



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JEAN LUCAS KREMER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CITRAL
SOBRE O CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA INDUZIDO
POR IRRADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS *HAIRLESS***

JEAN LUCAS KREMER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CITRAL
SOBRE O CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA INDUZIDO
POR IRRADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS *HAIRLESS***

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Kremer, Jean Lucas.

AVALIAÇÃO DO EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CITRAL SOBRE O CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA INDUZIDO POR IRRADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS HAIRLESS / Jean Lucas Kremer. - Londrina, 2016.

69 f. : il.

Orientador: Rodrigo Cabral Luiz.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Câncer de pele não melanoma - Teses. 2. Radiação Ultravioleta - Teses. 3. citral - Teses. 4. estresse oxidativo - Teses. I. Luiz, Rodrigo Cabral. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

JEAN LUCAS KREMER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CITRAL SOBRE O
CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA INDUZIDO POR IRRADIAÇÃO
UVB EM CAMUNDONGOS *HAIRLESS***

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Poliana Camila Marinello
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 01 de Abril de 2016.

Dedico a meus pais, Walter e Sidnéia, que são meus grandes exemplos de caráter e trabalho, e ao meu irmão Pablo. Juntos somos família, amor, coragem e sustento. A força que me impulsiona a seguir meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, saúde e inspiração para que eu pudesse já criança me interessar pelos estudos, e hoje poder estar concluindo esta etapa importante da minha vida.

Agradeço a meus pais pela minha criação, educação e valores, e pela força, incentivo e suporte, ao meu irmão Pablo pela ajuda e companheirismos e a todos familiares (avós, tios, primos) que em muitos momentos compreenderam minha ausência e hoje participam comigo desta conquista.

Agradeço aos meus amigos (Karla Fernanda Ferraz; Gabriella Melo, Thâmara Alves, Laís Sabio, Iriana Morato, Heloísa Boldrini, Thamara Nashida, Poliana Camila Marinello, Fernanda Paschoal Blegniski, Fernando Borges, Larissa Sanches, Ana Carolina Rossaneis, Renan Veras, Neucimara Rodrigues Ribeiro, Ana Camila Jardim, Jaqueline Dionísio) e outros tantos não citados, porém não menos importantes, pela amizade, ajuda e ensinamentos durante o decorrer dos estudos e também por me compreenderem quando tantas vezes eu estive mais distante.

Agradeço aos técnicos do laboratório Pedro Sebastião Dionísio e Jesus Antônio Vargas, primeiro de tudo pela amizade e companheirismo e depois pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade em me ajudar em cada momento com seus conhecimentos e experiências.

Agradeço de modo especial ao Pedro Sebastião Dionísio pelo convite a participar do grupo de leitura e oração com os amigos do departamento, grupo este que me deu muito apoio nas terças e quintas feiras ao longos desses 2 anos.

Agradeço aos professores: Dra Alessandra L. A. Cecchini, Dr. Rubens Cechini, Dr. Jair Tonon, Dr. Waldiceu A. V. Junior, Dra Carolina Panis, pela contribuição especial dado ao trabalho.

Por fim agradeço especialmente ao meu orientador professor Dr. Rodrigo Cabral Luiz, pela oportunidade, disponibilidade e confiança, e aproveito para deixar registrado minha admiração pelo seu trabalho.

KREMER, Jean Lucas; LUIZ, Rodrigo Cabral. **Avaliação do efeito quimioprotetor do citral sobre o câncer de pele não melanoma induzido por irradiação uvb em camundongos *hairless***. 2016. 69f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O câncer de pele não-melanoma (CPNM) é a neoplasia mais comum na população humana. A radiação UVB (290-320nm) penetra a epiderme e é diretamente absorvida pelo DNA, induzindo mutações, ativando vias inflamatórias e promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo o principal agente carcinogênico para o câncer de pele. O CPNM é dividido em duas formas principais, o carcinoma de células basais e o carcinoma de células escamosas, ambos são derivados de queratinócitos epidérmicos e desenvolvem-se nas áreas da pele mais expostas à luz ultravioleta (UV). A melhor maneira de prevenção é evitar queimaduras solares, controlando o tempo de exposição ao sol e com o uso de bloqueadores solares. Recentemente novas abordagens tem proposto o uso de produtos naturais seja por aplicação tópica ou via oral. O citral é um óleo essencial, composto por uma mistura de isômeros neral (cis) e geranial (trans), naturalmente encontrado em algumas plantas como o capim-limão (*Cymbopogon citratus*). Apresenta forte aroma de limão, e por isso é utilizado na indústria como aromatizante alimentício e cosmético. Em modelos *in vitro*, tem demonstrado propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitária e efeitos anticarcinogênicos. O presente trabalho avaliou a atividade quimioprotetora do citral no CPNM, afim de elucidar os mecanismos envolvidos neste efeito. Nós utilizamos camundongos *hairless* (sem pêlos) HRS/J, machos, de 8-12 semanas de idade, com peso entre 25-32g, desvermifugados e mantidos sob condições específicas. O protocolo de indução da carcinogênese da pele por radiação UVB, teve duração de 24 semanas, e foi dividido em fase de iniciação, descanso e fase de promoção. A irradiação foi realizada em uma câmara de irradiação com uma lâmpada fluorescente PHILLIPS TL / 12 40W UVB. A dose de radiação acumulada foi de 13,875 J/cm². Os grupos foram tratados com citral em diferentes concentrações (0,1, 0,5 e 1%), tendo como base o gel carbopol 940, aplicado a uma dosagem de 0,1 g/animal, 5 minutos após a exposição UVB. Foram avaliados o número e tamanho das lesões cutâneas, avaliação histológica (H&E) da pele, parâmetros de estresse oxidativo cutâneo (capacidade antioxidante total, atividade da catalase e malondialdeído na pele), apoptose e citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-23, TNF- α , INF γ e IL-10). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, usando o One-way ANOVA seguido pelo teste Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. O grupo controle irradiado apresentou câncer de pele na 20^o semana. No grupo irradiado e tratado com citral 1% nós observamos apenas queratose actínica. Citral 1% foi capaz de diminuir os parâmetros de estresse oxidativo e inflamação, além de aumentar o número de células apoptóticas. Os resultados demonstram que o citral atua na quimioproteção da pele impedindo o desenvolvimento do CPNM pela ação da radiação UVB, através de mecanismos da ação antioxidante e anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Câncer de pele não melanoma. Citral. Estresse oxidativo. Inflamação. Radiação Ultravioleta.

KREMER, Jean Lucas; LUIZ, Rodrigo Cabral. **Quimioprotect effects evolution citral uvb-induced non-melanoma skin cancer hairless mice.** 2016. 69p. Dissertation. (Master in Experimental Pathology) - States University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Non-melanoma skin cancer (NMSC) are the most common malignancies of humans. The radiation UVB (290-320nm) penetrates the epiderm and is directly absorbed by DNA, inducing DNA-mutations, inflammation, and reactive oxygen species (ROS), therefore represent major causative factor for skin cancer. The two major forms of NMSC are basal cell carcinomas and squamous cell carcinoma, both are derived from epidermal keratinocytes, and develop in the skin areas most exposed to ultraviolet (UV). The best way to prevent skin cancer is preventing sunburn by controlling the time of sun exposure, and use of the sunblocks. Recently new approaches for skin cancer prevention has been proposed, including natural products that could be ingested or applied to the skin. Citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal) is a naturally occurring aliphatic aldehyde of the terpene series and is an isomeric moisture of geranial and neral, is a key component of essential oils extracted from several herbal plants such as lemon grass (*Cymbopogon citrates*) and is used as food additive and as a fragrance in cosmetic industry. It is devoid of mutagenic effect on *in vitro* models, has antibacterial, antifungal, antiparasitic, and anticancer effects, but can be a skin sensitizer according to used concentration. The aim of the present work was to evaluate the chemoprotective activity of citral on NMSC, elucidating the mechanisms involved in this effect. We used hairless mice HRS/J, male, 8-12 weeks old, weighing 25-32g, dewormed and under standard conditions. UVB-induced skin carcinogenesis protocol by 24 weeks, divided in initiation phase, rested and promotion phase, using an irradiation chamber with a PHILLIPS TL/12 40W UVB fluorescent lamp. Cumulative radiation dose was 13.875 J/cm². Groups were citral treatment in carbopol 940 gel with different concentrations (0.1, 0.5 and 1%), at a dosage of 0.1 gram/animal, 5 min after UVB exposure. We evaluated the number and size of lesions and histological evaluation (H & E), oxidative stress parameters in the skin (Total radical-trapping antioxidant parameter, catalase activity and malondialdehyde), Apoptosis was assayed by TUNEL, cytokine measurement (IL-1 β , IL-4, IL-23, TNF- α , INF γ and IL-10). Statistical results were expressed as mean \pm standard deviation, using the One way ANOVA followed by t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Irradiated UVB was able to developed skin cancer in irradiated control. In citral 1% we observed only actinic keratosis. The results showed that citral 1 % was able to decrease stress oxidative parameters and inflammation that result in protection against induced-UVB skin cancer.

Keywords: Skin cancer non-melanoma. Citral. Oxidative stress. Radiation ultraviolet. inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Ilustração das camadas da epiderme e suas células características.....15
- Figura 2 -** Radiação solar. A absorção dos raios UV na pele varia de acordo com o espectro da luz solar, dividido em UVA (312-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-280 nm)17
- Figura 3 -** (A) Foto apresentando as características macroscópicas do carcinoma basocelular. (B) Fotomicrografia (400X) do corte histológico corado com hematoxilina e eosina, demonstrando a proliferação de células basalóides indiferenciadas provindas da camada basal da epiderme que invadem a derme, apresentando arranjo em paliçada (seta amarela).....21
- Figura 4 -** Queratose Actínica Hipertrófica. (A) Lesão macroscópica na pele. (B) Corte histológico H&E (400x). Epiderme hipertrófica com queraticítos atípicos, espessamento da camada córnea. (C) Corte histológico H&E (100x) carcinoma espinocelular “in situ”. Alterações citológicas com características de malignidade (hipercromatismo, pleomorfismo, mitoses) e perda da arquitetura do tecido, porém retidos a epiderme. (D) Corte histológico H&E (100x) carcinoma espinocelular, composto por células com núcleos grandes e pleomórficos, organizadas em agregados com formas variadas e que invadem a derme com queratinização (pérola córnea) apontada pela seta. (E) aspecto macroscópico do carcinoma espinocelular em paciente antes da remoção cirúrgica.23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

• OH	Radical hidroxil
• O ²⁻	Ânion superóxido),
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATR	serina / treonina-cinase
ARE	Elemento de resposta antioxidante
Bax	Proteína X associada ao BCL2
Bcl-2	LLC das células –B / linfoma 2
CA	Câncer
CPNM	Câncer de pele não melanoma
CAT	Catalase
CBC	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
Fe	Ferro
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GT	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
GSTA2	Glutationa S tranferase A2
GCLy	Glutamato cisteína ligase
GADD45	Detenção crescimento e danos DNA gama
HO	Heme oxigenase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IκB	Inibidor Kappa B
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
IL- 23	Interleucina 23
IFN γ	Interferon gama
Keap1	proteína associada a ECH 1

LOO●	Radical peroxil
LO●	Radical alcoxil
MAF	Proteína oncogênica
MDA	Malondialdeído
NFκB	Fator nuclear de transcrição Kappa B
<i>Nrf2</i>	Fator relacionado ao fator nuclear eritróide 2
NK	Células assassinas naturais
NO	Óxido nítrico
NQO1	(NAD(P)H: Quinona Oxidoreductase 1
O ²	Oxigênio singlet
p53	Proteína citoplasmática de massa molecular 53 kDa
p21	Proteína regulatória do ciclo celular
pRB/E2F	Fator de transcrição associado a proteína do retinoblastoma
PGE2	Prostaglanida E2
Rad3	Proteína de reparo DNA helicase
SOD	Superóxido desmutase
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
TUNEL	Terminal desoxinucleotidilo transferase dUTP rotulagem final Nick
TRAP	Parâmetro antioxidante radical total
<i>TP53</i>	Gene que produz a proteína citoplasmática de massa molecular 53 kDa
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Histologia da Pele	13
1.1.1	Particularidades da epiderme	14
1.2	Carcinogênese da Pele	16
1.2.1	Radiação ultravioleta	16
1.3	Câncer de Pele Não Melanoma	20
1.3.1	Carcinoma basocelular	20
1.3.2	Carcinoma espinocelular	21
1.4	Prevenção	23
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Geral	27
3.2	Específicos.....	27
4	CONCLUSÃO	28
5	REFERÊNCIAS	29
	APÊNDICES	38
	APÊNDICE A - Artigo Científico	39
	ANEXOS	68
	ANEXO A - Carta de Aprovação do Comitê de Ética	68

1 – INTRODUÇÃO

O câncer de pele apresenta incidência em todo o mundo segundo a Organização Mundial da Saúde (2015), e os números de casos diagnosticados têm aumentado nas últimas décadas. Atualmente, entre 2-3 milhões de casos de câncer de pele não melanoma (CPNM) acontecem de forma crescente globalmente todos os anos. Um a cada três pacientes diagnosticados com câncer, apresenta a neoplasia de pele, e de acordo com a estatística da Fundação Câncer de Pele, um a cada cinco norte-americanos desenvolve câncer de pele em algum momento de sua vida (INCA, 2014). O aumento da incidência das neoplasias de pele está diretamente relacionado com o envelhecimento da população e com a exposição crônica a radiação solar. Além disso, pode estar relacionado com o comportamento da população melhor instruída a procurar atendimento médico para lesões e sintomas que estão associados à doença (INCA, 2014; NCI, 2014).

De um modo geral os cânceres de pele são subdivididos em melanoma e não melanoma. No CPNM encontram-se o carcinoma basocelular (CBC), originado a partir dos queratinócitos da camada basal do epitélio, e o carcinoma espinocelular (CEC) ou epidermóide, originado a partir dos queratinócitos da camada espinhosa. No Brasil o CPNM é o mais frequente e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014). Para 2016 a estimativa fica em aproximadamente 175.000 novos casos (INCA, 2016). Estes tipos de tumores malignos geralmente possuem um bom prognóstico e chances elevadas de cura. No entanto eles ainda representam impacto econômico para os serviços de saúde, uma vez que o tratamento é feito com remoção cirúrgica da lesão de inúmeros pacientes (MARTINEZ *et al.*, 2006; WOLFF *et al.*, 2007). Além disso, quando diagnosticado tardiamente pode resultar em grande impacto psicológico sobre a auto-estima do paciente, devido a localização e extensão da cirurgia (STAPLES; ELWOOD; BURTON, 2006).

