



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO PINHEIRO DE SOUZA NETO

**EFEITO DA METFORMINA EM PARÂMETROS OXIDATIVOS
E IMUNOLÓGICOS EM MODELO MURINO DE IRRADIAÇÃO
AGUDA POR UVB**

FERNANDO PINHEIRO DE SOUZA NETO

**EFEITO DA METFORMINA EM PARÂMETROS OXIDATIVOS
E IMUNOLÓGICOS EM MODELO MURINO DE IRRADIAÇÃO
AGUDA POR UVB**

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

Londrina
2018

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

Souza Neto, Fernando Pinheiro de Souza Neto.

Efeito da metformina em parâmetros oxidativos e imunológicos em modelo murino de irradiação aguda por UVB. / Fernando Pinheiro de Souza Neto Souza Neto. - Londrina, 2018.
69 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani Armani.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Metformina - Tese. 2. Estresse oxidativo da pele - Tese. 3. UVB - Tese. 4. Imunossupressão por UVB - Tese. I. Armani, Alessandra Lourenço Cecchini Armani. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

FERNANDO PINHEIRO DE SOUZA NETO

**EFEITO DA METFORMINA EM PARÂMETROS OXIDATIVOS E
IMUNOLÓGICOS EM MODELO MURINO DE IRRADIAÇÃO AGUDA
POR UVB**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa Dra Alessandra Lourenço
Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Profa Dra Poliana Camila Marinello
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa Dra Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa Dr. Luiz Osório Leiria
Universidade de Campinas – UNICAMP

Londrina, 20 de Julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir conhecer pessoas especiais por onde passei, aprendi com cada uma.

A minha família, que foram meu alicerce mesmo à distância, graças ao amor dedicado a cada um. Aos amigos de república pelos momentos especiais, que levo comigo.

A Prof^a Dr^a Alessandra Lourenço Cecchini Armani, pela imprescindível orientação durante a realização deste trabalho, pela compreensão, paciência e principalmente pela confiança.

Aos colegas e amigos de laboratório, e amigos do transcorrer do curso, por terem participado, marcadamente, desta inesquecível etapa da minha vida: Lucas Freitas, Renato Cardoso, Vanessa Jacobe, Fernanda, Gabriela Pasqual Melo, Larissa, Natalia, Poliana Marinello.

Aos colegas e amigos de laboratório da Argentina, Laboratório de imunologia humoral e doenças humanas (LDHI): Adrian Friedrich, Eliana Cela, Mariela Paz, Juliana Leoni, Martín Ledesma, Valeria, Paula. E ao professor que me deu total apoio, com sua atenção e empenho Prof. Dr. Daniel H. González Maglio.

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

Ao corpo docente do programa em Patologia Experimental, por ter contribuído para a minha formação científica: Prof^a Dr^a Alessandra Lourenço Cecchini Armani, Prof^a Dr^a Eiko Itano Nakagawa, Prof. Dr. Emerson José Venâncio, Prof. Dr. Jair Tonon, Prof^a Dr^a Flávia Alessandra Guarnier, Prof^a Dr^a Ionice Felipe, Prof^a Dr^a Ivete Conchon Costa, Prof^a Dr^a Maria Angélica Ehara Watanabe, Prof. Dr. Mario Augusto Ono, Prof.^a Dr.^a Marli Martins Pinge, Prof^a Dr^a Poliana Camila Marinello, Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz, Prof. Dr. Rubens Cecchini.

Ao Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq),
por possibilitar meu intercâmbio para a Argentina através da bolsa de doutorado
sanduíche.

SOUZA-NETO, FERNANDO PINHEIRO DE. **Efeito da metformina em parâmetros oxidativos e imunológicos em modelo murino de irradiação aguda por UVB.** 2018. 69 f.Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

As radiações ultravioletas (UV) são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas cutâneas. As duas principais radiações que atingem a superfície terrestre, responsáveis por danos ao DNA, são do tipo UVA (315 - 400nm) e UVB (280 – 315nm). Esta última induz a um ambiente pró-inflamatório quando da exposição aguda e imunossupressor quando crônico. Esta ambiguidade de evento a longo prazo induz ao tipo mais incidente de câncer, o de pele. A irradiação UVB atinge principalmente a camada epidérmica da pele, apresentando dois principais mecanismos de dano. Dano de maneira direta através da formação de dímeros de pirimidina, e a indireta, através de danos oxidativos, que se relacionam por produzir um microambiente inflamatório com oxidação de lipídeos, proteínas e mutação gênica. A imunossupressão também faz parte deste quadro caracterizando, assim, a fotocarcinogênese. Apesar da pele possuir um sistema antioxidante eficiente que controla, em parte, o excesso de espécies reativas de oxigênio produzida pela irradiação, a procura por substâncias que reduzam os efeitos danosos da UVB na pele tem sido intensa. Dentre as substâncias tem-se a selenocisteína, N-acetil-cisteína, metformina. A vitamina E, uma das mais estudadas até o momento, busca reduzir os efeitos oxidativos e imunossupressores causados pela irradiação. A metformina, um medicamento vastamente utilizado no tratamento do diabetes do tipo 2, mostrou diminuir a incidência de câncer de mama em mulheres diabéticas que fazem o seu uso. Entretanto, outros estudos conduzidos em pacientes com outros tipos de câncer não encontram a mesma resposta. Em virtude da pouca informação sobre os possíveis mecanismos envolvidos na redução da proliferação celular ou mesmo inibição do desenvolvimento do câncer quando do uso da metformina, o objetivo do presente trabalho foi trazer novas informações sobre os mecanismos desta droga sobre os efeitos inflamatórios, imunológicos e oxidativos causados pela irradiação UVB. Foi utilizado o modelo experimental murino com irradiação aguda UVB (400mJ/cm²) pré-tratado com metformina (90mg/Kg via i.p) por 11 dias. Os grupos foram divididos em: tratados com tampão fosfato salina (C+PBS); pré-tratados com metformina (C+MET); irradiado tratado com PBS (IRR+PBS); e irradiado pré-tratado com metformina (IRR+MET). Após 24h da irradiação o sangue e a pele foram removidos, o perfil redox e a quantificação de algumas citocinas epidérmicas imunomodulatórias foram quantificados. A epiderme foi separada da derme onde foram analisados a atividade metabólica mitocondrial, os níveis de ânion radical superóxido e a quantidade de células de Langerhans. Dentro das análises oxidativas sistêmicas, o malondialdeído (MDA) apresentou-se elevado (p<0.05) no grupo que recebeu irradiação quando comparado ao grupo irradiado tratado com metformina. A análise do perfil oxidativo sistêmico mostrou que apesar da lipoperoxidação eritrocitária não ter sido diferente entre os grupos, o nível de tiol total, no grupo IRR+MET se manteve semelhante ao não irradiado. O contrário ocorreu no grupo IRR+PBS, cujos níveis reduzem significativamente comparado ao seu controle C+PBS (p<0.05). A atividade da catalase está elevada

no grupo IRR+PBS quando comparada ao grupo C+PBS e ao grupo IRR+MET ($p<0.05$). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) é reduzida pela irradiação UVB, em ambos os grupos IRR+PBS e IRR+MET quando comparada aos respectivos controles ($p<0.05$), o tratamento com metformina no grupo IRR+MET não reverteu esta redução. Na pele foi quantificado a lipoperoxidação de membrana, TRAP, atividade da catalase e tiol total. Os níveis de lipoperóxidos do grupo IRR+PBS teve uma redução significativa ($p<0,05$) comparado aos demais grupos. Os lipoperóxidos do grupo IRR+MET não difere dos grupos não irradiados. O tratamento com metformina foi eficaz em aumentar as defesas antioxidantes como TRAP, atividade da catalase e tiol total. O grupo IRR+PBS apresenta uma queda significativa nas defesas antioxidantes comparada ao seu controle C+PBS ($p<0,05$). A atividade metabólica mitocondrial da epiderme foi avaliada, por citometria de fluxo com a sonda DIOC₆ (Iodeto 3-3 dihexiloxacarbocianina). Para a medida da produção de ânions superóxido foi utilizado a sonda MitoSox red. Com o uso das duas sondas foi possível observar que nos grupos tratados a metformina não reverteu a queda de células metabolicamente ativas nem o aumento da produção de ânions superóxido das mitocôndrias nestes grupos. As citocinas imunomodulatórias epidérmicas foram quantificadas e observou-se um aumento da interleucina 10 (IL-10) nos grupos irradiados. Demonstrando o efeito da irradiação como imunossupressor, e a metformina não foi capaz de reverter este quadro. A quantificação das células de Langerhans epidérmicas, por citometria de fluxo, mostrou que a irradiação levou a uma diminuição significativa do número destas células quando comparada ao grupo controle ($p<0,05$). A metformina não alterou este perfil. A análise por hematoxilina e eosina (HE) da pele, no grupo IRR+PBS mostra perda da integridade da epiderme quase que na sua totalidade, diferindo do grupo IRR+MET, onde houve uma recuperação parcial da epiderme. Através do marcador específico para estresse oxidativo, o 4-hidroxinonenal (4-HNE), pode-se observar que o grupo IRR+PBS tem sua marcação mais significativa em nível de epiderme e o grupo IRR+MET apresentou uma marcação mais ao nível de derme, como em folículos pilosos e glândulas exócrinas. O estresse nitrosativo foi avaliado utilizando-se marcação imuno-histoquímica por nitrotirosina (NT). O grupo IRR+PBS apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) para NT em áreas em que a epiderme está intacta comparada ao grupo IRR+MET. A marcação para a proteína p53 demonstrou diferença entre os grupos irradiados. Houve uma marcação mais proeminente em áreas onde a epiderme ainda está intacta no grupo IRR+PBS. No grupo IRR+MET sua marcação é mais restrita em áreas mais profundas como folículo piloso e glândulas exócrinas. Para reportar a imunossupressão induzida por UVB, utilizou-se o teste de hipersensibilidade por contato (CHS), onde avalia-se a resposta dos linfócitos T frente ao sensibilizante chamado oxazolona. A metformina influenciou na melhora da resposta imune pelo teste de CHS. Conclui-se que a metformina diminui o *status* oxidativo sistemicamente e na pele dos animais irradiados, através do aumento das defesas antioxidantes e redução das moléculas oxidadas. A metformina também diminui a imunossupressão induzida pela irradiação UVB, podendo possuir uma participação ativa na diminuição das lesões na pele que poderiam evoluir para uma neoplasia maligna.

