov. 2000.

JENTZSCH, A. M.; BACHMANN, H.; FURST, P.; BIESALSKI, H. K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, n. 2, p. 251-256, 1996.

JIN, G. H.; LIU, Y.; JIN, S. Z.; LIU, X. D.; LIU, S. Z. UVB induced oxidative stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents. **Radiation and Environmental Biophysics**, Berlin, v. 46, n. 1, p. 61-68, Mar. 2007.

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

KIRCHHOFF, V. W. J. H.; ECHER, E.; LEME, N. P.; SILVA, A. A. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. **Revista Brasileira de Geografia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 63-74, Mar. 2000.

KITAZAWA, M.; IWASAKI, K. Reduction of ultraviolet light-induced oxidative stress by amino acid-based iron chelators. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1473, n. 2-3, p. 400-408, Dec. 1999.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and 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**, Limerick, 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**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 103-123, Mar. 1997.

KROKAN, H. E.; STANDAL, R.; SLUPPHAUG, G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. **The Biochemical Journal**, London, v. 325, p. 1-16, Jul. 1997.

KRUIDENIER, L.; KUIPER, I.; LAMERS, C. B.; VERSPAGET, H. W. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization and association with mucosal antioxidants. **The Journal of Pathology**, Sussex, v. 201, n. 1, p. 28-36, Sep. 2003b.

KRUIDENIER, L.; KUIPER, I.; VAN DUIJN, W.; MIEREMET-OOMS, M. A. C.; VAN HOGEZAAND, R. A.; LAMERS, C. B. H. W.; VERSPAGET, H. W. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. **The Journal of Pathology**, Sussex, v. 201, n. 1, p. 17-27, Sep. 2003a.

KUHN, A.; FHSEL, K.; LEHMANN, J.; KUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Aberrant Timing in Epidermal Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase After UV Irradiation in Cutaneous Lupus Erythematosus. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 111, p. 149-153, Jul. 1998.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia**: bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KVAM, E.; DAHLE, J. Pigmented Melanocytes Are Protected Against Ultraviolet-A-Induced Membrane Damage. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 121, n. 3, p. 564-569, Sep. 2003.

LEE, S. C.; LEE, J. W.; JUNG, J. E.; CHUN, S. D.; KANG, I. K.; WON, Y. H.; KIM, Y. P. Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid peroxidation in ultraviolet B-irradiated skin. **British Journal of Dermatology**, London, v. 142, n. 4, p. 653-659, Apr. 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.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. S.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.

LU, Y. P.; LOU, Y. R.; PENG, Q. Y.; XIE, J. G.; CONNEY, A. H. Stimulatory effect of topical application of caffeine on UVB-induced apoptosis in the epidermis of p53 and bax knockout mice. **Cancer Research**, Baltimore, v. 64, p. 5020-5027, Jul. 2004.

MAGLIO, D. H. G.; PAZ, M. L.; FERRARI, A.; WEILL, F. S.; CZERNICZYNIEC, A.; LEONI, J.; BUSTAMANTE, J. Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, Copenhagen, v. 21, n. 6, p. 311-317, Dec. 2005.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 47, p. 469-474, Jun. 1974.

MARTIN, J. P.; BURCH, P. Production of oxygen radicals by photosensitization. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 635-645, 1990.

MATSUBARA, L. S.; MACHADO, P. E. A. Age-related changes of glutathione content, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 5, p. 449-454, 1991.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEHINI, 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.

MERKER, K.; SITTE, N.; GRUNE, T. Hydrogen peroxide-mediated protein oxidation in young and old human MRC-5 fibroblasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 375, n. 1, p. 50-54, Mar. 2000.

MILLER, G. L. Protein determination for large number of samples. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 5, p. 964, may. 1959.

MORÊTE, A. C; RODRIGUES, J. C. C; PINTO, J. F. Fotoproteção. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, Lisboa, v. 4, n. 9, p. 331-336, Jan. 2002.

OHKAWA, H.; NOBUKO, O.; YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 95, p. 351, 1979.

OLIVEIRA, F. J. D. A.; CECCHINI, R. Oxidative stress of liver in hamster infected with *Leishmania (L) chagasi*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, p. 1067-1072, 2000.