Devido a alta incidência e número crescente de casos, surgiu a necessidade de medidas preventivas sobre o CPNM. Até o momento as medidas preventivas propostas são relacionadas com o controle do tempo e período de exposição solar e o uso de protetores e bloqueadores solares, uma

vez que a irradiação ultravioleta solar é o principal fator de risco para estes cânceres (ARMSTRONG; KRICKER, 2001). Atualmente, novas abordagens, que envolvem a ingestão ou uso tópico de substâncias com outros mecanismos que não envolvem a proteção contra a irradiação UV têm sido estudadas. Alguns exemplos são retinóides, difluorometilornitina, antioxidantes polifenólicos (ex. epigallocatequina galato, encontrados no extrato de chá verde), silimarina, isoflavona genisteína, medicamentos anti-inflamatórios não esteróides, curcumina, licopeno, vitamina E, betacaroteno e selênio, e muitos destes estão presentes em formulações tópicas e orais disponíveis à população (WRIGHT; SPENCER; FLORES, 2006). Não há estudos com produtos que possam ser aplicados após a exposição a radiação solar, e que ofereça uma proteção frente ao dano causado por esta na pele. Por este motivo, o presente trabalho avaliou o potencial quimiopreventivo do citral como tratamento tópico pós exposição a radiação UVB. O citral é um composto natural encontrado principalmente no capim-limão (*Cymbopogon citratus*)(DUDAI *et al.*, 2005) e que tem sido utilizado nas indústrias de alimentos e medicamentos como agente flavorizante, mas que também tem demonstrado atividades biológicas de interesse, incluindo atividade citotóxica sobre células de melanoma (SANCHES *et al.*, 2014).

1.1 – Histologia da Pele

A pele é o órgão mais fácil de ser estudado, permitindo a visualização dos princípios fundamentais de doenças e processos patológicos (FILHO, 2000). É formada por camadas específicas que exercem diferentes funções. A camada mais profunda é a hipoderme, que é composta basicamente de tecido adiposo, e tem como função principal o isolamento térmico. Acima da hipoderme encontramos a derme, que é composta por tecido conjuntivo que fornece sustentação para a epiderme e para os anexos da pele (glandulas sebáceas e folículos pilosos). A camada mais externa é a epiderme, composta por queratinócitos, melanócitos e outros tipos celulares, é responsável pela barreira física e imunológica contra agentes agressores e pelas sensações táteis (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LAZAR; MURPHY, 2010).

1.1.1 – Particularidades da epiderme

A epiderme (figura 01) é classificada como tecido estratificado pavimentoso queratinizado e é subdividido em cinco estratos ou camadas (FILHO, 2000; RUBIN, 2005 JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; MIOT *et al*, 2009; LAZAR; MURPHY, 2010).

a) Camada basal, é a camada mais profunda, separa-se da derme pela membrana basal epidérmica e é constituída de células germinativas com intensa atividade mitótica, sendo base para reposição das demais camadas;

b) Camada espinhosa ou escamosa, formada por queratinócitos, que são células cubóides e ligeiramente achatadas, núcleo central, filamentos de queratina e expansões citoplasmáticas que por desmossomos mantém as células unidas, e confere ao tecido a característica de espinho quando visualizado em cortes histológicos. A principal função dessa camada é de proteção como barreira física, devido à alta coesão entre as células; porém, ela apresenta ainda células tronco (germinativas) que provovem renovação do epitélio;

c) Camada granulosa, nesta camada os queratinócitos são mais poligonais e achatadas, com núcleo central e citoplasma carregado com grânulos basofílicos, ricos em histidina fosforilada e cistina. Esse grânulos ao serem secretados para o meio extracelular se associam aos lipídeos para formar a barreira impermeabilizante, sendo esta a principal função desta camada;

d) Camada córnea, camada mais externa onde os queratinócitos já passaram pelo processo de morte celular, apresentam-se bem achatadas e com citoplasma rico em queratina. Apresenta espessura variada de acordo com o local onde o tecido se encontra.

Os queratinócitos também são capazes de produzir citocinas importantes na regulação da resposta imune, como por exemplo IL- 1 β e IL-1 α , por compor um órgão constantemente exposto a antígenos externos (WIDYARINI *et al.*, 2001; FISHER *et al*, 2002; SILVA, *et al.*, 2013). Os

queratinócitos são as células mais envolvidas em neoplasias cutâneas, sendo a partir delas originado os dois tipos mais comuns de CPNM, o CBC e o CEC. (LAZAR; MURPHY, 2010).

Além dos queratinócitos, a epiderme apresenta também outros tipos celulares, tais como : (i) melanócitos, células encontradas na junção entre a derme e a epiderme, entre os queratinócitos, produtoras de melanina (pigmento de coloração marrom-escura que confere cor à pele e proteção aos queratinócitos contra os raios UV); (ii) Células de Langerhans, células dendríticas que se localizam na camada espinhosa e comportam-se como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T, exercendo um importante papel na resposta imune cutânea; (iii) Células de Merkel, são células existentes em maior quantidade em peles mais espessas como palmas das mãos, pés e ponta dos dedos, localizam-se na parte profunda da epiderme, próximo a camada basal, aderida aos queratinócitos por desmossomos e são responsáveis pela sensibilidade tátil, atuando como mecanorreceptores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SANTOS, *et al.*, 2010).

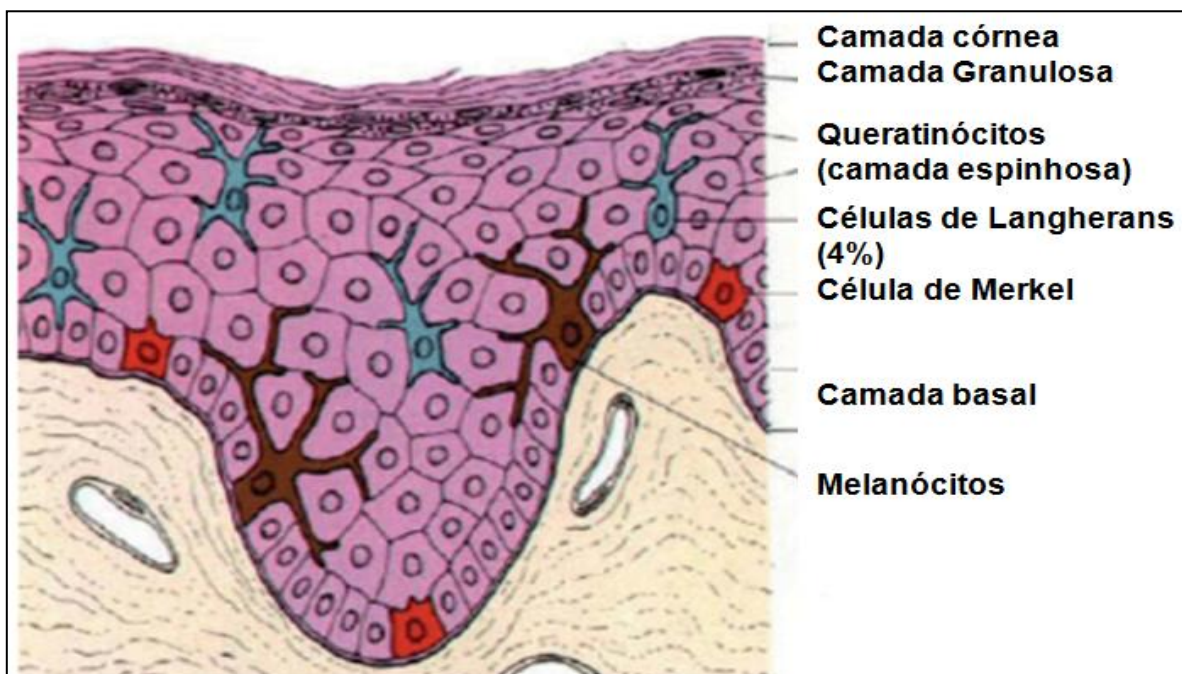


FIGURA 01. Ilustração das camadas da epiderme e suas células características. Figura adaptada de MIOT *et al.*, (2009).

1.2 – Carcinogênese da Pele

Quando em processo ativo de divisão, as células passam por uma sequência de eventos denominada ciclo celular, onde saem da fase G_0 e entram na fase G_1 (primeira fase de crescimento celular), fase S (duplicação do material genético), G_2 (segunda fase de crescimento, em que a célula está se preparando para se dividir) e M (fase de divisão mitótica) (STRICKER; KUMAR, 2010). Estas fases são reguladas através de uma complexa rede de sinalização celular, controladas por genes classificados como proto-oncogenes (favoráveis à divisão celular e sobrevivência) e supressores tumorais (permitem paradas no ciclo celular, reparo do material genético danificado ou indução de morte celular). O surgimento de mutações nestes genes resulta em descontrole sobre o ciclo e surgimento das neoplasias. Estas mutações podem surgir de forma espontânea (através de erros durante a duplicação do DNA, por exemplo) ou induzidas através de agentes carcinogênicos (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002; MARTINEZ, *et al.*, 2006; STRICKER; KUMAR, 2010; ALMEIDA, 2004). De todos os agentes carcinogênicos, a radiação ultravioleta (UV) é o mais importante na carcinogênese da pele (MARTINEZ, *et al.*, 2006).

1.2.1 – Radiação ultravioleta

A radiação UV é dividida em três faixas (figura 02) de acordo com o seu comprimento de onda: (i) UVA (320 a 400nm), conseguem penetrar a derme; (ii) UVB (280 e 320 nm), atingem a epiderme; (iii) UVC (100 e 280 nm), considerada a faixa mais potente, ainda que grande parte seja retida pela atmosfera planetária (BUDIYANTO *et al.*, 2000; ORAZIO, *et al.* 2013).

Os raios UVA são responsáveis pelo bronzeamento imediato, são menos energéticos, porém estão presentes em proporções constantes durante o ano todo. Penetram profundamente na derme e estão relacionados com danos às membranas celulares e ao DNA, contribuindo assim, para os fenômenos de fotoenvelhecimento e carcinogênese da pele. A radiação UVA age principalmente através da indução do estresse oxidativo e do processo inflamatório (BOLOGNIA, 2008; MONTAGNES, COSTA, 2009). Já a radiação

UVB é mais energética e é capaz de provocar lesões teciduais de forma direta e indireta. De forma direta a radiação UVB é capaz de induzir reações fotoquímicas no DNA das células da epiderme, que resultam em fotoprodutos 6-4, dímeros de pirimidinas ou ciclobutanos. Dentre os danos causados, os dímeros de pirimidina são considerados os eventos mais associados ao processo de carcinogênese, por ser o tipo de lesão mais frequente (três vezes mais do que os outros fotoprodutos), além de apresentar menor taxa de reparo (MARTINEZ, *et al.*, 2006). De forma indireta a radiação UVB é capaz de gerar processos inflamatórios e estresse oxidativo, que serão posteriormente abordados (ORAZIO, *et al.* 2013).

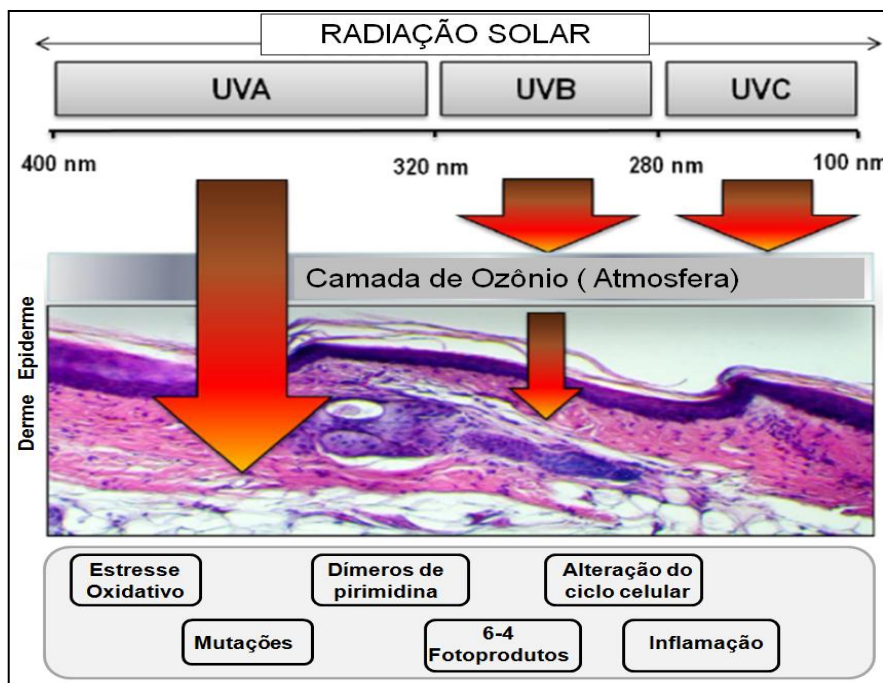


Figura 02 . Radiação solar. A absorção dos raios UV na pele varia de acordo com o espectro da luz solar, dividido em UVA (312-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-280 nm) D'ORAZIO *et al.*, (2013).

Em condições fisiológicas, as células expostas à radiação UV que sofrem intenso dano direto em seu material genético entram em processo apoptótico. Na pele estas células apoptóticas são denominadas de “sunburn cells” (SBC), termo que pode ser traduzido em células da queimadura solar (BICKERS; ATHAR, 2006). Este processo ocorre entre 6 a 24 horas após a irradiação (LU *et al.*, 2004) e é dependente da ação da proteína p53. A proteína p53 é supressor tumoral (FIGUEREDO *et al.*, 2003), que atua no controle do crescimento celular através da facilitação do reparo do DNA, do

bloqueio do ciclo celular ou da indução da apoptose, em situações de lesões no material genético celular (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002; SHILOH, 2006).

Quando a radiação UV induz danos no DNA, a proteína Quinase Atr (relacionada à Rad3) identifica lesões na dupla hélice e aciona sinalizações celulares que envolvem quinases e a p53. A proteína p53 aumenta a expressão dos genes *TP53*, *P21*, *GADD45* e *BAX*, além de diminuir a expressão do gene *BCL-2*, facilitando as demais sinalizações gerando um microambiente pró-apoptótico. A proteína p21 é um inibidor do complexo pRB/E2F parando o ciclo celular em G1, a proteína GADD45 é um dos componentes de estabilização da fita de DNA, para que os mecanismos de reparo possam atuar. Já as proteínas bax e bcl-2 estão envolvidas na regulação da apoptose, sendo bax um proteína pró-apoptótica, enquanto a bcl-2 tem atividade anti-apotótica (TIBBETTS, *et al.*, 1999; DERHEIMER, *et al.*, 2007).