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

SOUZA-NETO, FERNANDO PINHEIRO DE. **Effect of metformin on oxidative and immunological parameters in murine model of acute irradiation by UVB**. 2018. 69p. Thesis (Doctorate Degree Thesis) – State University of Londrina, Londrina.

ABSTRACT

Ultraviolet (UV) radiation is primarily responsible for the development of premalignant and malignant cutaneous lesions. The two main radiations that reach the Earth's surface, responsible for DNA damage, are UVA (315-400nm) and UVB (280-315nm). The latter induces a pro-inflammatory environment when acute and immunosuppressive when chronic exposures. This ambiguity of long-term event induces the most incident type of cancer, the skin cancer. UVB irradiation mainly affects the epidermal layer of the skin, presenting two main mechanisms of damage. Direct mechanism through the formation of pyrimidine dimers, and indirect through oxidative damage, which are related by producing an inflammatory microenvironment with oxidation of lipids, proteins and gene mutation. Immunosuppression is also a part of this scenario, thus characterizing photocarcinogenesis. Although the skin possesses an efficient antioxidant system that controls, in part, the excess reactive oxygen species produced by irradiation, the search for substances that reduce the harmful effects of UVB on the skin is still a challenge. Among the substances, selenocysteine, N-acetyl-cysteine and metformin. Vitamin E is one of the most studied to date, seek to reduce the oxidative and immunosuppressive effects caused by irradiation. Metformin, a drug widely used in the treatment of type 2 diabetes, has been shown to decrease the incidence of breast cancer in women with diabetes who makes the use of it. However, other studies conducted in patients with other types of cancer are contradictory. Due to the lack of information on the possible mechanisms of metformin involved in the reduction of cell proliferation or inhibition of cancer development, the objective of the present study was to provide new information on the mechanisms of this drug on the inflammatory, immunological and oxidative effects caused by UVB irradiation. The experimental model murine with acute UVB irradiation (400mJ / cm²) pretreated for 11 days with metformin (90mg / kg i.p.) was used. The groups were divided into: treated with phosphate buffered saline (C+PBS); pretreated with metformin (C+MET); irradiated with PBS (IRR+PBS); and irradiated and pretreated with metformin (IRR+MET). After 24h of irradiation the blood and skin were collected, the redox profile and quantification of some immunomodulatory epidermal cytokines were quantified. The epidermis was separated from the dermis where mitochondrial metabolic activity, superoxide anion levels and the amount of Langerhans cells were analyzed. The systemic oxidative analyzes, malondialdehyde (MDA) was increased (p <0.05) in the irradiated group when compared to the irradiated group pretreated with metformin. The analysis of the systemic oxidative profile showed that although the erythrocyte lipoperoxidation was not different between the groups, the total thiol level in the IRR+MET group remained similar to the non-irradiated group. The opposite occurred in the IRR+PBS group, whose levels reduced significantly compared to their C+PBS control (p <0.05). Catalase activity is elevated in the IRR+PBS group when compared to the C+PBS group and the IRR+MET group (p <0.05). The activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) is reduced by UVB irradiation in both the IRR+PBS and IRR+MET groups when compared to the respective controls (p <0.05), treatment with metformin in the

IRR+MET group did not reverse this reduction. Membrane lipoperoxidation, TRAP, catalase activity and total thiol was quantified in the skin homogenate. The lipoperoxide levels of the IRR+PBS group had a significant reduction ($p < 0.05$) compared to the other groups. The lipoperoxides of the IRR+MET group did not differ from the non-irradiated groups. Pretreatment with metformin was effective in increasing antioxidant defenses such as TRAP, catalase activity and total thiol. The IRR+PBS group showed a significant decrease in antioxidant defenses compared to their C+PBS control ($p < 0.05$). The mitochondrial metabolic activity of the epidermis was evaluated by flow cytometry with the probe DIOC6 (Iodide 3-3 dihexyloxacarbocyanin). For the measurement of superoxide anion production, the MitoSox red probe was used. With the use of the two probes it was possible to observe that in the treated groups metformin did not reverse the fall of metabolically active cells nor the increase of superoxide anion production of the mitochondria in these groups. Epidermal immunomodulatory cytokines were quantified and an increase of interleukin 10 (IL-10) was observed in the irradiated groups. Demonstrating the effect of irradiation as an immunosuppressant, and metformin was not able to reverse this condition. Quantification of epidermal Langerhans cells by flow cytometry showed that the irradiation led to a significant decrease in the number of these cells when compared to the control group ($p < 0.05$). Pretreatment with metformin did not change this profile. Hematoxylin and eosin (HE) analysis of the skin in the IRR+PBS group showed loss of epidermal integrity almost entirely, differing from the IRR+MET group, where there was a partial recovery of the epidermis. Through the specific label for oxidative stress, 4-hydroxynonenal (4-HNE), it was; observed that the IRR+PBS group has its most significant label in the epidermis level and the IRR+MET group showed a more labelling to the level of dermis, as in hair follicles and exocrine glands. The nitrosative stress was evaluated using nitrotyrosine (NT) immunohistochemical labelling. The IRR+PBS group showed a significant increase ($p < 0.05$) in NT areas where the epidermis is intact compared to the IRR+MET group. Labelling for the p53 protein demonstrated difference between the irradiated groups. There was a more prominent labelling in areas where the epidermis is still intact in the IRR+PBS group. In the IRR+MET group the labelling is more restricted in deeper areas such as hair follicle and exocrine glands. To report UVB-induced immunosuppression, the contact hypersensitivity test (CHS) was used to evaluate the response of T lymphocytes to the sensitizer called oxazolone. Our results show that metformin improved the UVB induced immunosuppression. It is concluded that metformin decreases the oxidative status systemically and on the skin of the irradiated animals, by increasing the antioxidant defenses and decreasing the oxidation of the molecules. Metformin also decreases the immunosuppression induced by UVB irradiation and may have an active participation in the reduction of skin damage that could progress to a malignant neoplasia.

Key Words: Skin. Oxidative stress. UVB. Immunosuppression. Acute irradiation. Metformin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Formação das principais espécies reativas na pele.....	19
Figura 2 -	Células de Langerhans (LC) e imunidade adaptativa	23
Figura 3 -	Mecanismos de ação da metformina, como anti-hiperglicemiante.....	27

LISTA DE SIGLAS

CAT	Catalase
CPD	Dímero de pirimidina ciclobutil
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSH-Rd	Glutathiona redutase
GSSG	Glutathiona oxidada
GT	Glutathiona total
4-HNE	4-Hidroxi-nonenal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IκB	Inibidor nuclear kappa B. (Inibe o fator de transcrição nuclear Kapa B, NF- κB)
L•	Radical de ácido graxo
LOO•	Radical peroxil
LO•	Radical alcoxil
LOOH	Peróxido orgânico
MDA	Dialdeído malônico
MPO	Mieloperoxidase
NrF-2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NF- κB	Fator nuclear Kapa B
NO•	Óxido nítrico
NT	Nitrotirosina
¹ O ₂	Oxigênio singlete
•O ₂ ⁻	Ânion radical superóxido
•OH	Radical hidroxil
ONOO-	Peroxinitrito
PCs	Proteínas carbonílicas
p53	Gene supressor tumoral de 53kDa
QL	Quimiluminescência

SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRAP	Parâmetro antioxidante quelante de radical total
URL	Unidade relativa de luz
USOD	Unidades de SOD
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Radiação	12
1.2	UVB e radicais livres	14
1.3	Imunossupressão por UVB.....	19
1.4	Metformina	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo Geral.....	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	CONCLUSÕES	30
4	REFERÊNCIAS	32
	ANEXOS	38
	ANEXO A. Informações sobre a revista Journal of Dermatological Science	38
	ANEXO B. Artigo: Metformin prevents skin and systemic oxidative damage and immune alterations induced by UVB radiation.....	41

1.INTRODUÇÃO

1.1 Radiação

A luz solar é composta por um espectro eletromagnético muito amplo, com diferentes comprimentos de onda, desde a faixa de raio-X até a radiação infravermelha. Algumas destas radiações são absorvidas no espaço ou pela atmosfera terrestre, chegando em nossa superfície uma parcela desta radiação, responsável pelo aquecimento da Terra e pela produção de comida (RAVEN; RAY, SUSAN, 2014). Mas a radiação solar pode desencadear danos em células eucariontes, quando determinada faixa de comprimento de onda as lesionam, particularmente células da pele, por serem naturalmente expostas a irradiação solar (RAVEN, RAY, SUSAN, 2014; CELA, E. M. et al. 2015). Os efeitos da irradiação solar são muitos e incluem danos ao DNA, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), alterações mitocondriais e complexas mudanças no sistema imunológico local e sistêmico (HALLIDAY, 2005; TERRA et al., 2012; CELA, et al., 2015; CELA et al., 2018).