PARRISH, J. A; WHITE, H. A. D; PATHAK, M. A. Photomedicine. In: FITZPATRICK T. B. (Ed.). **Dermatology in general medicine**. New York: McGraw-Hill Book, 1979. p. 942-994.

PODDA, M.; TRABER, M. G.; WEBER, G.; YAN, L. J.;PACKER, L. Uv-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 24, n. 1, p. 55-65, Jan. 1998.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M. L. G.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LIESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 255, p. 107-117, Nov. 1996.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, New York, v. 233, p. 357-63, 1994.

ROVER, L. J.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, Jan. 2001.

SAIJA, A.; TOMAINO, D.; TROMBETTA, A.; DE PASQUALE, A.; UCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 199, p. 39-47, Apr. 2000.

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. **Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 117, n.6, p.1412-1420, Dec. 2001.

SCOTTI, L., SCOTTI, 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, Apr. 2007.

SCHIEKE, S. M.; RUWIEDEL, K.; GERS-BARLAG, H.; GREYER-BECK, S.; KRUTMANN, J. Molecular crosstalk of the ultraviolet A and ultraviolet B signaling responses at the level of mitogen-activated protein kinases. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 124, p. 857-859, 2000.

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; LIMA FILHO, J. L.; LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 149-154, Jan. 2006.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Anti-oxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis their responses to ultraviolet light. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 100, n. 3, p. 260-265, Mar. 1993.

SLOMINSKI, A.; PISARCHIK, A.; SEMAK, A.; SWEATMAN T.; WORTSMAN, J.; SZCZESNIEWSKI, A.; SLUGOCKI, G.; MUCNULTY, J.; KAUSER, B.; TOBIN, D. J.; JING, C.; JOHANSSON, O. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 16, n. 8, p. 896-908, Jun. 2002.

TRON, V. A.; TROTTER, M. J.; TANG, L.; KRAJEWSKA, M.; REED, M. J. C.; HO, V. C.; LI, G. p53-Regulated Apoptosis Is Differentiation Dependent in Ultraviolet B-Irradiated Mouse Keratinocytes. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 153, n. 2, p. 579-585, Aug. 1998.

TYRRELL, R. M. Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight - from models to reality. **BioEssay**, Cambridge, v. 18, n. 2, p. 139-148, 1996.

VINTEN-JOHANSEN, J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, London, v. 61, n. 3, p. 481-497, Feb. 2004.

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

WELLER, R.; SCHWENTKER, A.; BILLIAR, T. R.; VODOVOTZ, Y. Autogenous nitric oxide protects mouse and human keratinocytes from ultraviolet B radiation-induced apoptosis. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, Washington, v. 284, n. 5, p. 1140-1148, May. 2003.

WHEELER, L. A.; ASWAD, A.; CONNOR, M. J.; LOWE, N. Depletion of cutaneous glutathione and the induction of inflammation by 8-methoxypsoralen plus UVA radiation. **Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 87, p. 658-662, Nov. 1986.

WIDYARINI, S.; DOMANSKI, D.; PAINTER N.; REEVE, V. E. Estrogen receptor signaling protects against immune suppression by UV radiation exposure. **Proceeding National Academic Science**, Washington, v. 103, n. 34, p. 12837-12842, Aug. 2006.

WIDYARINI, S.; SPINKS, N.; HUSBAND, A. J.; REEVE, V. E. Isoflavonoid compounds from Red Clover (*Trifolium pretense*) protect from inflammation and immune suppression induced by UV radiation. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 74, n. 3, p. 465-470, Sep. 2001.

YASUI, H.; SAKURAI, H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 269, n. 1, p.131-136, 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.

ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M.; BARBERA, P.; PASTORINO, A. M.; ROVERI, A.; COMINACINI, L.; URSINI, F. Measurement of lipid hydroperoxides in plasma lipoproteins by a new highly-sensitive photon counting luminometer. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1256, n. 2, p 233-240, May 1995b.

ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M.; BARBERA, P.; ROVERI, A.; URSINI, F. Direct measurement by Single Photon Counting of Lipid Hydroperoxides in Human Plasma and Lipoproteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 232, n. 1, p. 107-113, Nov. 1995a.

ZENISEK, A.; KRAHL, J. A. The occurrence of urocanic acid in sweat. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 12, p. 479-484, Nov. 1953.