Como dito anteriormente, a radiação UVB também é capaz de gerar danos indiretos no tecido epitelial que envolvem a resposta inflamatória e estresse oxidativo.

O processo inflamatório induzido pela radiação UV é um evento conhecidamente relacionado com a carcinogênese da pele (SONG, *et al.*, 2015). Os danos provocados no DNA dos queratinócitos pela radiação UV, promovem estímulos em vias produtoras de citocinas pró-inflamatórias, que resultam na ativação e sensibilização de células do sistema imune. A lesão do material genético, o contato com antígenos provindos dos queratinócitos lesionados e as citocinas produzidas pelos queratinócitos, acabam por estimular as células de Langerhans as quais também produzem sinalização pró-inflamatória. Além disso, as células de Langerhans dão continuidade a este processo ao apresentar antígenos aos linfócitos estimulando a proliferação de células efetoras (células NK, linfócitos CD8+) e ao facilitar a quimiotaxia de fagócitos. Os principais mediadores pró-inflamatórios liberados são: TNF α , IL-1 β , IFN- γ . Posteriormente, diversos tipos celulares como os queratinócitos, os linfócitos Treg, dentre outras, passam a produzir citocinas anti-inflamatórias, especialmente a IL-10, para contrabalancear e regular o processo inflamatório (IWAKURA; ISHIGAMEN, 2006; HANNEMAN; COOPER; BORAN, 2006; KA, *et al.*, 2015).

Durante o processo inflamatório a ativação de células fagocíticas acabam por gerar diversas espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), que resultam no estresse oxidativo (HANNEMAN; COOPER; BORAN, 2006). No entanto, na pele a própria radiação UV é responsável pela indução destas espécies. É importante ressaltar que estresse oxidativo é definido como o desbalanço entre a produção de espécies reativas e ação das defesas antioxidantes, o que resulta em injúrias celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A atividade da UVB na epiderme resulta principalmente na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma vez que esta radiação inibe diretamente a atividade da catalase, enzima responsável pela detoxicação do H_2O_2 (PERES *et al.*, 2011). O H_2O_2 é capaz de reagir com íons férricos (Fe^{2+} e Fe^{3+}) (Reação de Fenton e Reação do tipo Fenton) e gerar novas espécies reativas, tais como o radical hidroxil ($\bullet OH$), ânion superóxido ($\bullet O_2^-$), os radicais peroxil e alcóxil ($LOO\bullet$ e $LO\bullet$), o oxigênio singlet ($^1 O_2$) (AGUIAR, *et al.*, 2007) que posteriormente formam aldeídos de baixa massa molecular como o malondialdeído (MDA) resultantes da lipoperoxidação (TERRA, *et al.*, 2012; ORAZIO, *et al.*, 2013). Todas estas moléculas podem levar à formação de aductos nas bases que compõem a molécula de DNA causando pareamentos errôneos e dessa maneira ocasionando mutações e rearranjos cromossômicos que podem resultar em câncer (MARTINEZ, *et al.*, 2006), além de fazer “feedback” positivo sobre o processo inflamatório (KRUIDENIER *et al.*, 2003a; KRUIDENIER *et al.*, 2003b).

Em contrapartida, o sistema antioxidante cutâneo é bastante rico e envolve defesas enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as defesas enzimáticas podemos citar a glutathiona peroxidase (GSH-Px), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Dentre elas é possível destacar a catalase por sua ação direta sobre o H_2O_2 , uma espécie reativa primária para o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Já as defesas não enzimáticas estão relacionadas com uma série de antioxidantes de baixo peso molecular, que incluem o ascorbato, o ácido urocânico, a glutathiona, o alfa-tocoferol, o ubiquinol, o estradiol, o estrógeno, a melatonina e o ácido lipóico (BIKERS; ATHAR, 2006; TERRA *et al.*, 2012).

Uma das maneiras das células responderem ao estresse oxidativo é

através da produção de mais defesas antioxidantes, este processo é dependente do fator relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2, nuclear factor E2-related 2), que é um fator de transcrição presente no citoplasma. Em sua forma inativa o Nrf2 se associa com a proteína Keap1, sofre ubiquitinação e é encaminhada para a destruição no sistema proteassomal (ZUCKER, *et al.*, 2014). Em situações de estresse oxidativo, as próprias espécies reativas rompem a ligação Nrf2-Keap1, liberando o Nrf2 para que chegue ao núcleo da célula. No núcleo o Nrf2 se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE), elemento situado na região promotora de muitos genes responsáveis pela produção de antioxidantes como a GSTA2 (Glutathione S Transferase A2), NQO1, (NAD(P)H: Quinona Oxidoreductase 1), SOD (Superoxido Desmutase), HO1 (Heme oxigenase), GPx (Glutathione peroxidase), GCLγ (Glutamato cisteína ligase), envolvidos na desintoxicação e eliminação de oxidantes reativos (NGUYEN; NIOI; PICKETT, 2009).

Ainda no processo de carcinogênese induzida pela radiação UV, especialmente a UVB, é importante apontar que este agente físico é também capaz de induzir um estado de imunossupressão tecidual, que pode favorecer a promoção de neoplasias cutâneas (SCHWARZ, 2005; LIMA, 2006). Até o momento os mecanismos propostos envolvem: (i) apoptose de células Langerhans; (ii) aumento da expressão de IL-10 pelos queratinócitos (HANNEMAN; COOPER; BORAN, 2006; LIMA, 2006; SCHWARZ, 2005).

Desta forma, a radiação UV apresenta diversos mecanismos relacionados com o surgimento e a proliferação de células mutadas, que resultam nos cânceres de pele (ORÁZIO, 2013).

1.3 Câncer de Pele Não Melanoma.

1.3.1 Carcinoma basocelular

O carcinoma basocelular (CBC) origina-se nos queratinócitos da camada basal da epiderme, sendo o câncer de maior incidência no mundo, correspondendo a 75% de todos os cânceres de pele. Embora apresente alta incidência o CBC possui crescimento lento, raramente faz metástase e as

maiores complicações envolvem ulcerações locais que podem resultar em outros comprometimentos, especialmente na face. O CBC é mais comum em indivíduos com idade superior a 50 anos, devido ao acúmulo de mutações durante a vida (FILHO, 2000; LUCAS *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2006 ; SCA, 2007).

O CBC pode se confundido com feridas que não cicatrizam ou lesões que sangram com facilidade devido a pequenos traumatismos, como o roçar da toalha, por exemplo. Clinicamente os tumores apresentam-se como pápulas peroladas (figura 03A), com vasos sanguíneos subepidérmicos (telangectasia), podendo ou não ter pigmentação por melanina. Em formas mais avançadas surgem ulcerações e infiltração tecidual extensa que pode atingir tecidos ósseos. Histologicamente é caracterizado pela proliferação das células basalóides em paliçada invadindo a derme (Fig. 3B) (RUBIN, 2005; LAZAR; MURPHY, 2010).

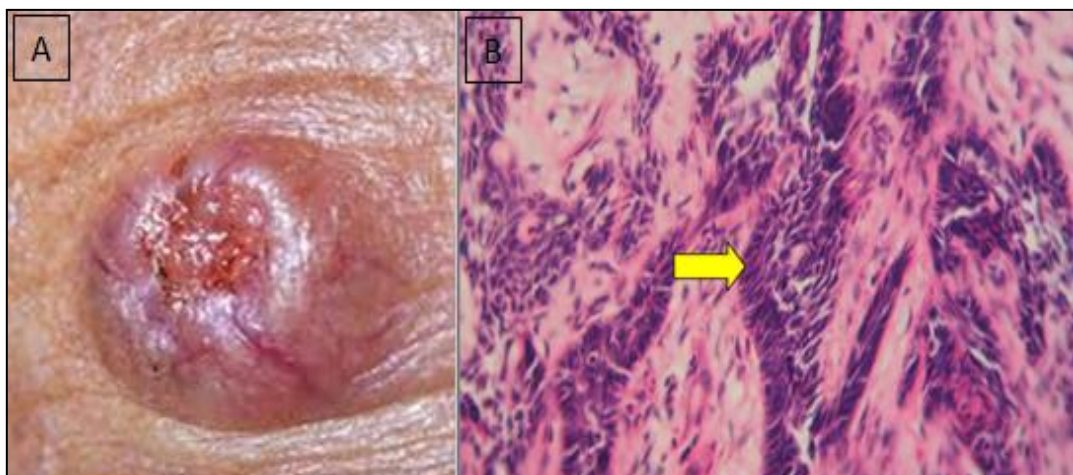


Figura 03: (A) Foto apresentando as características macroscópicas do carcinoma basocelular. (B) Fotomicrografia (400X) do corte histológico corado com hematoxilina e eosina, demonstrando a proliferação de células basalóides indiferenciadas provindas da camada basal da epiderme que invadem a derme, apresentando arranjo em paliçada (seta amarela). ARMANI (2007)

1.3.2. Carcinoma espinocelular

O Carcinoma espinocelular (CEC) também é denominado de carcinoma de células escamosas. Trata-se da proliferação de células atípicas da camada espinhosa que invadem a derme. O CEC é bem menos frequente

do que o CBC e corresponde a cerca de 20% dos cânceres de pele não melanoma (MARTINEZ *et al.*, 2006). Este tipo de câncer também apresenta forte correlação com a exposição solar, uma vez que costuma surgir em regiões do corpo expostas ao sol, principalmente mãos e face e pode evoluir a partir de uma lesão pré-neoplásica como a queratose actínica e o carcinoma “in situ” (SCA, 2016; LAZAR; MURPHY, 2010).

A queratose senil ou actínica é uma lesão pré-maligna caracterizada por placas cobertas de escamas secas, aderentes, pardacentas (Fig. 4A) (LAZAR; MURPHY, 2010). Sua evolução é lenta e 25% dos casos evolui para o CEC, sendo este um motivo para que a queratose receba atenção clínica e tratamento (ACS, 2016). Histologicamente, pode ser classificada em atrófica, hipertrófica e liquenóide, destas podemos destacar a hipertrófica. A queratose actínica hipertrófica inicia-se a partir dos queratinócitos das camadas mais profundas da epiderme, onde uma intensa proliferação celular atinge até a camada granular e córnea, resultando em um espessamento da camada córnea, denominado de hiperqueratose. As células apresentam arranjos desordenados, pequeno grau de atipia, núcleo irregular (Fig. 4B). Pode haver inflamação crônica na junção derme-epiderme (FILHO, 2000; COCKERELL, 2000; RUBIN, 2005; DODDS; CHIA; SHUMACK, 2014). Já o carcinoma “in situ”, também conhecido como doença de Bowen, caracteriza-se por manchas avermelhadas semelhantes a queratose actínica, com células atípicas, desarranjos, núcleos irregulares e pontos de queratização, porém ainda confinadas à epiderme (Fig 4C) (KRAFT;GRANTER, 2014).

O CEC apresenta desenvolvimento mais rápido, comparado com o CBC e pode apresentar capacidade metastática em aproximadamente 3% dos casos registrados (BROUGHAM, *et al.*, 2012). As lesões iniciam-se pequenas, como uma zona vermelha com superfície crostosa e descamativa, mas devido ao crescimento rápido atinge centímetros em poucos meses, infiltrando-se nos tecidos subjacentes e também para cima, formando lesões elevadas, as vezes verrugosa e frequentemente evolui para ulceração com sangramento (Fig 4E). Microscopicamente é bem caracterizada como queratinócitos atípicos da camada espinhosa que se proliferam invadindo a derme, podendo haver formação de focos de queratinização, denominados de pérolas córneas (Fig. 4D) (KOYUNCUEER, 2014; MARTINEZ *et al.*, 2006; LAZAR; MURPHY, 2010).

O CEC e CBC podem ser encontrados na mesma lesão, sendo classificados como carcinoma misto (FILHO, 2000; RUBIN, 2005).

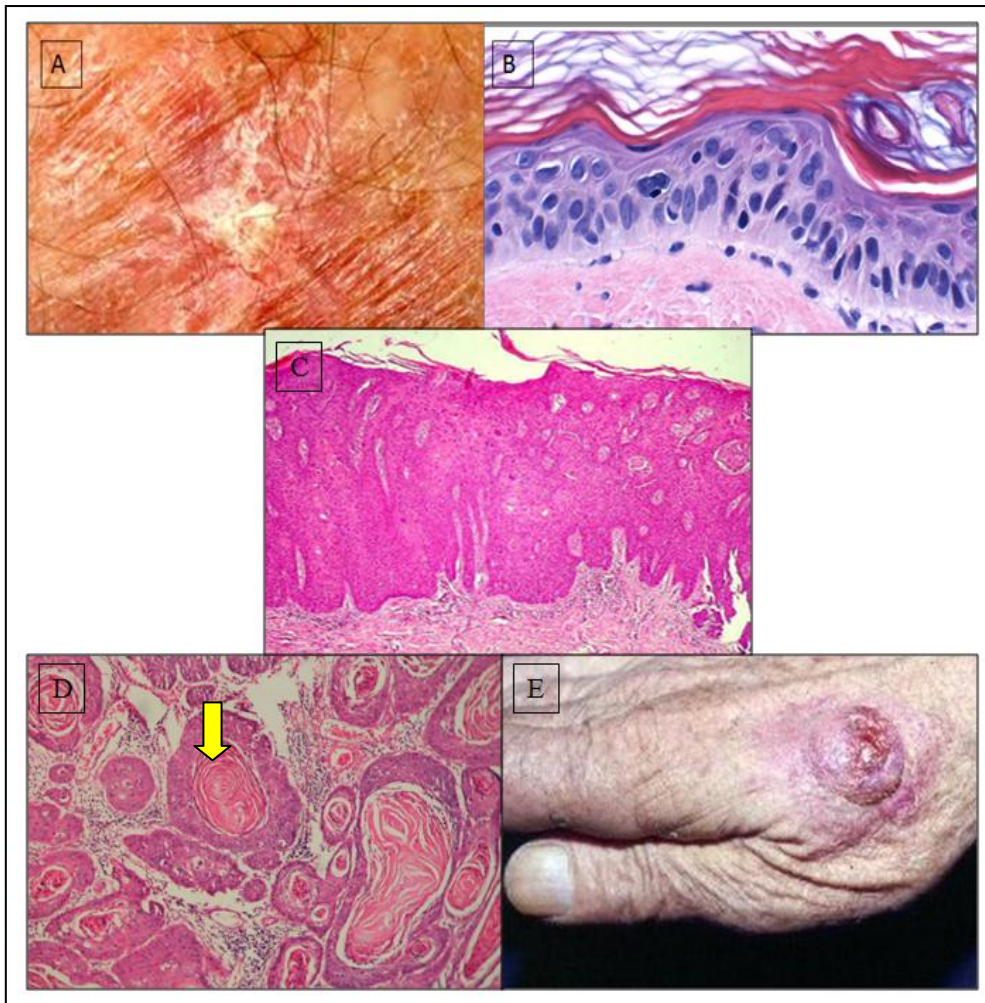


Figura 04. Queratose Actínica Hipertrófica. (A) Lesão macroscópica na pele. (B) Corte histológico H&E (400x). Epiderme hipertrófica com queratinócitos atípicos, espessamento da camada córnea. (C) Corte histológico H&E (100x) carcinoma espinocelular *in situ*. Alterações citológicas com características de malignidade (hipercromatismo, pleomorfismo, mitoses) e perda da arquitetura do tecido, porém retidos a epiderme. (D) Corte histológico H&E (100x) carcinoma espinocelular, composto por células com núcleos grandes e pleomórficos, organizadas em agregados com formas variadas e que invadem a derme com queratinização (pérola córnea) apontada pela seta. (E) aspecto macroscópico do carcinoma espinocelular em paciente antes da remoção cirúrgica. ARMANI (2007); LELLIS & GONÇALVES (2011); KRAFT & GRANTER (2014); UNICAMP (2016).