A radiação solar é constituída por radiação ultravioleta, visível e infravermelho. A irradiação ultravioleta possui um comprimento de onda menor, que, com maior energia, reage com biomoléculas como o DNA (HALLIDAY,2005). Em humanos sabe-se que a irradiação ultravioleta induz, a danos oxidativos que levam a inflamação, imunossupressão e mutação gênica, e que estas alterações biológicas são responsáveis pela fotocarcinogênese (HALLIDAY, 2005). Estudos epidemiológicos revelam que pessoas que trabalham sob exposição solar apresentam maior incidência de problemas de pele, como fotoenvelhecimento e o desenvolvimento de cânceres (HARRIS, 2005). As manifestações da exposição aguda incluem eritema e queimadura solar. A exposição crônica leva ao envelhecimento e é considerada um dos agentes mais importantes para o desenvolvimento de doenças cutâneas malignas (PODDA et al., 1998; SAIJA et al., 2000).

A radiação ultravioleta que chega a superfície terrestre é constituída em sua grande maioria, aproximadamente 95%, pela radiação UVA (321-400nm) e uma pequena porcentagem (< 5%) de UVB (281-320nm) (TEWARI et al., 2014; DELINASIOS et al., 2018). Com características diferentes quanto ao estrato da pele

que cada irradiação atinge, a UVA penetra com maior profundidade, chegando em nível de derme, e a UVB é mais restrita, atinge a epiderme (CELA et al., 2015). A irradiação (UVA e UVB), é a principal responsável pela maioria das lesões cutâneas com a capacidade de induzir transformações malignas em células da pele e na subsequente progressão formando tumor, devido a capacidade de induzir dano ao DNA e mutações nas células expostas (DELINASIOS et al., 2018).

A irradiação UVB e UVA interagem com o DNA gerando fotoprodutos diméricos, descritos pela primeira vez em 1958, onde o DNA absorve diretamente a energia da irradiação formando os dímeros, sendo o principal o dímero de ciclobutil pirimidina (CPD), em que uma ligação covalente entre o carbono 5 e 6 de duas pirimidinas adjacentes é formada (PREMI et al., 2015). Reparos incorretos destes danos causados pela irradiação podem levar a mutações celulares que colabora com os casos de câncer de pele do tipo melanoma e não melanoma (MARROT; MEUNIER, 2008; PREMI et al., 2015). Falha no reparo do CPD é uma das principais causas do câncer de pele (JANS et al., 2005). Embora nossas células tenham mecanismos para deletar ou mesmo reparar os danos de DNA causados pela irradiação, esses mecanismos de reparo podem ser ineficientes, permitindo que ocorra mutação de DNA sem que haja o devido reparo (MARROT; MEUNIER, 2008). A principal mutação causada pela irradiação é em um gene supressor tumoral, p53, em que a proteína codificada por este gene é essencial para regular o ciclo celular. Ela atua inibindo o crescimento celular indevido. Esta mutação pode estar presente em até 60% dos cânceres de pele do tipo carcinoma de células basais (BOLSHAKOV et al., 2003; MARROT; MEUNIER, 2008). Além dos danos nucleares, a radiação UVB promove alterações mitocondriais, levando ao desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons, perda da polarização da membrana mitocondrial e aumento na produção de ânions superóxido (GONZÁLEZ MAGLIO et al., 2011; CELA et al., 2018).

Um estudo recente sobre a formação dos dímeros de pirimidina, apresentou uma nova via de formação do CPD, não mais de forma direta durante a exposição à UV mas de forma tardia, em que melanócitos irradiados com UVA formaram “dark” CPD, por um mecanismo dependente da formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (formando peroxinitrito) (PREMI et al., 2015). Demonstraram que após 3 horas de cessado a irradiação houve a formação de CPD, dependente de

espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (PREMI et al., 2015). Em outro estudo foi demonstrado que a formação de “dark” CPD acontece também em queratinócitos humanos irradiados com UVA, e que o tratamento com vitamina E inibiu sua formação (DELINASIOS et al., 2018). A Vitamina E reduziu as espécies oxidantes e aumentou os níveis de GSH dos queratinócitos irradiados, portanto, para os queratinócitos humanos a utilização de um antioxidante foi imprescindível para a diminuição dos efeitos deletérios indiretos ao DNA, mediados pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (MARROT; MEUNIER, 2008; DELINASIOS et al., 2018).

Considerando que a pele e outros tecidos estão sujeitos ao estresse oxidativo (KOHEN; GATI, 2000), muitos autores sugerem que o efeito benéfico dos anti-oxidantes tópicos, sejam uma opção para diminuir os danos na pele mediados pela radiação UVB e UVA (HALLIDAY, 2005; DELINASIOS et al., 2018).

1.2 UVB E RADICAIS LIVRES

O estresse oxidativo (EO), termo que não existia na literatura antes dos anos 70, relaciona-se ao metabolismo do O_2 (oxigênio molecular) gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre as mais comuns estão, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$) e radical ânion superóxido ($\cdot O_2^-$), responsáveis por danos às biomoléculas como proteína, DNA e lipídeos. Por outro lado, o organismo utiliza antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos, para equilibrar o ambiente oxidativo (GHEZZI et al., 2017). Os principais antioxidantes enzimáticos incluem a SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e GPx (glutathione peroxidase) e os antioxidantes não enzimáticos de baixa massa molecular como a vitamina C, vitamina E e o tripeptídeo glutathione (GSH) (GASPAROVIC et al., 2017; GHEZZI et al., 2017). O aumento das EROs pode ser devido ao excesso de sua produção ou a diminuição de antioxidantes, associa-se o conceito de EO em inúmeras patologias como artrite reumatoide, diabetes, câncer, Alzheimer, acidente vascular cerebral dentre outras. (GASPAROVIC et al., 2017; GHEZZI et al., 2017). Sabe-se que o estresse oxidativo possui o potencial de causar dano a biomoléculas, contribuindo

para o desenvolvimento e progressão de doenças como o câncer e doenças neurodegenerativas (CIPAK et al., 2017; GUÉRAUD, 2017).

Muitos processos celulares relacionados ao câncer ocorrem com envolvimento de espécies reativas de oxigênio, como na proliferação celular, apoptose, diferenciação celular, migração de células e danos ao DNA (GUÉRAUD, 2017). A quantificação direta das EROs é considerada difícil, por a maioria das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio apresentam um tempo de meia vida curto, algo em torno de microssegundos a segundos. As exceções são o radical hidroxil (\cdot OH) que apresenta uma meia vida mil vezes menor (nano segundo), o peróxido de hidrogênio e o hipoclorito (milissegundos a segundos), ambos apresentando tempo de meia vida superior por serem moléculas mais estáveis (BACHI; DALLE-DONNE; SCALONI, 2012). Entretanto, existem técnicas que visam a quantificação de seus principais produtos, ou seja, derivados do ataque às biomoléculas como DNA, lipídeos de membrana e proteínas (BACHI; DALLE-DONNE; SCALONI, 2012; THANAN et al., 2014; GUÉRAUD, 2017).

Malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), acrolina e isoprostanos, são os principais produtos derivados da peroxidação lipídica. Dentre estes produtos, o MDA e 4-HNE são os mais estudados por sua alta toxicidade, e por serem altamente eletrofílicos, reagem com proteínas e DNA, formando proteínas carbonílicas e adutos de DNA. A oxidação de DNA pode ser verificada pela quantificação 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), demonstrando dano oxidativo em DNA, tanto em níveis plasmáticos quanto urinários (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005; THANAN et al., 2014; GUÉRAUD, 2017). Por ser mais estável o MDA é o biomarcador mais comum utilizado para determinar o estresse oxidativo de um organismo (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Mas há outros produtos que provêm da oxidação causada pelas espécies reativas. Estes produtos podem ter ação citotóxica e genotóxica, por serem mais estáveis, predispondo ao câncer, como é o caso do aumento de (4-HNE) que favorece ao aparecimento de câncer colón retal (GUÉRAUD, 2017). Os produtos derivados da oxidação de biomoléculas se difundem para outras células e até para outros tecidos, como os produtos formados a partir da oxidação de lipídeos poli-insaturados pelas (ERO/ERN). A formação de 4-HNE origina-se principalmente da oxidação dos ácidos graxos linoleico e araquidônico (GUÉRAUD, 2017). Portanto, as espécies reativas e

seus produtos, advindos de biomoléculas oxidadas, apresentam um papel importante na patogênese, e na sinalização celular (BACHI; DALLE-DONNE; SCALONI, 2012; GUÉRAUD, 2017).

Apesar do raciocínio lógico para a solução das diversas patologias seria impedir a formação e proliferação das espécies reativas de oxigênio, através do uso de antioxidantes, hoje sabe-se que estas possuem um papel crucial na sinalização celular tanto para induzir como para frear a proliferação celular. Entretanto, dentro desta lógica, um único medicamento, o edaravone foi aprovado para esclerose lateral amiotrófica e acidente vascular cerebral, e é comercializado no Japão, possui ação *scavenger* de radicais livres, ou seja, a função de antioxidante (ABE et al., 2014; GHEZZI et al., 2017). Contrariando os efeitos benéficos dos antioxidantes, dados recentes mostram que o uso de antioxidantes pode piorar o quadro em determinadas patologias. Observou-se que o carcinoma de pulmão, tanto humano quanto murino, o uso de antioxidantes aumentou o crescimento e a mortalidade em um padrão dose dependente (CHANDEL; TUVESON, 2014). Guarnier e colaboradores mostrou um aumento de até 67% no tamanho do tumor sólido de Walker-256 quando ratos Wistar foram tratados com vitamina E (GUARNIER et al., 2010).