1.4 Prevenção

Diante da alta incidência e número crescente de casos de CPNM, torna-se indispensável a proteção contra os raios solares. Como dito anteriormente o controle do período de exposição solar, uso de roupas e chapéus, protetores e bloqueadores solares são medidas que devem ser

adotadas pela população como método de prevenção dos cânceres de pele (WRIGHT; SPENCER; FLORES, 2006; INCA, 2016). No entanto pesquisas apontam novas abordagem de prevenção que incluem o uso de substâncias naturais.

Os compostos naturais são substâncias encontradas em plantas e animais e que apresentam atividade biológica de interesse. A maioria dos fármacos disponíveis foram descobertos a partir da triagem de produtos naturais, como é o caso dos quimioterápicos antineoplásicos vincristina e vimblastina, ambos alcalóides obtidos a partir da vinca (*Catharanthus roseus*) (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001). Atualmente muitos trabalhos científicos continuam a fazer a prospecção de novos fármacos para a prevenção do câncer (PATEL; THAKKAR; PATEL, 2015). O uso de produtos naturais associados ao uso de protetores e bloqueadores solares e cuidados com a exposição solar pode resultar em melhor prevenção do CPNM e mais qualidade de vida para população. Dentre as substâncias naturais podemos apontar o citral.

O citral, 3,7-dimetil-2,6-octadienal, é um óleo essencial, composto por uma mistura de isômeros neral (cis) e geranial (trans), naturalmente encontrado em algumas plantas como: capim-limão (*Cymbopogon citratus*), verbena (*Verbena bonariensis*) e melissa (*Melissa officinalis* L.) (DUDAI *et al.*, 2005). Apresenta forte aroma de limão, razão pela qual é utilizado na indústria como aromatizante de alimentos, bebidas e doces e na produção de cosméticos (LORENZI; MATOS, 2002; LEAL *et al.*, 2003).

Biologicamente o citral tem demonstrado atividade antibacteriana, antifúngica e anticancerígena. Com relação à sua atividade anticarcinogênica, diversos mecanismos têm sido propostos, sendo que os mecanismos mais aceitos envolvem: a inibição da via de sinalização do NF- κ B, ao bloquear a fosforilação do I κ B; a promoção de vias atividade antioxidante; atividade anti-inflamatória resultado da modulação do NF- κ B (LEE *et al.*, 2008; MAZO, *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2015; SHEN; SUM; GUO, 2015; KA, *et al.*, 2015).

O fator de transcrição NF- κ B, pode ser encontrado em quase todos os tipos celulares, e tem relação com a resposta celular a estímulos como estresse oxidativo, mediadores inflamatórios e radiação UVOL. Tem papel

chave na ativação de muitos genes responsáveis pela expressão de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF α , genes envolvidos na regulação do ciclo celular, proliferação e apoptose como gene *Bax*, *Bcl2* e *p53*, além de ser muito sensível ao estresse oxidativo (CARINI, et al., 2000; GLEZER, et al., 2000; FUCHS et al., 2001; BIKERS; ATHAR, 2006. Encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória chamada I κ B que impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Ao ser degradado transloca-se para o núcleo e se liga em regiões promotoras de vários genes, como os genes envolvidos na produção óxido nítrico sintase, ciclooxigenase-2, superóxido dismutase, interleucinas, fator de necrose tumoral, E-selectina, dentre outros, que favorecem estabelecimento do processo inflamatório e facilitam a promoção das neoplasias (GLEZER, et al., 2000; SONG, et al., 2015; SHEN et al., 2015).

O citral ainda apresenta mecanismos que envolvem vias de sinalização da divisão celular e apoptose relacionadas com o aumento da expressão do gene *TP53* e caspase 3 (DUDAI et al., 2005; LEE et al., 2008; CHAOUKI et al., 2009; MAZO, et al., 2014; KA, et al., 2015; SHEN et al., 2015; SONG, et al., 2015; SANCHES, et al., 2014).

Diante dos efeitos promissores que o citral tem apresentado em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, o presente trabalho avaliou os efeitos desta substância na pele de camundongos *hairless*, afim de determinar se o citral é um possível quimioprotetor contra a carcinogênese da pele induzida pela radiação UVB.

2 JUSTIFICATIVA

Devido a alta incidência do CPNM e o aumento a cada ano do números de casos mesmo com o uso de protetor e bloqueador solar e medidas socioeducativas de prevenção a exposição solar, seria importante a descoberta de novos produtos que possam colaborar para a prevenção e diminuição desta incidência.

Vários pesquisadores utilizam o modelo de irradiação UVB para testar compostos naturais. Como exemplo, Phillips *et al.* (2013), avaliaram o efeito da aplicação tópica e oral da curcumina. O citral tem apresentado potencial terapêutico *in vitro* em diversos tipos de células neoplásicas atuando em vias antioxidantes e anti-inflamatória, duas vias importantes na carcinogênese.

Por este motivo, é relevante investigar o efeito desta substância em modelo *in vivo* afim de caracterizar o seu potencial frente aos processos de carcinogênese de pele induzido por UVB.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar *in vivo* o efeito quimioprotetor do citral no câncer de pele não melanoma, induzido pela irradiação UVB em camundongos “*hairless*”.

3.2 Específicos

- Analisar histologicamente a ocorrência de carcinoma basocelular, espinocelular e misto, bem como de lesões pré neoplásicas, comparando o grupo controle irradiado com os grupos tratados com diferentes concentrações de citral;
- Avaliar o envolvimento da indução de apoptose no mecanismo quimioprotetor do citral;
- Avaliar o perfil inflamatório através das dosagens de citocinas na pele (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-23, IL-10);
- Verificar a participação do estresse oxidativo e sistemas antioxidantes, pela dosagem da catalase e dos antioxidantes de baixo peso molecular, bem como pela dosagem do malondialdeído na pele.

4 CONCLUSÃO

O uso de protetor solar ainda é a melhor prevenção para o CPNM, no entanto com os avanços das pesquisas, produtos específicos utilizados após a exposição solar podem contribuir para prevenção das neoplasias de pele. Neste estudo nós demonstramos que o pós tratamento com citral tem efeito protetor contra a indução da carcinogênese pela irradiação UVB, e discutimos os prováveis mecanismos envolvidos que envolvem a ação antioxidante e anti-inflamatória. Novas pesquisas precisam complementar a avaliação do efeito protetor do citral afim de podermos predizer as chances futuras do seu uso pela população associado às medidas preventivas já adotadas.

5 REFERÊNCIAS

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.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Quím. Nova**, v.30 n^o.3. 2007.

ALMEIDA, J.R.C. Marcadores Tumoriais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, p. 305-316, 2007.

ARMANI, A. Carcinoma Espinocelular. **Atlas de Anatomia Patológica Geral. Curso de Biomedicina**. Universidade Estadual de Londrina. 2007. Disponível em: <http://www.uel.br/ccb/patologia/atlas/Atlas-de-Patologia.pdf>. Acesso em 12 de Dezembro de 2015.

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 .2006.

BOLOGNIA, J.L.; RAPINI, R.P. **Dermatology**. 2^o ed: Mosby; 2008.

BROUGHAM, N. D.L.S.; DENNETT, E. R. CAMERON, R.; TAN, S.T. The Incidence of Metastasis From Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and the Impact of its Risk Factors. **Journal of Surgical Oncolog**, 106:811–815, 2012.

BUDIYANTO, A.; AHAMED, U. N.; WU, A N.; BITO, T., N., O; OSAWA, T.;

UEDA, M.; ICHIHASHI, M. Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. **Carcinogenesis**, v.. 21, n 11, pp 2085-2090. 2000.

CHAOUKI, W.; LEGER, D. Y.; LIAGRE, B.; BENYTOUT, J. L.; HMAMOUCHE, M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells, **FundamClin Pharmacol**.23 (2009) 549-56.

COCKERELL, C.J. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol*. 2000; 42 (1Pt 2):11-7.

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.

DERHEIMER, F.A; O'HAGAN, H. M.; KRUEGER, H. M; GANASOGE, S.; PAULSEN, M. T.; LJUNGMAN, M. RAP and ATR link transcriptional stress to p53. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007 31; 104(31): 12778–12783

DODDS, A.; CHIA, A. SHUMACK, S. Actinic keratosis: rationale and management. **Dermatol** (HEIDELB). 2014; 4 (1): 11-31.

DUDAI, N., WEINSTEIN, Y., KRUP, M., RABINSKY, T., OFIR, R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Planta Med**, v.71(5), p. 484-488, 2005.

FIGUEREDO, L. C.; CORDEIRO, L. N.; ARRUDA, A. P.; CARVALHO, M.D.F.; RIBEIRO, E.M.; COUTINHO, H D.M. Câncer de pele: Estudos dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. *Rev. Bras. Cancerology*: 49(3): 179-183, 2003.

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.

FILHO, G. B., A pele. In FILHO, G. B. **Patologia**. Cap 25, 6^o edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Belo Horizonte. 2000.

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

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M. C. W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. Fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 2000; 22(1):26-30.

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

HANNEMAN, K. K.; COOPER, K. D.; BORAN, E.D. Ultraviolet immunosuppression: mechanisms and consequences. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 19-25, 2006.

INCA, Instituto Nacional do Câncer (Brasil). **Estimativa 2016/2017. Incidência do Câncer no Brasil**. 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>. Acessado em: 03 fev 2016.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014 : incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2014/estimativa-2014.asp>. Acessado em: 03 setembro de 2015.

IWAKURA, Y.; ISHIGAMEN, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **J Clin Invest**. 116(5): 1218–1222. 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 11^o ed. Editora Guanabara Koogan S/A, p. 448-451, 2008.

KA, S.M.; LIN J.C.; LIN, T.J.; LIU, F.C.; CHAO, L.K.; HO, C.L.; YEH, L.T.; SYTWU, H.K.; HUA, K. F.; CHEN, A. Citral alleviates an accelerated and severe lupus nephritis model by inhibiting the activation signal of NLRP3 inflammasome and enhancing *Nrf2* activation. **Arthritis Research & Therapy**. 17:331. 2015.

KOYUNCUER, A. Histopathological evaluation of non-melanoma skin cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, 2014, 12:159.

KRAFT, S.; GRANTER, S.R. Molecular pathology of Skin Neoplasms of the Head and Neck. **Arch Pathol Lab Med**, V. 138 nº. 6, pp 759-787, 2014.

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.

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.

LOPES, Aline A.; OLIVEIRA, Andreza M.; PRADO, Camila B.C. Principais Genes que Participam da Formação de Tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 2, nº 2. 2º semestre de 2002

LORENZI. H.; MATOS F. J. A. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa SP: **Instituto Plantarum**, 2002.

LEAL, T. C. A. B.; FREITAS S. P.; SILVA, J. F.; CARVALHO, A. J. C. Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf] em diferentes idades. **Rev Bras PI Med**, v.5, p. 61-64, 2003.

LIMA, H.C. Papel das células T reguladoras no desenvolvimento de dermatoses. **An. Bras. Dermatol.** v.81, nº.3, 2006.

LUCAS, R; MCMICHAEL, T; SMITH, W; ARMSTRONG, B. Solar Ultraviolet Radiation: Global Burden of Disease from Solar Ultraviolet Radiation. Environmental Burden of Disease Series, v. 13. Geneva: **World Health Organization**, 2006.

LEE, H.J.;JEONG, H.S.; KIM, D.J.; NOH,Y.H; YUK, D.Y.;HONG, J.T. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-kappa B activation in RAW264.7 cells. **Arch Pharm Res** 31: 342–349. 2008

LAZAR, A.J.F.; MURPHY, G.F. A pele. In: KUMAR, V. et al. (eds). Robins & Cotran - **Patologia - Bases Patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 25, p. 1173- 1212. 2010.

LELLIS, R.; GONÇALVES, F. **Dermatologia para iniciantes: Noções básicas de dermatologia para médicos residentes**. Disponível em: <http://dermatopatologiaparainiciantes.blogspot.com.br/2011/08/ceratose-actinica.html>. Acessado em 27 de Janeiro de 2016.

MAZO, A. B.; SÁNCHEZ, F. M.; GOMEZ, A. I.; MARTÍNEZ, C. M.; INIESTA, J. A.; COMPAN, V.; CREMADES, M. B.; YAGUE, J.; ORTIZ, E. R.; ANTÓN, J.; BUJÁN, S.; COUILLIN, I.; BROUGH, D.; AROSTEGUI, J. I.; PELEGRÍN, P. The influence of natural products upon drug discovery. **Nad Prod Rep**, v. 17,p. 215-234, 2000.

MONTAGNES, Suelen; COSTA, Adilson. Bases Biomoleculares do Fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. Campinas, Sp. 2009. MARTINEZ, Marcos Antonio Rodrigues; FRANCISCO, Guilherme , CABRAL, Luciana Sanches, RUIZ, Itamar Romano Garcia, NETO, Cyro Festa. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 81(5):405-19. 2006.

MIOT, Luciane Donida Bartoli; HÉLIO, Amante Miot; SILVA, Márcia Guimarães; MARQUES, Mariângela Esther Alencar. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v..84 no.6, Rio de Janeiro novembro / dezembro 2009.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The *Nrf2*-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. **J Biol Chem**. 284 (20): 13.291-13.295. 2009.

NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. **Nature Immunology**, 738–748. 2014.

NCI. **National Cancer Institute at the National Institutes of Health**, United States of America. Stages of Melanoma. Disponível em: . Acesso em: 17 março de 2015

ORAZIO, J.; JARRETT, S.; ORTIZ, A.A.; SCOTT, T. UV Radiation and the Skin. **Int. J. Mol. Sci.**, 14, 12222-12248; 2013.

PATEL, P. B.; THAKKAR, V. R.; PATEL, J. S. Cellular effect of curcumin and citral combination on breast cancer cells: induction of apoptosis and cell cycle arrest . **Journal of Breast Cancer**. 18(3): 225-234, 2015.

PERES, P.S.; TERRA, V.A.; GUARNIER, F.A.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 103 (2011) 93–97.

RUBIN, E. **Patologia, Bases clinicopatológicas da Medicina**. Cap. 24, pg 1227 – 1294. 4º edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2005.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Curr Opin Pharmacol**.v.1(4), p. 364-369, 2001.

SCA, **American Cancer Society**. Skin Cancer: Basal and Squamous Cell.

2016. Disponível em:

<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003139-pdf.pdf>.

Acessado em 20 de Janeiro de 2016.

SONG, Y.; ZHAO, H.; LIU, J.; FANG, C.; MIAO, R. Effects of citral on lipopolysaccharide-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells. **Inflammation**. Dezembro, 2015.

SHEN, Y.; SUM, Z.; GUO, X. Citral inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating PPAR- γ . **European Journal of Pharmacology**, 747., 45–5. 2015.

SANCHES, Larissa Juliani. Avaliação do efeito citotóxico do citral sobre células de melanoma murino metastático B16F10. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina. 2014.

SILVA, R. A.; FERNANDO, W.; RIBEIRO, M. M.; SOUZA, A. C. S. Queratinócitos e seus desafios: uma revisão da literatura sobre mecanismos intracelulares. **SAÚDE REV.**, Piracicaba, v. 13, n. 35, p. 3-14, set.-dez. 2013.

SANTOS, I.; MELLO, R. V.; SANTOS, I. B.; SANTO, R. A. Estudo quantitativo das células de Langerhans em carcinomas basocelulares com maior e menor potencial de agressividade local. **An Bras Dermatol**, 85(2):165-71, 2010.

STRICKER, Thomas P.; KUMAR, Vinay. Neoplasia. In: KUMAR, V. et al. (eds). Robins & Cotran - **Patologia - Bases Patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 259 – 330. , 2010.

STAPLES, M. P.; ELWOOD, M.; BURTON, R.C. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. **Med J Aust**, v.184, p. 6–10, 2006.

SHILOH. Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. **Trends Biochem.Sci.**, v.31, p.402-410, 2006.

SCHWARZ, T. Mechanisms of UV-induced immunosuppression. **Keio J Med.** 2005 Dec; 54(4):165-71.

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

TERRA, V.A.; SOUZA-NETO, F. P.; PEREIRA, R. C.; SILVA, RAMALHO, L. N. Z.; LUIZ, R.C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. Nitric oxide is responsible for oxidative skin injury and modulation of cell proliferation after 24 hours of UVB exposures. **Free Radical Research**, July 2012; 46(7): 872–882. (b)

TIBBETTS, R. S.; BRUMBAUGH, K. M.; WILLIAMS, J. M.; SARKARIA, J. N.; CLIBY W. A.; SHIEH, S.Y.; TAYA, Y. PRIVES, C.; ABRAHAM R. T. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. **Genes & Development** 13:152–157, 1999.

UNICAMP. Atlas de Anatomia Patológica. Carcinoma Basocelular de Pele. **Unicamp**, Sp. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/lampele11.html>. Acessado em 24 de novembro de 2015.

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, 2001.

WOLFF, L. A. G.; GILCHREST, B. A.; PALLER, A. S.; LEFFELL, D. J. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 7ed. Medicine G, editor: McGraw Hill; 2007.

WRIGHT, T. I., SPENCER, J. M., FLORES, F. P. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. **J Am Acad Dermatol**, v.ume 54, pages 947-949. 2006.

ZUCKER, S. N.; FINK, E.E.; BAGATI, A.; MANNAVA, S.; SMIRAGLIA, A B.; BOGNER, P. N.; WAWRYNIAK, J. A.; FOLEY, C.; LEONOVA K.; GRIMM, M. L.; MOPARTHY, K.; IONOV, Y.; WANG, J.; LIU, C.; SEXTON, S.; KANDEL, E. S.; BAKIN, A V.; ZHANG, Y.; KAMINSKI, N.; SEGAL, B.H.; NIKIFOROV, M.A. *Nrf2* amplifies oxidative stress via induction of KLF9. **Cell Mol.** 2014. 53 (6): 916-928

APÊNDICE A
Artigo Científico

**CITRAL PREVENTS UVB-INDUCED NON-MELANOMA SKIN CANCER IN
HAIRLESS MICE**

Jean L. Kremer^a, Gabriella P. Melo^a, Heloísa P. Bordini^a, Ana C. Rossaneis^d, Láís R. Sábio^b, Rubens C.^c, Alessandra L. Cecchini^a, Carolina Panis^e, Waldiceu A. V. Junior^d, Rodrigo C. Luiz^{a,*}.

a Laboratory of Molecular Pathology, Department of Sciences of Pathology, Londrina State University (UEL), Londrina, Paraná, Brazil

b Laboratory of the Pathophysiology of Muscle Adaptations, Londrina State University (UEL), Londrina, Paraná, Brazil

c Laboratory of Pathophysiology and Free radicals, Department of Sciences of Pathology, Londrina State University (UEL), Londrina, Paraná, Brazil

d Laboratory Neuropathic and Inflammation, Department of Sciences of Pathology, Londrina State University (UEL), Londrina, Paraná, Brazil

e Laboratory of Inflammatory Mediators, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Francisco Beltrão, PR Brazil;

*** Corresponding author at:**

Laboratory of Molecular Pathology, Department of Ciencias of Pathology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina PR, Brazil. Rod. Celso Garcia Cid, PR-445, Km 380. Tel.: +51 43 3371-4529; fax: +51 43 3371-4267. E-mail address: rc.luiz@uel.br (R.C. Luiz).

Background: Citral is a natural compound with lemon scent, that is used in food and cosmetic industries. Citral demonstrating antibacterial, antifungal, antiparasitic, and anticancer effects. The aim of the present work was to evaluate the chemoprotective activity of citral on non-melanoma skin cancers (NMSC), elucidating the mechanisms involved in this effect.

Methods and Findings: Male *hairless* mice HRS/J, 8-12 weeks old, were exposed to UVB irradiation by 24 weeks, with a cumulative radiation dose of 13.875 J/cm². Citral (carbopol 940 gel, 0.1, 0.5 and 1%) was applied to the skin at a dosage of 0.1 gram/animal, 5 min after UVB exposure. The number of lesions/animal was counted and the size of lesions were measured with a paquimeter. The skin sections were evaluated microscopically, and TUNEL assay was used for apoptosis evaluation. Skin samples were obtained for evaluation of oxidative stress parameters (total radical-trapping antioxidant parameter, catalase activity and malondialdehyde), and cytokine measurement (IL-1B, IL-4, IL-23, TNF- α , INF γ and IL-10). Citral was able to prevent UVB-skin carcinogenesis, according to tested concentration. Citral 1% was the most effective with 100% of prevention. Citral decreased the UVB-induced oxidative stress of skin, decreased the levels of proinflammatory cytokines and increased apoptotic cell rate.

Conclusion: Citral has an effective chemopreventive action against UVB-induced carcinogenesis in *hairless* mice, even applied after UVB exposure, making it into a strong candidate for further research aimed at skin cancer prevention.

Keywords: Citral, chemoprevention, *hairless* mice, skin cancer, UVB radiation,

Introduction

Skin cancers are the most common type of cancer, about 8 out of 10 of these are basal cell cancers [1]. The incidence of skin cancers has been increasing over the past decades, and has been associated with better skin cancer diagnosis, chronic exposure to solar radiation, ozone depletion, and population aging[2]. According to World Health Organization, between 2 and 3 million non-melanoma skin cancer (NMSC) are diagnosed globally each year [3].

There are two main categories of skin cancers: melanoma and non-melanoma skin cancers (NMSC). This classification is based on cell of origin and clinical behavior [4]. The two major forms of NMSC is basal cell and squamous cell carcinomas, both are derived from epidermal keratinocytes, and develop in the areas of skin exposed ultraviolet (UV), such as face and arms [5].

Mutations induced by (UV) represent a major causative factor for skin cancer. The UVB radiation (290-320nm) penetrates cells in the epiderms and is directly absorbed by DNA, generating molecular rearrangements that results in photoproducts such as cyclobutane dimers and 6–4 photoproducts [2]. This radiation also contributes to skin cancer carcinogenesis by inducing inflammatory process, and by generating reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide and the hydroxyl radical [6].

The best way to prevent skin cancer is preventing sunburn by controlling the time of sun exposure, and use of sunblocks. More recently, new approaches for skin cancer prevention has been proposed, including natural products that could be ingested or applied to the skin [7].

Citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal) is a naturally occurring aliphatic

aldehyde of the terpene series and is an isomeric moisture of geranial and neral, is a key component of essential oils extracted from several herbal plants such as lemon grass (*Cymbopogon citrates*), Melissa (*Melissa officinalis*), and verbena (*Verbena officinalis*). Citral has a particular scent of lemon and has been used as a food additive and as a fragrance in cosmetic industry [8,9]. It is devoid of mutagenic effect on *in vitro* models, has antibacterial, antifungal, antiparasitic, and anticancer effects, but can be a skin sensitizer according to used concentration [10-15].

The present work evaluated and observed chemoprotective activity of citral against UVB-induced skin carcinogenesis, and also elucidated some mechanisms involved in this protective effect.

Methods

In vivo experimentation – animals

Experiment was authorized by Ethics Committee in the Use of Animals (CEUA-UEL). We used *hairless* mice HRS/J, male, 8-12 weeks old, weighing 30-36 g, maintained and treated at the biotério of Department of Pathological Sciences, Center of Biological Sciences under standard conditions ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, and humidity $55\pm 10\%$, photoperiod of 12 hours, propylene cages containing softwood chips, 5 animal/cage). During all experimental period the animals were fed with basal diet (Nuvilab®) and filtered and sterilized water *ad libitum*.

UVB-induced carcinogenesis

In the present work, we used a UVB-induced skin carcinogenesis protocol proposed by PHILLIPS *et al.* (2013) [16], with adaptations. The

irradiation chamber was adjusted with a PHILLIPS TL/12 40W UVB fluorescent lamp, which emits radiation from 270 to 400 nm with maximum peak around 313 nm. UVB output was measured using a Research Radiometer model IL-1700 (International Light, USA; calibrated by IL service staff) with a radiometer sensor for UV (SED005) and UVB (SED240), which detected that UVB was 73% of the total UV irradiation in the present experimental conditions. The UVB irradiation rate was 0.237125 mW/cm^2 . The lamp was embedded in a 1.30 m/0.43 m/0.45 m box, in which the caged mice were placed 15 cm beneath the lamp. During initiation phase the animals were irradiated with UVB ultraviolet light (0.228 J/m^2) for 10 consecutive days (13 min/day). After this period, animals rested during 7 days. During the promotion phase the animals were irradiated with UVB (0.228 J/m^2) for 13min/day, 3 times a week. Promotion phase extended up to 24 weeks, with cumulative radiation dose 13.875 J/cm^2 . In groups with citral treatment, we used a carbopol 940 gel with different concentrations (0.1, 0.5 and 1%), at a dosage of 0.1 gram/animal. The gel was applied to mice back 5 min (day 18-week 24) after UVB exposure.

Lesions evaluation and skin samples

After 24 weeks, the number of lesions on the back of the animals was counted. The size of the lesions was determined with a paquimeter (Starrett 0.0006"/0.01mm). For euthanasia, the animals were sedated in a ether gas chamber before cervical dislocation. A sample from dorsal skin (1 cm^2) located 2 cm above the tail was obtained for histological evaluations, this area was chosen due a high frequency of tumors. The surrounding area (0.5 cm) was harvested for oxidative stress and cytokines evaluation. Segments of dorsal

skin to be used in histologic evaluations were fixed in formalin in 10% neutral buffered-formalin, stored in 70% ethanol (2 days), embedded in paraffin. For oxidative stress evaluation the skin samples were frozen at -86°C, and samples for cytokine evaluation were frozen with saline (0.9%) solution at -86°C.

Histopathology evaluation

Skin sections (5µm) (microtome SLEE) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) [17]. For each animal 4 sections were completely evaluated in optic microscope. All epidermic cells for each field of view (400x magnification) The sections were analyzed (100x and 400x magnification) [18] according to the following criteria: (-) absence, (+) mild, (++) moderate, and (+++) severe

Oxidative stress evaluation

Dorsal skin homogenates were defreezed and homogenized in an Ultra Turrax homogenizer containing 20 mg/mL, total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), 30 mg/mL (TBARS), or 50 mg/mL (Catalase) of tissue in a buffer containing KH_2PO_4 30mM at pH 7.4, and centrifuged (11.000 rpm, 20 min, 4°C).

TRAP was determined according to the protocol described by [19], and modified by [20]. The reaction is based on the hability of a compound or sample to inhibit autoxidation of Azo-bis 2-amidinopropane (ABAP) that results in luminescence emission. The results are compared to a known antioxidant, the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic (Trolox). Chemiluminescence curves were obtained in the GloMax 20/20 luminometer (Promega, Madison, USA), and the results are expressed in uM of Trolox

(control antioxidant). TRAP was used to evaluate antioxidant capacity of skin samples (20 mg./ml) and citral (0.01-1%, in corn oil).

Glutathione levels samples were incubated with 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) in a 1 M TRIS buffer according to the method described by [21] and measured at 412 nm. The stress index (SI) was calculated by the equation: $SI (\%) = (GSH / GSH-GSSG) \times 100$.