Na literatura há muita controvérsia quanto ao papel do estresse oxidativo no diabetes tipo 2. Relata-se que o estresse oxidativo poderia estar participando tanto da patogênese da doença quanto da sua progressão sistêmica com insuficiência renal, aterosclerose, retinopatias, entre outras manifestações. (HOUSTIS; ROSEN; LANDER, 2006; FINKEL, 2011)

Uma hipótese contrária a esta para a patogênese da diabetes tipo 2, seria a necessidade de um ambiente oxidativo para haver a formação de pontes dissulfeto na formação da estrutura terciária da insulina (WATSON, 2014). Portanto, a resistência à insulina se basearia na incapacidade da formação de pontes dissulfeto para a produção da insulina, pela redução nos níveis de estresse oxidativo.

Esta controvérsia observada na patogênese da diabetes tipo 2, poderia ser melhor compreendida se nos atentarmos ao mecanismo de ação do principal medicamento utilizado para esta enfermidade, que é a metformina. Estudos murinos no qual foram utilizados metformina demonstraram o aumento da síntese do fator de transcrição NRF-2 que controla as vias das principais enzimas antioxidantes e bloqueia a via

NFkB (fator nuclear kappa B) que controla a síntese de inúmeras moléculas envolvidas na geração da resposta inflamatória (HIRSCH; ILIOPOULOS; STRUHL, 2013). Outros estudos relacionam a ação anti-hiperglicemiante da metformina a um potencial efeito quimioterápico em alguns tipos de cânceres, por melhorar a modulação de células T CD8 de memória e pelo seu efeito inibitório de vias específicas da glicose e do metabolismo anabólico que ativam NFkB (PEARCE et al., 2009; HIRSCH; ILIOPOULOS; STRUHL, 2013). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o uso da metformina, em modelo de melanoma murino, levou ao aumento do potencial redox sistêmico diminuindo significativamente o crescimento tumoral (SOUZA-NETO et al., 2017). Deste modo, podemos entender que a metformina altera o crescimento celular e de seu uso em potencial como adjuvante no tratamento ou prevenção de neoplasias.

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

Em um estudo para tratar os efeitos deletérios da luz UVB em camundongos, utilizou de células tronco provenientes da camada da derme da pele, estas células protegeram contra os danos causados pela irradiação UVB (XIAN et al., 2017). A proteção celular ocorre pelo aumento da expressão do NRF-2 (Nuclear fator (erythroid-derived 2)-like 2), fator este que a luz UVB inativa significativamente. Com a diminuição de NRF-2 eleva-se as espécies reativas de oxigênio, pois NRF-2 tem um papel crítico como defesa antioxidante (XIAN et al., 2017). NRF-2 é um dos principais fatores de transcrição expresso em todas as células. É responsável pela expressão de moléculas constitutivas e induzíveis da resposta antioxidante, aumentando a expressão de genes de enzimas antioxidantes como: NADP(H), GST (glutathione S-transferase), SOD (superóxido dismutase), (GPX glutathione peroxidase) dentre outras (BUELNA-CHONTAL; ZAZUETA, 2013).

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

- 1- As interações entre as ondas provenientes da radiação solar e a pele podem ocorrer por meio de ação direta da radiação sobre as estruturas celulares,

como faz a UVB ou UVA (HARRIS, 2005). O $^1\text{O}_2$, uma espécie eletronicamente excitada, pode ser produzida por diversas reações químicas e fotoquímicas e devido a sua eletrofilicidade, pode reagir com compostos insaturados, sulfetos e aminas, sendo os ácidos graxos insaturados, DNA e proteínas importantes alvos biológicos (Figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

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

3 - As espécies reativas podem ser formadas, ainda, indiretamente, por reações da luz com fotossensibilizadores endógenos cutâneos, como por exemplo, o ácido urocânico (BICKERS; ATHAR, 2006). Como resultado da sensibilização endógena pode ocorrer a produção do $\cdot\text{O}_2^-$ ou $^1\text{O}_2$ (Figura 1) (MARTIN; BURCH, 1990).

4 - Moléculas oxidantes também podem ser geradas devido aos danos na mitocôndria pela radiação UVB, produzindo $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$ (WELLER et al., 2003).

Maglio e colaboradores (2005) demonstraram que a irradiação UVB ($200\text{mJ}/\text{cm}^2$) em camundongos *hairless* produz alterações morfológicas na pele por causa de uma disfunção mitocondrial com conseqüente aumento de $\cdot\text{O}_2^-$ provavelmente mediado pelo aumento de NO. Em outro estudo a irradiação UVB demonstrou que o NO possui uma participação importante tanto no dano à pele, quanto na lipoperoxidação e na proliferação celular, sendo todo o quadro revertido usando-se um inibidor de NOS, a aminoguanidina (TERRA et al., 2012). Assim o papel do NO na lesão da pele induzida por UVB depende de fatores como, dose de UVB e tempo após a irradiação. Esta aparente contradição em que o NO pode assumir, hora proteção hora como danoso à pele, nos mostra as vias complexas onde pode atuar (Figura 1).

5 - Uma outra situação é que, apesar da luz UV não depositar energia suficiente nas moléculas de água para ionizá-las, se o H_2O_2 estiver disponível, a UVB causa fissão homolítica, gerando o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), altamente reativo (Figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

6 - Outro mecanismo de formação de espécies reativas foi sugerido por Heck e cols., 2003, quando identificaram uma catalase presente em queratinócitos

se a um número de aproximadamente $3,5 \times 10^{12}$ radicais/mg de pele, que seria a quantidade fisiológica de formação de radicais livres na pele humana (espécies reativas de oxigênio e lipoperóxidos EROs/LOS) submetida à luz solar. Para se chegar a este número tomou-se como padrão a quantidade de radical livre produzido para se formar 1000 IU de vitamina D (ZASTROW et al., 2017).

Estudo recente em camundongos demonstrou o papel da irradiação UVB na imunidade inata e adaptativa, em que favorece um determinado tipo de resposta imune, dependendo da dose e da frequência desta dose. Este estudo mostra que uma única dose aguda de UVB ($400\text{mJ}/\text{cm}^2$), favorece a imunidade inata, frente a infecção cutânea por *Staphylococcus aureus*, havendo significativa redução do crescimento bacteriano em órgãos como baço e pulmão, entretanto a mesma resposta não foi verificada com uma dose menor ($20\text{mJ}/\text{cm}^2$). A dose de ($20\text{mJ}/\text{cm}^2$) favoreceu a imunidade adaptativa, aumentando a produção de anticorpos antitoxina tetânica, e diminuiu a imunossupressão avaliada pelo teste de hipersensibilidade de contato (CHS) (CELA et al., 2018).

O teste mais empregado em estudos murinos para se avaliar a imunossupressão sistêmica específica, é o CHS, em que se usa a oxazolona, como antígeno. Neste teste há o primeiro contato, chamado de sensibilização, para depois haver o desafio; assim avalia-se a resposta inflamatória dirigida por células T, a partir do edema formado (CELA et al., 2018). Esta resposta é um tipo de hipersensibilidade do tipo IV, onde recentemente foi comprovado que a irradiação UVB ($400\text{mJ}/\text{cm}^2$) leva a imunossupressão induzida por oxazolona (CELA et al., 2018). Portanto, a irradiação tem o papel ambíguo, podendo favorecer a imunidade, ou pode deprimi-la. Dependendo da dose de UVB utilizada favorece ou a imunidade adaptativa ou a imunidade inata.

O primeiro estudo em que se comprovou, em modelo animal, o efeito da luz UV como indutor de câncer de pele ocorreu em 1928, pelo pesquisador George Marshall Findlay (FINDLAY, 1928). Apenas 46 anos depois é que se relacionou à irradiação UV para além dos efeitos mutagênicos, comprovando a imunossupressão sistêmica causada por UV, pela pesquisadora Margaret Kripke (KRIPKE, 1974). A partir de então, tem se estudado muito os efeitos da irradiação UV e seus efeitos tanto na imunologia da pele e na imunologia sistêmica.

Sabe-se que a irradiação UV causa inflamação, mutação gênica e imunossupressão na pele, e que estas mudanças são responsáveis pela fotocarcinogênese (HALLIDAY, 2005). Danos ao DNA induzido por radiação UV em um processo de mutagenicidade têm como consequência o aumento do risco de carcinogênese na pele. As mutações mais frequentes são do tipo CPD que podem levar a uma falha no reparo ou ao não reparo destes dímeros, (MARROT; MEUNIER, 2008). A indução de danos por UV na pele desencadeia uma cascata de respostas moleculares com liberação de citocinas, ativação de genes que induzem uma resposta inflamatória através da prostaglandina do tipo 2 (PGE-2), apoptose, que, por sua vez, induz a produção das interleucinas IL-4 e IL-10 que causam uma imunossupressão sistêmica alterando a produção de PGE-2 (HALLIDAY, 2005). A oxidação de lipídeos induzidos por UV leva à exacerbação da produção de PGE-2, favorecendo a fotoimunossupressão, bem como o aumento da proteína p53 e de danos ao DNA causado pela irradiação UV na pele (HALLIDAY, 2005; MARROT; MEUNIER, 2008; TERRA et al., 2012;). Aproximadamente 60% dos tumores epidérmicos têm mutações de DNA no gene supressor tumoral p53 (MARROT; MEUNIER, 2008). Há inúmeras evidências que espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio estão envolvidas com a imunossupressão, aumentando os níveis de IL-10, e com os danos induzidos por UV formando CPD, a partir da reação do radical livre superóxido e do radical óxido nítrico, formando peroxinitrito (HALLIDAY, 2005; TERRA et al., 2012; PREMI et al., 2015).