Catalase activity was determined as described by [22] and modified by [20]. The method is based on the reduction of H_2O_2 absorption caused by the degradation of peroxide due the presence of catalase. The kinetics of absorbance (5 min) was monitored in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1650 PC UV-vis spectrophotometer) at 240 nm (1 M HCl-TRIS buffer, pH 8.0). The results were expressed as ABS/ μ g protein/min. Protein was determined by the method [23] modified by [24].

Malondialdehyde (MDA) levels were determined according thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay. Many substances react with thiobarbituric acid resulting in colorimetric variations, MDA is one of these substances. After extraction with n-butanol, the absorbances were determined with a spectrophotometer (Shimadzu UV-1650 PC) in 535nm (MDA maximum absorbance) and 572nm, as described by [25] and modified by [26]. The results were expressed in nmol/30mg tissue.

Apoptosis assay

Skin sections (5 μ m) were submitted to TUNEL assay according to instructions of the manufacturer (Dead-EndTM Colorimetric TUNEL system, Promega). Cells marked in light-brown was considered apoptotic. For each

animal 3 sections were completely evaluated. All epidermic cells for each field of view (400x magnification) were counted to determine de percentage of apoptotic cells.

Cytokine measurement

Samples of the skin were homogenized in 500 μ L of buffer containing protease inhibitors, and IL-1 β , IL-4, IL-23, IL-10, TNF- α and INF γ levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (eBioscience®, USA), using an ELISA plate reader (Thermo Plate—TP-Reader) at 450nm. Results were expressed in pg of cytokine/mg of tissue.

Citral absorbance spectroscopy

The absorption pattern of citral was determined in a Shimadzu UV-1650 PC spectrophotometer. Citral (Sigma, >98%) was diluted in corn oil (1:500) and displaced in a quartz cuvette. A range of 280-400nm was used.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analysis were performed using Graphpad Prism® version 6.0 (GraphPad Software), using the One way ANOVA followed by test tukey. Differences were considered significant at $p < 0.05$ [16]. The Shapiro-Wilk W test was used to verify normality of the data.

Results

Citral absorption spectrum revealed a peak of absorption between 340-380 nm, which does not overlap UVB wavelengths (290-320nm) (Fig. 1A), showing that citral is not able to absorb UVB light. Citral presents antioxidant capacity dependent to tested concentrations, in our conditions citral 0.1 and 1% showed antioxidant capacity compared to trolox, while citral 0.01% was not effective to prevent ABAP autoxidation (Fig. 1B).

In the present work we used irradiated groups to evaluate the chemopreventive effect of citral (Fig. 2). In our experimental conditions, we observed that all animals of control UVB group developed skin tumors at 20 week of the experiment. Citral 0.1% and 0.5% delayed tumor onset (22 e 24 weeks, respectively), while citral 1% totally prevented from tumor onset (Fig 3A). Citral 1% effectively reduced the tumor area/mouse and number of tumor/mouse (100% of protection), while citral 0.1 and 0.5 groups did not presented a statistically significant reduction of both parameters, especially the number of tumor/mouse (Fig. 3B,C). Citral treatment without UVB exposure did not induced skin lesions.

Hypertrophic actinic keratosis (AK) and inflammatory cells was observed in all irradiated groups, but was more intense in the irradiated control group (fig 4 G) Carcinoma in situ was observed in control group and citral 0.1%, but was not observed in citral 0.5 and 1%. Control group also demonstrated squamous cell carcinoma, which was less intense in citral 0.1 and 0.5%, and absent in citral 1% group. Basal plus squamous cell carcinoma was observed only in control group (Fig 4). Non-irradiated citral group presented organized epidermis with layers of cells and well-defined derm similar to non-irradiated control group.

In the citral group without UVB exposure the results for all tested parameters to evaluate oxidative stress showed similar results to control group. Chronic exposure to UVB decreased the antioxidant capacity of the skin ($p < 0,01$, compared to non-irradiated control group), but citral 1% was able to avoid antioxidant capacity depletion ($p < 0.0001$, compared to irradiated control (Fig. 5A). The same protective effect was observed for glutathione (GT) depletion and catalase activity (Fig. 5B,C). Levels of malondialdehyde (MDA) were increased in irradiated control group ($p < 0.001$), but citral 1% significantly protected against MDA generation (Fig. 5D).

In relation to cytokines, chronic exposure to UVB increased IL-1B, TNF alfa, IFN gama, IL-4, and IL-10 levels, and citral was able to reduce the levels of all cytokines. For IL-23 we did not observed significant difference among the experimental groups (Table 1). Non-irradiated animals treated with citral presented no changes in the cytokines levels (data not shown).

UVB exposed animals showed increased apoptotic rate ($p < 0.001$) compared to non-irradiated groups. Apoptosis was significantly increased by citral 1% treatment ($p < 0.0001$) (Fig. 6).

Discussion

Citral is a promising molecule for cancer chemoprevention. Up to date, citral has been evaluated in carcinogenesis models *in vitro* and *in vivo*, evaluating anti-inflammatory, pro-apoptotic or antioxidant parameters [9,14,27, 28]. Previously, [28] reported that citral has a protective effect against the promotion of skin carcinogenesis induced by tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). The authors applied citral solutions (acetate) to skin of the animals

before TPA application, and observed that citral reduced the number of tumors by blocking the conversion of retinol into retinoic acid, an important molecule in tumor promotion in this experimental model. In the present work we report a protective effect of citral in a UVB-induced skin cancer experimental model.

Chronic exposure to UVB radiation is strictly related to skin carcinogenesis. This radiation acts directly on DNA of keratinocytes, and indirectly by induction of oxidative stress and inflammatory process [2,5]. There are many protocols for UV-induce skin carcinogenesis. Here we used a protocol proposed by [16], with few modifications, and we also observed the generation of UV-related lesions. Ranging concentrations, citral was able to prevent UVB-induced carcinogenesis. It reduced the number and size of tumors, suggesting that citral has many protective mechanisms. In our protocol we applied citral after UVB exposure, this procedure were chosen to avoid photosensitization. To discard a possible mechanism of UVB blockage by residual citral (48h) in the skin, we evaluated the light absorption of molecule, and we observed that citral does not absorb at 290-320nm (UVB).

It is well established that oxidative stress is involved in UVB-carcinogenesis [6]. Previously, our group reported oxidative stress in skin of mice, using an acute UVB exposure protocol [29]. In the present work, we also observed oxidative stress in chronic UVB exposure. Citral was able to regulate oxidative stress by increasing TRAP, glutathione, catalase activity and decreasing MDA levels.

Using TRAP assay, we identified that citral has antioxidant capacity. This direct action can explain the reduction of oxidative stress compared to irradiated group. However citral also has an indirect antioxidant capacity in biological

systems by activating the Nrf2 signaling pathway, an important transcription factor that regulates the cell response against oxidative stress, by increasing the production of low weight (i.e. glutathione) and enzymatic (i.e. superoxide dismutase, glutathione peroxidase) antioxidant defenses [30,31]. The mechanism proposed by [13] is that citral dissociated Nrf2 from its inhibitor, KEAP1, we can infer that the citral promotes antioxidant Nrf2 pathway.

Glutathione is a tripeptide and the major endogenous antioxidant produced by cells and helps to protect them from ROS such as free radicals and peroxides [32]. Treated groups citral non UVB and UVB irradiation showed glutathione levels increased compared to controls.

Catalase is an important defense against oxidative stress, because it catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen [31]. The H_2O_2 is able of reacting with ferric ions (Fe^{2+} and Fe^{3+}) ions (Fenton reaction) generating new reactive species such as hydroxyl radical ($\bullet OH$), superoxide anion ($\bullet O_2^-$), radicals peroxy ($LOO \bullet$), singlet oxygen ($^1 O_2$) [33], which subsequently form low molecular weight aldehydes such as malondialdehyde (MDA) [2,29]. All these molecules can lead to the formation of adducts in the bases that make up the DNA molecule causing erroneous pairings and thus causes mutations and chromosomal rearrangements [34]. Previously, we reported that catalase activity is directly inhibited by UVB radiation [29], and in our study, chronic UVB-exposure was also able to reduce catalase activity. On the other hand, citral was effective to protect this enzyme, leading to reduced oxidative stress, since catalase maintained its activity and continued to degrade hydrogen peroxide. TRAP, glutathione and catalase

results can be related to the reduction of MDA levels in the citral treated animals group, once MDA represents the final reaction of lipid peroxidation [26].

UVB radiation contributes to skin cancer carcinogenesis by inducing inflammatory process [6]. Here we observed that irradiated animals have increased cytokines levels (IL-1 β , TNF- α , INF γ , IL-4 and IL-10), and citral was able to reduce all cytokine levels. Previously, [35] reported that citral has an anti-inflammatory action associated to regulation of NF-kB pathway, which results in reduced IL-1 β and IL-6 levels and increased IL-10 levels in an *in vitro* rheumatoid arthritis model [13] also reported that citral decreased levels of IL-1 β , IL-4 and INF- γ in a nephritis model, by inhibiting NFkb signaling.

It is well established that citral blocks NF-kb signaling by inhibiting Ikb phosphorylation, thereby blocking the translocation of NF-kb to the nucleus [36], an important event in NF-kB pathway [37]. As a nuclear transcription factor, NF-kB is a central regulator of stress response and triggers inflammatory process by interacting with responsive elements [38], such as cytokine genes (IL-1 β , INF- γ and TNF α) [36]. NFkB can also be activated by UVB radiation [39] and by reactive species, such as hydrogen peroxide [40]. Thus, the protective effect of citral can be associated to reduced inflammatory status with a crosstalk of reduced oxidative stress and NFkB signaling.

Interleukin-4 is very important to UVB-induced carcinogenesis, because it has an anti-apoptotic function in keratinocytes [41]. In our work the reduction of IL-4 levels corroborates with the explanation of increased apoptotic rate in citral irradiated group compared to irradiated group. Increased IL-4 and IL-10 observed in irradiated control group are important results, because both cytokines have been implicated in UVB-induced immunosuppression in murine

models [42, 43], contributing to skin carcinogenesis. Here we observed that citral decreased IL-4 and IL-10 in irradiated group, this reveals that citral has an immunomodulatory effect, avoiding the UVB-induced immunosuppression.

UVB radiation has the ability to induce keratinocytes apoptosis and other cells in the epidermis, through direct and irreversible DNA-damage in the cells, oxidative stress and inflammation. These events activate repair and cell death pathways [6] as p53-induced cell death involving a Bax-dependent caspase-3 activation (extrinsic, death receptor pathway [44,45]).

In the present work citral was able to increase apoptosis rate. The ability of citral to induce apoptosis was previously reported in leukemia and breast cancer cells [9,27]. The proposed mechanisms in these works are related to increased expression of caspase-3 and p53 proteins. Thus, citral generates proapoptotic conditions that facilitates skin UVB-injured cells to undergo apoptosis. This explains the increased levels of apoptosis in citral treated group compared to irradiated control. Here we observed that decreased levels IL-4 is also involved in citral-induced pro-apoptotic status.

Many authors used UVB-induced carcinogenesis models to evaluate chemoprotective effect of natural products, such as green tea, caffeine, vitamin D, curcumin, among others [16,28,46-49]. In these studies the natural product are used prior to initiation phase of UVB-induced carcinogenesis. The administration via also varies among the articles, some use oral administration [16, 28,46-49], topical application [curcumin, caffeine, green tea), and intraperitoneal inoculation [16]. The studies also diverse in the evaluated parameters, and histopathologic characterization is sometimes underestimated. Our study is the first to test the protective effect of a natural product in a topical

application after UVB exposure, simulating the application of the chemopreventive compound after the exposure to sun light. Another different approach of the present work was the evaluation of the protective effect during the promotion phase of UVB-induced carcinogenesis, to investigate the possibility of skin cancer chemoprevention even after previous UVB-induced initiation.

In this study we demonstrated that citral is a promising molecule with an effective protection against UVB-induced carcinogenesis and we discussed the possible mechanisms related to oxidative stress and inflammatory process. Even with this promising results, we can not disregard that sun blocker usage is the most effective way to prevent skin cancer, but the use of citral (and maybe other natural products) after sun exposure also can contribute to prevent skin cancers. Before using citral in humans, future studies are needed to evaluate if the protective effect of citral is still observed in protocols with longer treatment and if actinic keratosis observed here regresses over time.

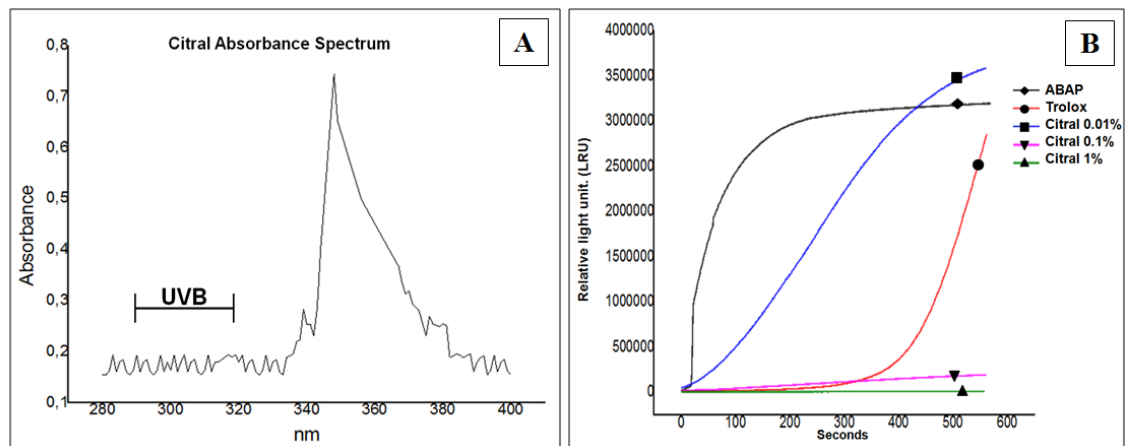


Figure 1. Pure citral as protection against UVB radiation and antioxidant action. (A) Tracking the absorbance of pure citral UV length. **(B)**Tracking the total antioxidant capacity of pure citral

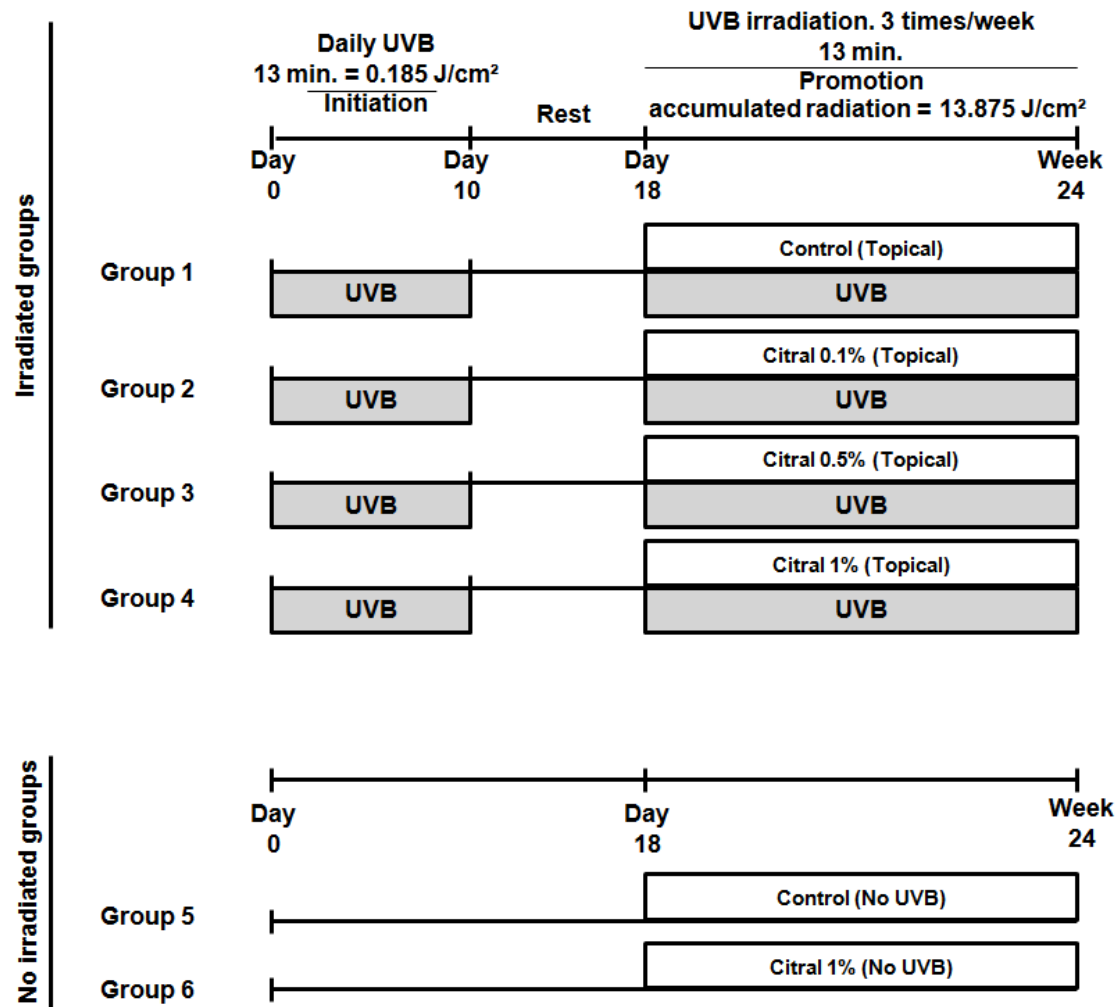


Figure 2. Experimental model of chronic ultraviolet irradiation carcinogenesis induction B (UVB) on *HAIRLESS* mice skin. Mice group of 8 weeks old, male, were subjected to induction phase, period of rest and promotion phase. During promotion phase the mice were treated with topical application of citral formulation with different concentrations.

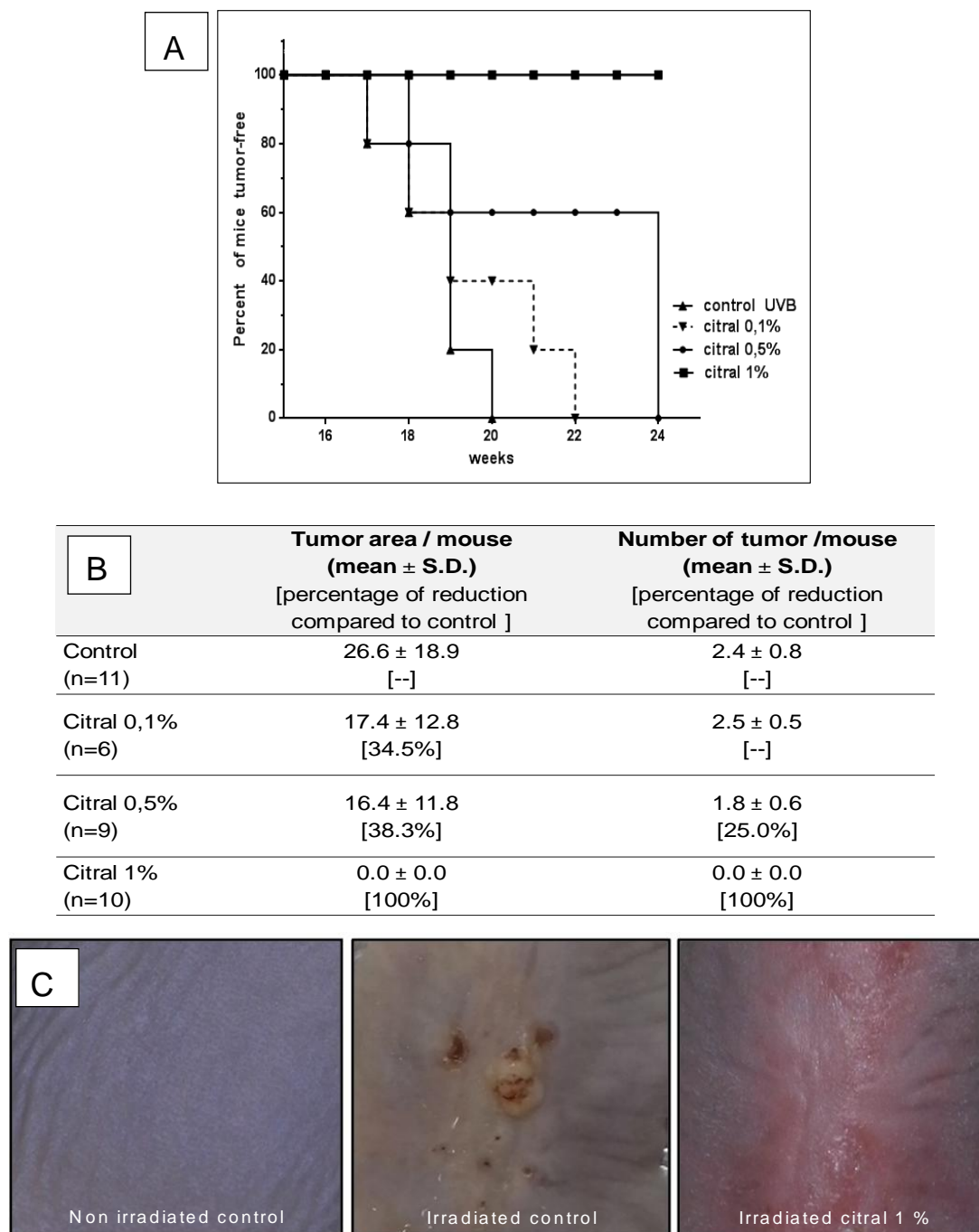
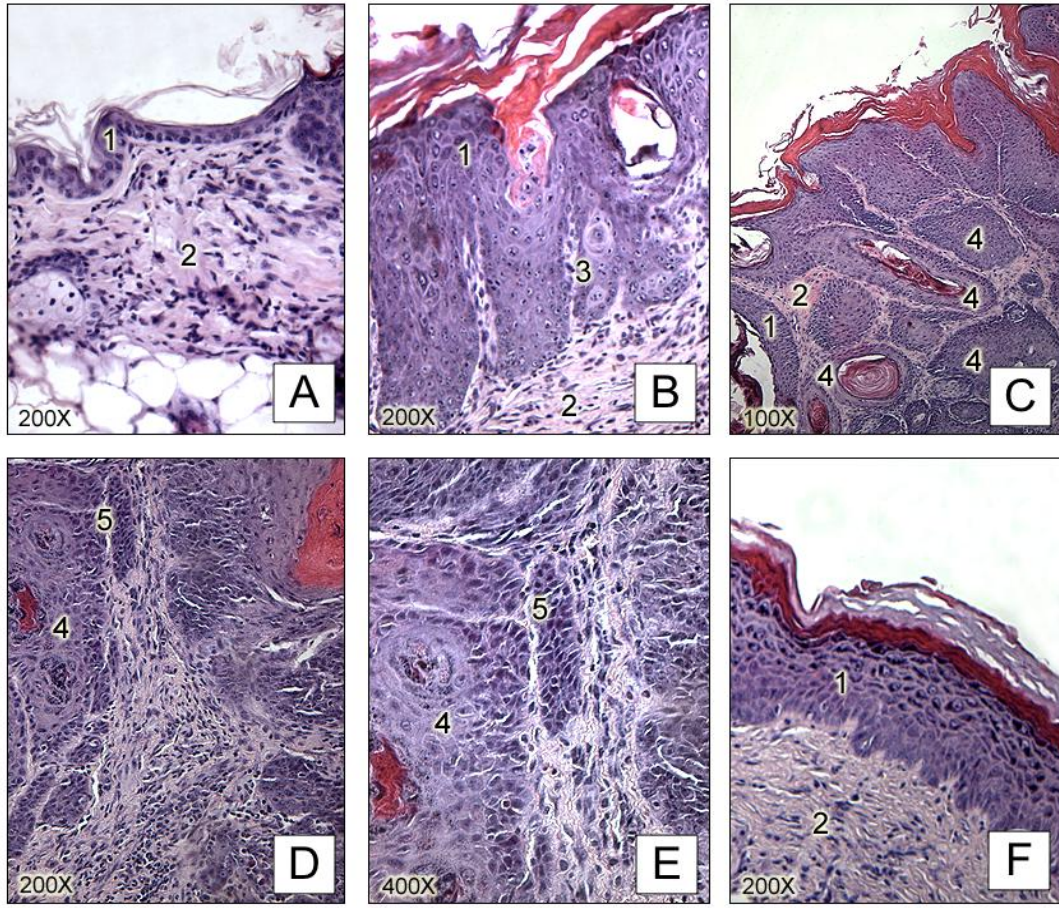


Figure 3. Macroscopic evaluation. (A) Percentage of animals tumor-free throughout the weeks. (B) Tumor area and numbers of tumors (mean ± SD). Confidence interval $p < 0.05\%$. (C) Photos of animals groups.



G	Hypertrophic Actinic Keratosis	Carcinoma <i>in situ</i>	Squamous cell Carcinoma	Basal plus Squamous cell Carcinoma	Inflammatory cells
Control (n=11)	++	+	+++	+	+++
Citral 0.1% (n=6)	+	+	++	-	++
Citral 0.5% (n=9)	+	-	+	-	++
Citral 1% (n=10)	+	-	-	-	+

Figure 4. Histological evaluation (H&E). (A) control group with normal epidermis (1) and normal derm (2) (400x). (B) Carcinoma in situ or Cutaneous Bowen's disease (3), (C-E) Irradiated control group with basal plus squamous cell carcinoma. (4) squamous cell carcinoma. (5) Basal cells carcinoma (100x, 200x, 400x). (F) Irradiated group treated with citral 1% with Hypertrophic Actinic Keratosis (400x). (G) Average of results obtained by histological examination using crosses method. 0 (-) absent, 1 (+) mild, 2 (++) moderate and 3 (+++) severe.

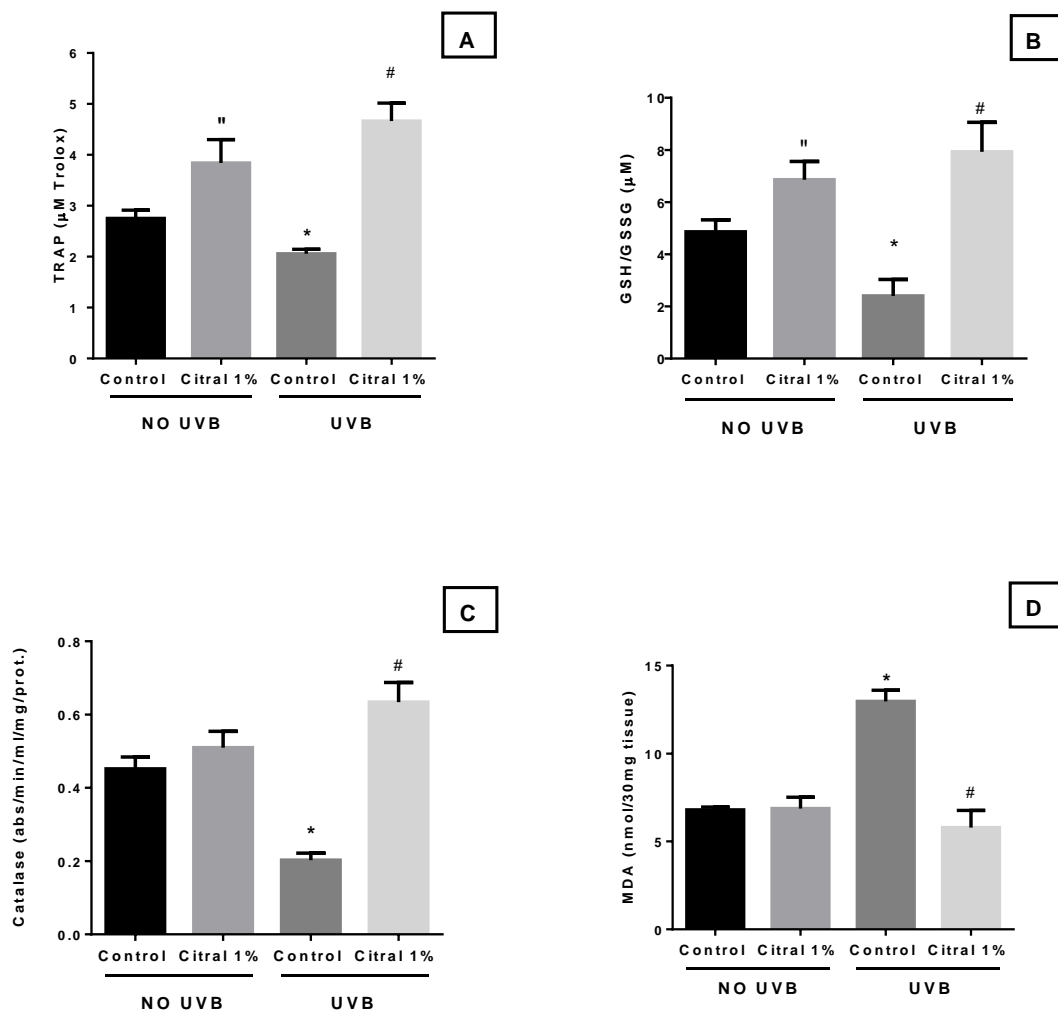


Figure 5. Oxidative stress parameters. (A) Skin total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP). (B) Redox status expressed as GSH/GSSG. (C) Skin catalase activity. (D) Skin malondialdehyde (MDA). Results are expressed in mean \pm SD. Confidence interval $p < 0.05\%$, (* control UVB compared to control, # citral 1% compared to control UVB, " citral 1% no irradiated compared to control no irradiated).