Células da pele entram em contato com inúmeros antígenos diariamente, que hora desenvolvem tolerância a determinado antígeno e hora uma resposta imune é necessária. Estas células ficam na interface entre a autoimunidade e uma resposta imune adaptativa. As células de Langerhans (LC) têm papel preponderante nesta intermediação (SPARBER, 2014; CLAYTON et al., 2017). As LC presentes na epiderme recebem uma classificação de célula apresentadora de antígeno (APC) e coordenam inúmeros sinais ambientais, desencadeando um contínuo estado de tolerância imunológica favorecendo a homeostase da pele (CLAYTON et al., 2017). Quando há a quebra da tolerância da pele ao ambiente, as LC ativam de uma resposta imunológica efetora (SPARBER, 2014). A principal é frente a vírus, ativando linfócitos T CD8⁺, podendo ativar também linfócitos T CD4⁺, diferenciando para resposta do tipo Th1, Th2 ou Th17, colaborando a um ambiente inflamatório

(CLAYTON et al., 2017). A perda da tolerância de células do tipo LC pode levar a psoríase, em que se nota uma inflamação crônica mediada pelo aumento de IL-23 e IL-17 (CLAYTON et al., 2017; KIM; KIM; LEE, 2017).

Células de Langerhans (LC) apresentam um papel especial dentro da família de células dendríticas (DC), a começar pela origem embrionária diferenciada e por características homeostáticas únicas, comparando com outras DC (SPARBER, 2014). As LC têm sua origem no saco vitelínico e no fígado fetal ainda durante a vida intraembrionária, diferindo muito dos outros leucócitos que apresentam seus precursores na medula óssea (HOEFFEL et al., 2012; KIM; KIM; LEE, 2017). Quem a classificou como célula de Langerhans foi quem a descobriu, Paul Langerhans em 1868, utilizando coloração de cloreto de ouro. Verificou-se sua localização em áreas intraepidérmicas, porém deu a ela a funcionalidade de células que participam da transdução de sinais nervosos (KIM; KIM; LEE, 2017). Apenas 100 anos depois observaram que estas células apresentavam moléculas de reconhecimento imunológico como o complexo histopatológico principal-II (MHC-II), receptores que reconhecem a porção Fc do anticorpo e receptores de reconhecimento do sistema complemento C3 (STINGL et al., 1977; KIM; KIM; LEE, 2017). Ficou claro que LC não participam do sistema nervoso da pele e sim do sistema imune (STINGL et al., 1977; KIM, KIM; KIM; LEE, 2017).

O povoamento das LC que preenchem a epiderme humana, é completado na vida intrauterina, antes de nascermos. Mas existem células tronco na membrana basal da pele que podem originar outras LC, ou em situações de severa inflamação da pele em que pode haver o repovoamento por progenitores sanguíneos (CLAYTON et al., 2017). Verificou-se que pacientes que receberam transplantes de mão permaneceram com as células de Langerhans do doador por mais de 4 anos (KANITAKIS; PETRUZZO; DUBERNARD, 2004; SPARBER, 2014).

A longevidade em um tecido tegumentar saudável é diferente de um tecido inflamatório como na psoríase ou dermatite atópica onde há uma infinidade de moléculas expressas pelas LC (KIM; KIM; LEE, 2017). LC podem sair da epiderme e drenar para os linfonodos desencadeando uma resposta imune. Assim como, um tecido saudável também pode seguir este mesmo trajeto só que desencadear uma resposta de tolerância imunológica mantendo a homeostase da pele (CLAYTON et al., 2017) (Figura 2).

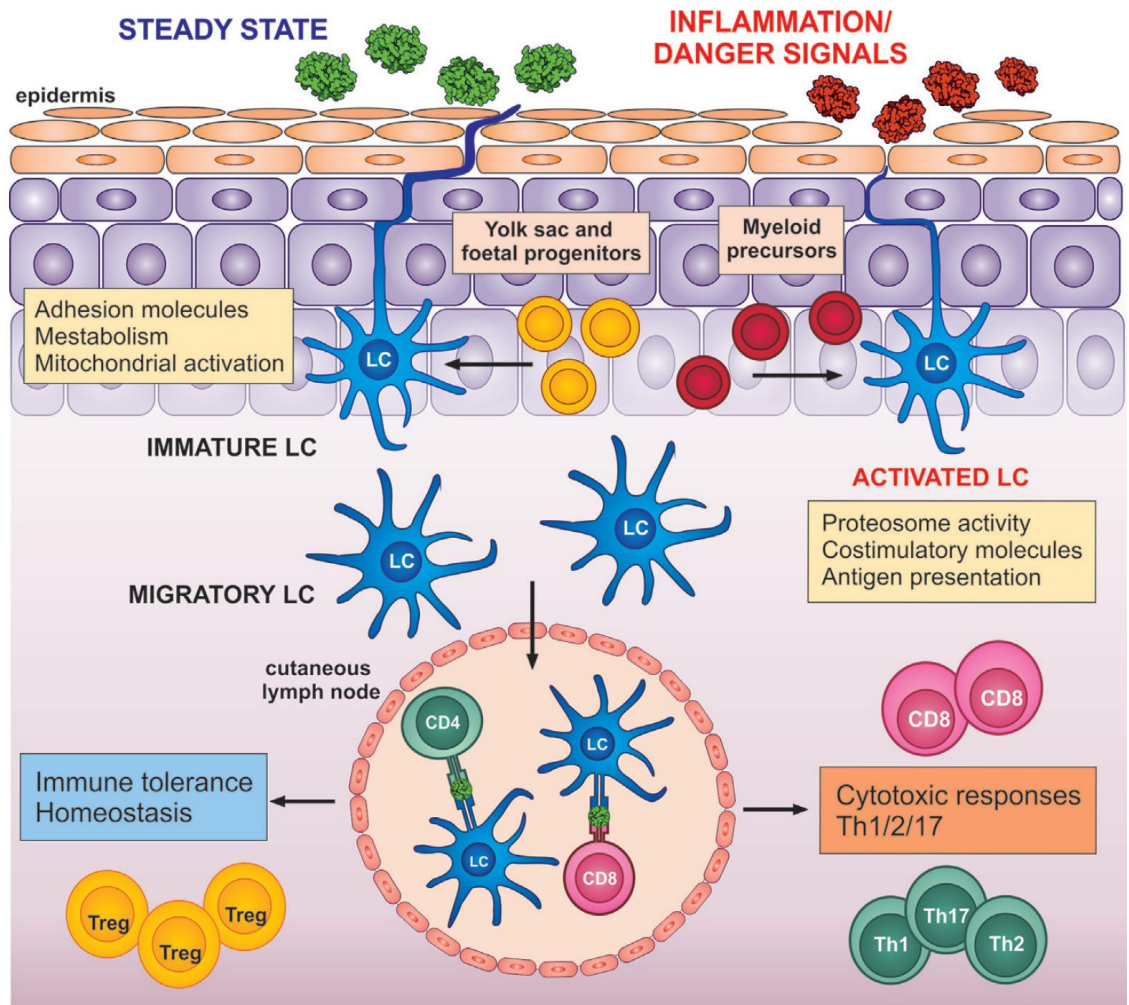


Figura 2: Transição de LC de um estado estacionário a uma potente ativação da imunidade adaptativa (CLAYTON et al., 2017).

Camundongos expressam em suas LC o clássico marcador de DC que é CD11c, bem como MHC-II e um receptor de lectina do tipo C no qual inclui *langerin* ou também conhecida por CD207. Todos receptores de lectina do tipo C são classificados como receptores de reconhecimento padrão (PRR), que reconhecem fragmentos de carboidratos de patógenos (SPARBER, 2014; KIM; KIM; LEE, 2017). As células de Langerhans humanas expressam MHC-II, CD1a e CD207. Através de CD1a e CD207 ocorre a apresentação de antígenos não peptídicos do *Mycobacterium leprae* das células de Langerhans para células T. Há inúmeros estudos que afirmam que a *langerin* é importante no reconhecimento de vários patógenos, como por exemplo, o vírus do HIV (MERAD; GINHOUX ; COLLIN, 2008; SPARBER, 2014; KIM; KIM; LEE, 2017). A irradiação UV pode ter um grande efeito na regulação da programação de células de Langerhans, alterando o microambiente

epidérmico, onde um sinal que costumeiramente levaria ao dano não é mais reconhecido; desta forma, a resposta inflamatória não ocorre, mas sim a tolerância (KIM; KIM; LEE, 2017).

Inflamação induzida por UVB na pele diminui a quantidade de células de Langerhans acarretando também na eliminação de seus percussores, localizados na membrana basal da epiderme e no folículo piloso (KIM; KIM; LEE, 2017). Em uma exposição à UVB que afeta a camada superficial da pele, mas não a derme ou o folículo piloso, pode ter sua reposição de LC graças as células tronco localizadas nestes locais (MERAD; GINHOUX; COLLIN, 2008). As células de Langerhans correspondem por aproximadamente 3-5% de todas as células nucleadas da epiderme, tanto em camundongo quanto no homem. Têm suas funções profundamente modificadas por citocinas liberadas por células que compõe a pele, principalmente queratinócitos que representam 90% das células da epiderme, assim estas citocinas podem alterar o tipo de resposta imune (MERAD; GINHOUX; COLLIN, 2008; KIM; KIM; LEE, 2017). TNF- α (fator de necrose tumoral) tem relevância como iniciador e na persistência de muitas doenças inflamatórias de pele, potencializa o estímulo das células de Langerhans levando a sua ativação, reconhecendo patógenos e os apresentando para linfócitos. Com o efeito contrário está o TGF- β (fator transformador de crescimento- β) o qual inibe sua maturação e inibe sua migração da epiderme (MERAD; GINHOUX; COLLIN, 2008; KIM; KIM; LEE, 2017).