Cytokines	No UVB		UVB	
	Control	Citral 1%	Control	Citral 1%
TNF α	0.59 \pm 0.37	0.39 \pm 0.31	3.03 \pm 0.93 *	0.25 \pm 0.20 #
INF γ	2.17 \pm 0.63	2.89 \pm 1.15	5.52 \pm 1.63 *	2.60 \pm 0.85 #
IL-1B	5.92 \pm 2.78	7.84 \pm 1.99	23.29 \pm 4.45 *	8.67 \pm 3.06 #
IL-4	6.81 \pm 2.28	7.47 \pm 0.47	21.74 \pm 7.59 *	7.01 \pm 1.83 #
IL-10	22.89 \pm 3.99	20.83 \pm 1.95	37.60 \pm 6.58 *	21.76 \pm 4.73 #
IL-23	10.26 \pm 4.02	12.29 \pm 3.45	15.63 \pm 3.91	12.43 \pm 3.40

Table 1. Cytokines measurement. (IL-1B, TNF- α , INF γ , IL-4, IL-10, IL-23). Results are expressed in mean \pm SD. Confidence interval $p < 0.05\%$, (*control UVB compared to control. #compared to control UVB).

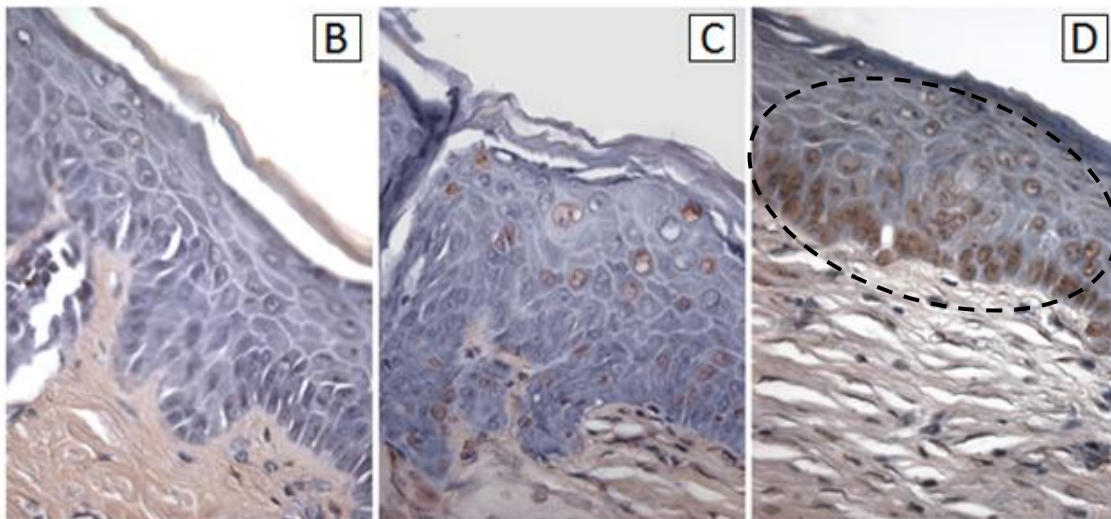
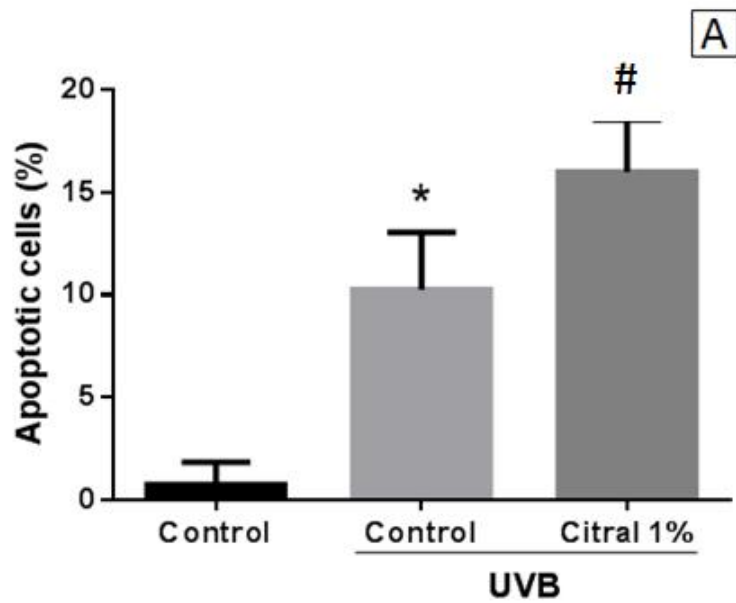


Figure 6. Apoptosis evaluation. (A) Percent apoptotic cells. Representative pictures (TUNEL), 400x. (B) Control group. (C) Irradiated control group. (D) Irradiated group treated with citral 1%. Results are expressed in mean \pm standard deviation (\pm SD). Confidence interval $p < 0.05\%$, (*control UVB compared to control. # citral 1% compared to control UVB).

References

1. INCA, Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil (Pele). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/por-incidencia.asp> . Accessed on January 20, 2016.
2. Orázio J, Jarrett S, Ortiz AA, Scott T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 12222-12248; 2013.
3. WHO. World Health Organization. Ultraviolet radiation and the INTERSUN Programme. Disponível em: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. Accessed on February 10, 2016.
4. Armstrong BK, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology B*, Lausanne, v. 63, p. 8-18, Oct. 2001
5. Martinez, MAR, Francisco G, Cabral LS, Ruiz, IRG, Neto CF. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 81(5):405-19. 2006.
6. Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of investigative dermatology*, Baltimore, v. 126, n. 12, p. 2565-2575, Dec.2006.
7. Wright, T I, Spencer JM, Flores FP. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. *J am acad dermatol*, v. 54, p. 947-949. 2006.
8. Leal T C A B, Freitas S P, Silva JF, Carvalho AJC. Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim cidreira

[*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf] em diferentes idades. *Rev Bras Pl Med*, v.5, p. 61-64, 2003.

9. Dudai N, Weinstein Y, Krup M, Rabinsk T, Ofir R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med*, v.71(5), p. 484-488, 2005.
10. Mazo AB, Sánchez FM, Gomez AI, Martínez CM, Iniesta JA, Compan V, Cremades, MB, Yague J, Ortiz ER, Antón J, Buján S, Couillin I, Brough, D, Arostegui JI, Pelegrín P. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nature Immunology*, 738–748. 2014.
11. Song Y, Zhao H, Liu J, Fang C, Miao R. Effects of Citral on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Inflammation*. Dezembro, 2015.
12. Shen Y, Sum Z, Guo X. Citral inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating PPAR- γ . *European Journal of Pharmacology*, 747., 45–5. 2015.
13. Ka SM, Lin JC, Lin TJ, Liu FC, Chao LK, Ho CL, Yeh LT, Sytwu HK, Hua KF, Chen A. Citral alleviates an accelerated and severe lupus nephritis model by inhibiting the activation signal of NLRP3 inflammasome and enhancing *Nrf2* activation. *Arthritis Research & Therapy*. 17:331. 2015.
14. Patel PB, Thakkar VR, Patel JS. Cellular Effect of Curcumin and Citral Combination on Breast Cancer Cells: Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *Journal of Breast Cancer*. 18(3): 225-234, 2015.

15. Heydorn S, Menné T, Andersen KE, Bruze M, Svedan C, White IR, Basketter DA. Citral a fragrance allergen and irritant. Contact Dermatitis. 2003 Jul;49(1):32-6.
16. Phillips J, Medlin TM, Sonavane K, Ekshyyan O, Mclarty J, Cherieann N. Curcumin Inhibits UV Radiation-Induced Skin Cancer in SKH-1 Mice. Otolaryngology -- Head and Neck Surgery. v.. 148 n°. 5 797-803. 2013.
17. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxilin and eosin staining for tissue and cell sections. CSH Protoc 2008.
18. Koyuncuer A. Histopathological evaluation of nonmelanoma skin cancer. World Journal of Surgical Oncology 2014 12:159.
19. Repetto M, Reides C, Gomes, MLC, Costa M, Griemberg G, Liesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. Clinica chimica acta 255 (2): 107-117. 47. 1996.
20. Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, Colado SAN, Cecchini AL, Cecchini R. "Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy." Breast cancer research and treatment 133(1): 89-97. 2012.
21. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem. 1969; 27: 502–22.
22. Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol. 105: 121-126.
23. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RL. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-72.

24. Miller G. Protein determination of large numbers of samples. *Anal Chem.* 1959; 31: 964.
25. Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:251-256.
26. Cecchini, R; Aruoma, OI; 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. Artifacts in the thiobarbituric acid test. *Free Radical Research Communications, Switzerland*, v. 10, n. 415, p. 245-258, 1990.
27. Chaouki W, Leger DY, Liagre B, Benytout JL, Hmamouchi M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells, *FundamClin Pharmacol.* 2009; 23: 549-56.
28. Connor MJ. Modulation of tumor promotion in mouse skin by the food additive citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal). *Cancer Lett.* 199; 56 (1): 25-8.
29. Terra VA, Souza-Neto FP, Pereira RC, Silva TNX, Costa ACC, Luiz RC, Cecchini R, Cecchini AL. Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2012; 109: 34–41.
30. Li W, Khor TO, Xu C. Activation of *Nrf2*-antioxidant signaling attenuates NF κ B-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2008; 76:1485-1489.

31. Nguyen T, Nioi P, Pickett, CB. The *Nrf2*-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress: *J Biol Chem*. 284 (20): 13.291-13.295. 2009.
32. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(11): 1603–1616.
33. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4.ed. New York: Oxford, 2007.
34. Aguiar A, Ferraz A, Contreras D, Rodríguez J. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. *Quím. Nova* v..30 nº.3. 2007.
35. Bachiega, TF; Sforcin JM. Lemogras and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 137 (2011) 909– 913.
36. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001; v. 107, Number 1.
37. Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- κ B, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1996 93: 3308-3312.
38. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 1999; 18(49):6853-66.
39. Shin JW, Surh YJ; Kundu JK, Liu L. Ultraviolet B radiation activates NF- κ B and induces iNOS expression in HR-1 hairless mouse skin: role of I κ B kinase- β . *Chang EJ1. Mol Carcinog*. 2011 Apr;50(4):310-7..

40. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries, *Biochem Pharmacol.* 2000; 59:13-23.
41. Hwang H; Choi SY; Kim TY. IL-4 Suppresses UVB-induced Apoptosis in Skin. , *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, V.. 40, No. 1, January 2007, pp. 36-43
42. Rafferty TS; Walker C; Hunter JAA; Beckett GJ; McKenzie RCJAA Inhibition of ultraviolet B radiation-induced interleukin 10 expression in murine keratinocytes by selenium compounds *British Journal of Dermatology* 2002; 146: 485–489
43. Rivas JM; ULLRICH SE. The role of IL-4, IL-10, and TNF-a in the immune suppression induced by ultraviolet radiation. *J Leuk Biol*1994; 56: 769–75.
44. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis – the p53 network. *Journal of Cell Science.* 2003; 116: 4077-4085.
45. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
46. Katiyar, SK. Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. *Arch Biochem Biophys.* 2011 April 15; 508(2): 152–158.
47. Burns, EM; Kathleen LT; Riggenbach JA; Kusewitt DF; Young, GS; Oberyszyn TM. Extended UVB Exposures Alter Tumorigenesis and Treatment Efficacy in a Murine Model of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Skin Cancer*, V.ume 2013, Article ID 246848. 2013.
48. Hill NT; Gracia-Maldonado GH., Leonard MK; Harper AR; Tober KL; Oberyszyn TM; Kadakia MP. Role of Vitamin D3 in Modulation of

DNp63a Expression during UVB Induced Tumor Formation in SKH-1 Mice. PLOS ONE, 2014, V. 9.

49. Mittal A; Piyathilake C; Hara Y; Katiyar SK. Exceptionally High Protection of Photocarcinogenesis by Topical Application of (–)-Epigallocatechin-3-Gallate in Hydrophilic Cream in SKH-1 Hairless Mouse Model: Relationship to Inhibition of UVB-Induced Global DNA Hypomethylation. *Neoplasia* . V.. 5, No. 6, November/December 2003, pp. 555 – 565

ANEXO A

Carta de Aprovação do Comitê de Ética



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 139/2015

Londrina, 21 de Julho de 2015.

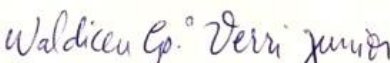
Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UJEL reunida em 19 de Maio de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Modelo experimental de carcinoma espinocelular de pele: *Screening* biológico de substâncias quimioprotetoras e perfil oxidativo local/sistêmico**", registrado sob o processo CEUA nº6738.2015.40, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 112 camundongos Hairless (56 machos e 56 fêmeas), com idade entre 8 e 20 semanas, pesando de 20 a 30 g e provenientes da Universidade de São Paulo - USP. O projeto tem como objetivo avaliar *in vivo* o efeito quimioprotetor do citral e da metformina na promoção do câncer de pele não melanoma. Para tanto, os animais serão divididos em grupos e tratados com uma dose diária de metformina (40mg/ mL, 50µL, intraperitoneal) ou PBS (50µL, i.p.) antes da irradiação, assim como nos dias remanescentes da semana, durante as 15 semanas. Os camundongos serão submetidos à irradiação UVB para o desenvolvimento de câncer de pele não-melanoma para a caracterização de biomarcadores oxidativos no sangue e de crescimento celular no tecido tumoral. As análises serão realizadas na pele e no sangue dos animais expostos à irradiação, as lesões com margem serão analisadas por histopatologia e processadas para pesquisa de estresse oxidativo e nitrosativo e a análise de 3-nitrotirosina será feita por imunohistoquímica do tecido tumoral e da margem normal do tecido para verificar a participação de espécies reativas de oxigênio *in situ*. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 10 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UJEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,


Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Merri Junior
Coordenador da CEUA/UJEL