Um tema pouco estudado que vem assumindo maior notoriedade é a participação das bactérias comensais, tanto do trato gastrointestinal quanto do tecido epitelial. Bactérias do trato gastrointestinal podem influenciar inúmeras patologias como a asma e até na eficácia de medicamentos imunoterápicos utilizados para tratamento de câncer do tipo melanoma (ARNOLD et al., 2011; MATSON et al., 2018). Existe uma comunicação entre o sistema gastrointestinal e a pele, aja visto o efeito benéfico do ácido lipoteicoico (LTA), constituinte da parede celular das bactérias gram positivas, em camundongos submetidos a irradiação UVB. Demonstrou-se o efeito direto do LTA intestinal afetando o sistema imune cutâneo restabelecendo a homeostase através do eixo intestino-pele (WEILL et al., 2013). Este papel relevante das bactérias comensais tem ganhado notoriedade também na pele, por ativar nosso sistema imunológico, já que a pele faz parte da

nossa maior interface exposta ao ambiente, atuando como primeira linha de defesa tanto física quanto imunológica (LINEHAN et al., 2018).

1.4 Metformina

A metformina pertence à classe das biguanidas, derivada da planta *Galega officinalis*, é um agente anti-hiperglicemiante oral, usado pela primeira vez na clínica no final dos anos 50, tornando-se, vinte anos depois o medicamento de primeira escolha para pacientes diabéticos do tipo 2 (SCHERNTHANER; SCHERNTHANER, 2007; APAMPA, 2012). Ela diminui a síntese hepática de glicose, via gliconeogênese, diminui a quebra do glicogênio, via glicogenólise, levando assim a uma menor liberação de glicose pelo fígado, e ainda tem seu efeito no tecido muscular aumentando a captação de glicose, levando a uma diminuição da glicose plasmática e diminuindo a resistência à insulina (APAMPA, 2012; SAISHO, 2015). Também reduz os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumenta os de alta densidade (HDL). No trato gastrointestinal atua diminuindo a absorção de glicose (APAMPA, 2012).

A terapia com metformina é muito segura, mas tem seus efeitos adversos em 20-30% dos pacientes (SALPETER et al., 2010). A Metformina atua ativando uma enzima reguladora do metabolismo celular, a proteína quinase dependente de adenosina monofosfato quinase (AMPK), que monitora mudanças na energia intracelular (SHAW; CANTLEY, 2012). A homeostase energética celular é regulada por poucas proteínas, incluindo isoformas musculares como, glicogeniofosforilase e fosfofrutoquinase; enzimas responsáveis pela glicogenólise e glicólise respectivamente, ativadas quando há diminuição de ATP, diferentemente da enzima frutose 1,6-bifosfatase, que está envolvida com a gliconeogênese, inibida com a diminuição de ATP (HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012). No entanto o principal sensor energético em todas as células eucarióticas é a AMPK. Sua ativação ocorre em resposta a vários mecanismos estressores, como diminuição na concentração intracelular de ATP, aumento na concentração de ADP e AMP, e uma vez ativada, a AMPK reestabelece os níveis intracelulares de ATP induzindo vias catabólicas e inibindo vias anabólicas (HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012). AMPK é uma enzima heterotrimérica composta por uma subunidade α catalítica, quinase serina-treonina, e duas subunidades regulatórias β e γ .

O aumento da gliconeogênese hepática é o mecanismo de ação da metformina em seu principal órgão alvo que é o fígado, o qual diminui os níveis glicêmicos sanguíneos. Esta diminuição ocorre pela ativação de AMPK, mas não pela diminuição da taxa entre ATP/AMP, e sim pela inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e no aumento das espécies reativas (ZOU et al., 2004; SAISHO, 2015). Foi relatado que em camundongos C57/BL6 o tratamento com metformina (250mg/Kg) via intraperitoneal por apenas três dias, foi suficiente para ativar AMPK com dependência das espécies reativas. Esta dependência foi comprovada pela coloração histológica do coração e da artéria aorta para 3-NT (3-nitrotirosina) que é uma coloração para espécies reativas de nitrogênio, principalmente peroxinitrito (ZOU et al., 2004). Isto mostrou que a metformina não tem seletividade exclusiva para hepatócitos, mas também a outras células como os cardiomiócitos, e que a ativação de AMPK é dependente de espécies reativas (SAISHO, 2015).

Recentemente foram publicados estudos que mostram outros mecanismos com o qual a metformina suprime a gliconeogênese hepática independente de AMPK, como por exemplo a diminuição de AMP cíclico que leva a diminuição da proteína quinase A (PKA), que bloqueia o sinal dependente de glucagon com isso menos glicose é liberada do hepatócito (SAISHO, 2015). Foi investigado em hepatócitos murinos, um mecanismo de ação da metformina diferente, em que refuta todos os outros, mostrando seu efeito na supressão da gliconeogênese hepática por inibir a glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (mGPD) (MADIRAJU et al., 2014). Evidenciou-se que tanto para o tratamento i.p. agudo de dose única (50mg/Kg) ou crônico por 30 dias, suprimiu a gliconeogênese hepática. Esta diminuição está relacionada ao aumento do estado redox citoplasmático (aumento da relação lactato/piruvato) e ao aumento da relação (GSH/GSSG), entretanto, um estado redox reduzido foi encontrado em nível mitocondrial (diminuição da relação β -hidroxibutirato/acetoacetato) (MADIRAJU et al., 2014; SAISHO, 2015). Para uma melhor elucidação dos diversos mecanismo de ação estão representados na Figura 3.

Existem ainda outros mecanismos de supressão da produção de glicose hepática pela metformina como alterações do metabolismo biliar e aumento da via das incretinas (SAISHO, 2015). Nota-se que o entendimento em nível molecular do

mecanismo de ação da metformina continua a ser elucidado, mas sabe-se que sua principal ação é reduzir a produção de glicose hepática por diversas vias, e não apenas a clássica ativação de AMPK, e que há a participação preponderante de espécies reativas alterando o estado redox.

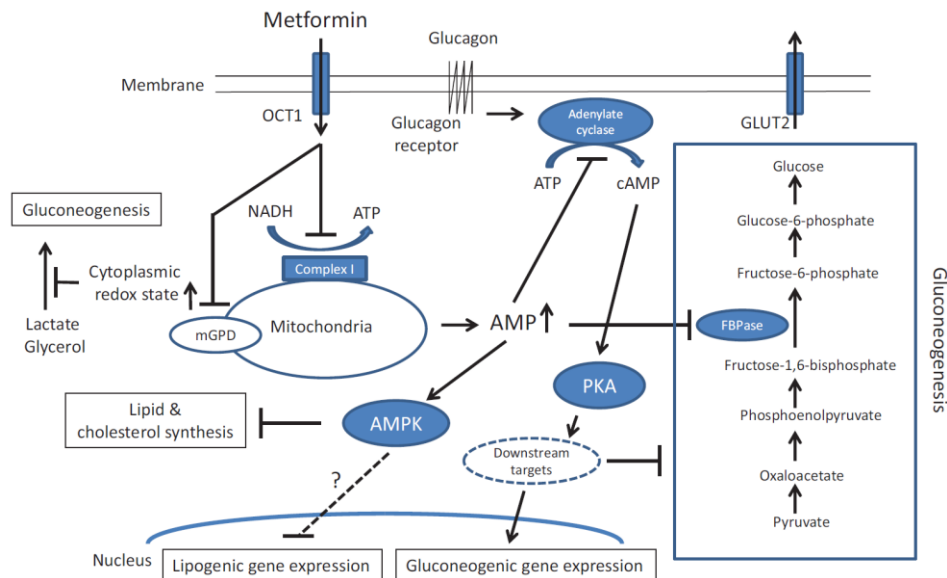


Figura 3: Ação anti-hiperglicemiante da metformina no hepatócito e seus vários mecanismos de ação (SAISHO, 2015)

A diminuição na ativação da AMPK é observada em um dos cânceres mais comuns de pele, o carcinoma celular escamoso (SCC), tanto em humanos quanto em modelo murinho. Esta diminuição da ativação da AMPK é significativa quando comparada com a pele normal ou com a pele irradiada por UVB, sugerindo assim, que a enzima AMPK é um supressor tumoral (WU et al., 2013). Em nível molecular, a deleção de AMPK reduz a expressão de proteínas de reparo de DNA induzida por UVB (WU et al., 2013). Foi relatado que a ativação da AMPK pela metformina em um tratamento tópico (2µmol) ou oral (300mg/Kg) aumentou as proteínas de reparo de DNA, favorecendo a redução do crescimento tumoral na pele induzida por UVB (WU et al., 2013). Portanto, a AMPK é necessária para um reparo eficiente do dano induzido por UVB no DNA de células da pele, havendo a comunicação entre o metabolismo energético com a estabilidade genômica (WU et al., 2013). O uso da metformina apresenta um papel na quimioprevenção para o câncer de pele, aumentando as proteínas de reparo de DNA, de maneira dependente de AMPK, e diminui a proliferação celular por um padrão independentemente de AMPK, em que inibe a enzima quinase regulada por sinal extracelular (ERK), relacionada ao

aumento da proliferação celular (WU et al., 2013). Estudos recentes na área clínica e básica demonstram vários efeitos benéficos da metformina sobrepujando seu efeito mais reconhecido, que é hipoglicêmico, como efeitos anti-inflamatório, anti-cancerígeno, anti-envelhecimento, anti-lesão causada por UVB na pele, e até antimicrobiano (SAISHO, 2015; MALIK et al., 2017).

Tendo em vista este cenário buscou-se estudar o efeito da irradiação aguda por UVB em camundongos tratados com metformina, que é o principal anti-hiperglicemiante para tratar diabetes do tipo 2, e entender seu papel na imunomodulação e na fotocarcinogênese da pele, pois, o tratamento com metformina tópica ou sistêmica foi capaz de reduzir o crescimento tumoral do câncer de pele induzido por UVB em camundongos (WU et al., 2013).

O modelo experimental de irradiação aguda por UVB é muito utilizado para evidenciar as propriedades antioxidantes de fármacos (WIDYARINI et al., 2001). Neste trabalho utilizamos um modelo de irradiação UVB na dose aguda 400mJ/cm² que corresponde a duas doses de eritema mínimo (GONZÁLEZ MAGLIO et al., 2011). Avaliamos na pele a formação de espécies reativas e seu sistema antioxidante. A epiderme também foi analisada, uma vez que a energia da radiação UVB é majoritariamente absorvida por esta camada de células (MARROT; MEUNIER, 2008). Foram caracterizados os padrões oxidativos relevantes do modelo, junto com as principais citocinas em nível de epiderme que poderão contribuir com futuras pesquisas que utilizam esse protocolo experimental. Foi avaliado o efeito do tratamento sistêmico com metformina, utilizado como pré-tratamento por 11 dias antes da irradiação UVB, pois estudos prévios de nosso grupo mostrou que este protocolo em camundongos C57/BL6 diminuiu em 54% o crescimento tumoral do melanoma murino (SOUZA NETO et al., 2017). Sendo assim, a melhor compreensão da ação da metformina em um modelo de irradiação aguda por UVB busca elucidar os mecanismos oxidativos e imunológicos envolvidos que levam a fotocarcinogênese.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da metformina em modelo experimental murino de irradiação aguda por UVB, em parâmetros oxidativos, inflamatórios e imunológicos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o envolvimento do estresse oxidativo e capacidade antioxidante sistêmica e *in situ* (na pele) em camundongos C57/BL6 irradiados por UVB e tratados com metformina;
- Verificar o efeito da metformina em nível de epiderme nos animais irradiados quanto a viabilidade celular, produção de espécies reativas e a produção de interleucinas relacionadas com os danos da irradiação UVB e a imunossupressão.
- Utilizar marcação histológica para estresse nitrosativo, oxidativo e de proteínas chaves de reparo de DNA
- Analisar a imunossupressão causado pela irradiação aguda por UVB, em nível sistêmico, utilizando um desafio antigênico com oxazolona.

3. CONCLUSÕES

1. O tratamento com metformina foi suficiente para diminuir o estresse oxidativo sistêmico e local, após a irradiação aguda por UVB em camundongos C57/BL6, diminuindo o MDA plasmático e retornando os níveis de tiol total ao do controle.
2. A metformina reduziu a imunossupressão sistêmica induzida por UVB.
A imunossupressão induzida por UVB em nível de epiderme não foi revertida pelo tratamento com metformina.
Para as marcações em nível epidérmico para a viabilidade celular como a produção de espécies reativas, mostram que o tratamento com metformina não impediu ou amenizou o dano causado por UVB.
3. Houve uma diminuição do número de células Langerhans após a irradiação, entretanto, o tratamento com metformina não alterou esta porcentagem.
4. A análise histológica da pele mostra que a irradiação danifica a camada epidérmica, deixando ulcerações com perda de praticamente toda a epiderme. O tratamento com metformina consegue reverter parcialmente esta ulceração restabelecendo a arquitetura tecidual.
5. As marcações para estresse oxidativo (4-HNE), nitrosativo (NT) e para p53, mostraram aumento na expressão nas áreas em que a epiderme ainda está preservada no grupo irradiado. Por outro lado, a expressão das marcações para 4-HNE e p53 no grupo (IRR+MET) foram mais profundas, próximas a folículos pilosos ou glândulas exócrinas.
6. A marcação para (NT) foi mínima no grupo IRR+MET, demonstrando que a ação farmacológica da metformina como inibidor do complexo I da cadeia fosforilativa em diminuir a produção de ânions superóxido, interferindo no estresse nitrosativo

a partir da formação de peroxinitrito. A marcação de 4-HNE e p53 mostra reestabelecimento em áreas em que se encontram células tronco da pele, ou seja, áreas mais profundas da derme, na tentativa de restabelecer os danos causados pela irradiação UV (IRR+MET).

7. Os resultados revelam que o tratamento com metformina neste modelo de irradiação murina por UVB, atua, em parte, sobre mecanismos geradores de estresse oxidativo e nitrosativo. Em nível sistêmico e tegumentar, a irradiação alterou a imunovigilância da pele, tanto por alterar a quantidade das células de Langerhans e por levar a imunossupressão pós UVB. A metformina diminuiu esta imunossupressão significativamente.

8. Demonstramos que a metformina favorece um potencial redutor tanto sistêmico e local, através do aumento da capacidade antioxidante. Sendo assim, a metformina induziu a uma melhor resposta adaptativa celular, diminuindo a imunossupressão por UVB e os danos oxidativos causados em nível cutâneo e sistêmico.

REFERÊNCIAS

- ABE, K. et al. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener**, New York, v.15, p. 610-617, Oct. 2014.
- APAMPA, B. Pharmacology and safe prescribing of metformin. **Nurse Prescr**, London, v.10, p.597–602, Aug. 2012.
- ARNOLD, I. C. et al. Helicobacter pylori infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. **J. Clin. Invest**, New York, v.121, p. 3088–3093, Aug. 2011.
- BACHI, A.; DALLE-DONNE, I.; SCALONI, A. Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. **Chemical reviews**, v. 113, n. 1, p. 596-698, Apr.2012.
- BELKAID, Y.; TAMOUTOUNOUR, S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 16, p. 353-366, May. 2016.
- BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 126, p. 2565-2575, Dec. 2006.
- BOLSHAKOV, S. et al. p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 228-234, 2003.
- BUELNA-CHONTAL, M.; ZAZUETA, C. Redox activation of Nrf2 & NF-κB: a double end sword?. **Cellular signalling**, v. 25, n. 12, p. 2548-2557, 2013.
- CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology B**, Lausanne v. 84, p. 21-27, Jul. 2006.
- CELA, E. M. et al. Time–course study of different innate immune mediators produced by UV-irradiated skin: comparative effects of short and daily versus a single harmful UV exposure. **Immunology**, v. 145, n. 1, p. 82-93, 2015.
- CELA, E. M. et al. Daily very low UV dose exposure enhances adaptive immunity, compared with a single high-dose exposure. Consequences for the control of a skin infection. **Immunology**, 2018.
- CHANDEL, N.S.; TUVESON, D. A. The promise and perils of antioxidants for cancer patients. **New England Journal of Medicine**, London, v. 371, p. 177-178, July. 2014.
- CHEN, Y. E; FISCHBACH, M. A.; BELKAID, Y. Skin microbiota–host interactions. **Nature**, London, v. 553, p. 427-436, Jan. 2018.
- CIPAK, G. A. et al. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. **British journal of pharmacology**, London, v. 174, p. 1771-1783, June. 2017.

CLAYTON, K. et al. Langerhans cells—programmed by the epidermis. **Frontiers in immunology**, New York, v. 8, p. 1676-1684, Nov.2017.

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

DELINASIOS, G.J. et al. Vitamin E inhibits the UVAI induction of “light” and “dark” cyclobutane pyrimidine dimers, and oxidatively generated DNA damage, in keratinocytes. **Scientific Reports**, New York, v.8, n. 423-8.Jan. 2018.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, Oct. 2005.

FINDLAY, G. M. Ultra-violet light and skin cancer. **Lancet**, p. 1070-73, 1928.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **The Journal of cell biology**, Baltimore, v. 194, n. 1, p. 7-15, July. 2011.

GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle & nerve**, v. 42, n. 6, p. 950-958, Dec.2010.

GHEZZI, P. et al. The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. **British journal of pharmacology**, London, v. 174, n. 12, p. 1784-1796, Jun.2017.

GUÉRAUD, F. 4-Hydroxynonenal metabolites and adducts in pre-carcinogenic conditions and cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 111, p. 196-208, Jan. 2017.

GONZÁLEZ MAGLIO, D. H. et al. Mitochondrial function evaluation in epidermal cells ex vivo after ultraviolet irradiation. **Experimental Dermatology**, Baltimore, v. 20, p. 947–950. Nov. 2011.

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutat. Res**, New York, v.571, p.107–20, Apr. 2005.

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

HARDIE, D. G; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, London, v. 13, p. 251-62, Mar.2012.

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

HECK, D. E. et al. UVB Light Stimulates Production of Reactive Oxygen Species. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 25, p. 22432-22436, May. 2003.

HIRSCH, H. A.; ILIOPOULOS, D.; STRUHL, K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 110, n. 3, p. 972-977, Jan. 2013.

HOEFFEL, G. et al. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, Baltimore, v. 209, n. 6, p. 1167-1181, Jun.2012.

HOUSTIS, N; ROSEN, E D.; LANDER, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, London, v. 440, n. 7086, p. 944, April. 2006.

JANS, J. et al. Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene. **Current Biology**, London, v. 15, n. 2, p. 105-115, Dec. 2005.

KANITAKIS, J; PETRUZZO, P; DUBERNARD, J.M. Turnover of epidermal Langerhans' cells. **New England Journal of Medicine**, London, v. 351, n. 25, p. 2661-2662, Dec.2004.

KIM, T.G.; KIM, S. H.; LEE, M.G. The Origin of Skin Dendritic Cell Network and Its Role in Psoriasis. **International journal of molecular sciences**, Sweden, v. 19, n. 1, p. 42, Dec.2017.

KOHEN, R., GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, Limerick, v. 148, n. 2, p. 149-157, Aug. 2000.

KOHEN, R.; FANBERSTEIN, D.; TIROSH, O. Reducing equivalents in the aging process. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 103-123, Mar. 1997.

KRIPKE, M. L. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. **Journal of the National Cancer Institute**, New York, v. 53, p. 1333-1336, May.1974.

LINEHAN, J. L. et al. Non-classical Immunity Controls Microbiota Impact on Skin Immunity and Tissue Repair. **Cell**, New York, v 172, p. 784-796, Jan. 2018.

MADIRAJU, A. K. et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. **Nature**, London, v. 510, n. 7506, p. 542-546, Sep. 2014.

MAGLIO, D. H. G. et al. Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, Copenhagen, v. 21, n. 6, p. 311-317, Dec. 2005.

MALIK, F. et al. Is Metformin Poised for a Second Career as an Antimicrobial?. **Diabetes metabolism research and reviews**, New York, v.33, p.8-15, Dec. 2017.

MARROT, L.; MEUNIER, J. R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **J. Am. Acad. Dermatol**, New York, v. 58, p.139-148. Mar. 2008.

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

MATSON, V. et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. **Science**, New York v. 359, n. 6371, p. 104-108, Jan. 2018.

MERAD, M.; GINHOUX, F.; COLLIN, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, n. 12, p. 935, July.2008.

OGURA, S.; HIMOSAWA, T. Oxidative stress and organ damages **Current Hypertension Reports**, v. 16, n. 8, P. 452, May. 2014.

PEARCE, E. L. et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. **Nature**, London, v. 460, n. 7251, p. 103, July 2009.

PODDA, M. et al. Uv-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 24, n. 1, p. 55-65, Jan. 1998.

PREMI, S. et al. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Science**, New York, v. 347, p. 842–847, Feb. 2015.

RAVEN, P. H.; RAY, F. E; SUSAN, E. E.; **Biology of Plants**. New York: W.H. Freeman and Co, 2014.

RISTOW, M. et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 106, n. 21, p. 8665-8670, Oct. 2009.

ROELANDTS, R. Photodermatology over the past 125 years. **British Journal of Dermatology**, London, v. 171, n. 5, p. 926-928, Nov. 2014.

SAIJA, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 199, p. 39-47, Apr. 2000.

SAISHO, Y. Metformin and inflammation: Its potential beyond glucose-lowering effect. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, London, v.15, p. 196-205. Sep.2015.

SALPETER, S. R. et al. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. **The Cochrane Library**, London, v. 14, p.1-5, Apr.2010.

SCHERNTHANER G.; SCHERNTHANER, G.H. Metformin – from devil to angel In: Mogensen CE, editor. **Pharmacotherapy of diabetes: new developments**, Boston, v.9. p. 77–86. 2007.

- SHAW, R. J.; CANTLEY, L. C. Ancient sensor for ancient drug. **Science**, New York, v. 336, n. 6083, p. 813-814, May. 2012.
- SOUZA-NETO, F. P. et al. Metformin: oxidative and proliferative parameters in-vitro and in-vivo models of murine melanoma. **Melanoma Research**, Pennsylvania, v. 27, p.536-544, Dec.2017.
- SPARBER, F. Langerhans cells: an update. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, Berlin, v. 12, n. 12, p. 1107-1111, Nov. 2014.
- STINGL, G. et al. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. **Nature**, London, v. 268, n. 5617, p. 245-50, Mar.1977.
- TERRA, V. A. et al. Nitric oxide is responsible for oxidative skin injury and modulation of cell proliferation after 24 hours of UVB exposures. **Free radical research**, New York, v. 46, n. 7, p. 872-882, Jul.2012.
- TEWARI, A. et al. Upregulation of MMP12 and Its Activity by UVA1 in Human Skin: Potential Implications for Photoaging. **J. Invest. Dermatol**, Cambridge, v.134, p.2598–2609, July.2014.
- THANAN, R. et al. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 193-217, Apr. 2014.
- WATSON, J. D. Type 2 diabetes as a redox disease. **The Lancet**, London v. 383, n. 9919, p. 841-843, Jul. 2014.
- WEILL, F. S. et al. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus rhamnosus* GG as an oral photoprotective agent against UV-induced carcinogenesis. **British journal of nutrition**, London v. 109, n. 3, p. 457-466, Apr.2013.
- WELLER, R. et al. Autogenous nitric oxide protects mouse and human keratinocytes from ultraviolet B radiation-induced apoptosis. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, Washington, v. 284, n. 5, p. 1140-1148, May. 2003.
- WIDYARINI, S. et al. Estrogen receptor signaling protects against immune suppression by UV radiation exposure. **Proceeding National Academic Science**, Washington, v. 103, n. 34, p. 12837-12842, Aug. 2006.
- WU, C. et al. Role of AMPK in UVB-induced DNA damage repair and growth control. **Oncogene**, London. v. 32, n. 21, p. 2682-9, May. 2013.
- XIAN, D. et al. Photoprotection against UV-induced damage by skin-derived precursors in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Oxford v. 175, p. 73-82, Dec. 2017.
- YASUI, H.; SAKURAI, H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 269, n. 1, p.131-136, May. 2000.
- ZASTROW, L. et al. The missing link—light-induced (280–1,600 nm) free radical formation in human skin. **Skin pharmacology and physiology**, v. 22, n. 1, p. 31-44, 2009.

ZASTROW, L. et al. From UV Protection to Protection in the Whole Spectral Range of the Solar Radiation: New Aspects of Sunscreen Development. In: Ultraviolet Light in Human Health, **Diseases and Environment**. Springer, Cham, p. 311-318. 2017.

ZOU, M.H. et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo role of mitochondrial reactive nitrogen species. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 279, n. 42, p. 43940-43951, Oct. 2004.

ANEXO A

Artigo submetido à revista

Journal of Dermatological Science

Edited By: Riichiro Abe

Impact factor:3.986

Online ISSN: 0923-1811

Copyright © 2019 Elsevier B.V.

An Official Journal of the Japanese Society for Investigative Dermatology

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-dermatological-science/0923->

[1811/guide-for-authors#1003](https://www.elsevier.com/journals/journal-of-dermatological-science/0923-1811/guide-for-authors#1003)



[Home](#)

[Author](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Dermatological Science

Manuscript ID

JDermSci-2019-0387

Title

Metformin prevents skin and systemic oxidative damage and immune alterations induced by UVB radiation

Authors

Souza Neto, Fernando
Mello, Gabriella
Ramalho, Leandra
Cela, Eliana
Campo, Valeria
Cecchini, Rubens
Maglio, Daniel
Cecchini, Alessandra

Date Submitted 17-Jul-2019

[Author Dashboard](#)



Metformin prevents skin and systemic oxidative damage and immune alterations induced by UVB radiation

Journal:	<i>Journal of Dermatological Science</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Souza Neto, Fernando; State University of Londrina, Laboratory of Molecular Pathology Mello, Gabriella; Universidade Estadual de Londrina, General Pathology Ramalho, Leandra; Universidade de São Paulo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, General Pathology Cela, Eliana; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica Campo, Valeria; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica Cecchini, Rubens; Universidade Estadual de Londrina, General Pathology Maglio, Daniel; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica Cecchini, Alessandra; Universidade Estadual de Londrina, General Pathology</p>
Keywords:	Oxidative stress, skin immune response, UVB skin damage, Metformin

ANEXO B

Metformin prevents skin and systemic oxidative damage and immune alterations induced by UVB radiation

Fernando Pinheiro Souza-Neto^{a,b}, Gabriela P. Melo^{a,b}, Leandra Z. N. Ramalho^c, Eliana M. Cella^{d,e}, Valeria E. Campo^{d,e}, Rubens Cecchini^b, Daniel H. González Maglio^{d,e}, Alessandra Lourenço Cecchini^a

^a *Laboratory of Molecular Pathology, State University of Londrina, Brazil.*

^b *Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, State University of Londrina, Brazil.*

^c *Departament of Patology and Legal Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.*

^d *Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Inmunología, Buenos Aires, Argentina,*

^e *CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), Buenos Aires, Argentina*

Corresponding author: Alessandra Lourenço Cecchini

Email: alcecchini@uel.br

Fax: +55 (43) 3371 42 67

Phone: +55 (43) 3371 45 29

Laboratory of Molecular Pathology, State University of Londrina, Brazil

State University of Londrina. Road Celso Garcia Cid, PR-445, km 380, University Campus, 86051-990

Londrina, PR, Brazil.

Abstract

Background. Skin exposure to ultraviolet B (UVB) radiation leads to local oxidative stress, inflammation, systemic immunosuppression and, ultimately, the development of skin cancer. Metformin is the most prescribed drug for type 2 diabetes, and it has been shown that chronic treatments with this drug reduces skin cancer incidence.

Objective. Our aim was to analyze the effects of metformin on UVB-induced acute local and systemic damage.

Methods. C57/BL6 mice were pretreated with 90 mg/kg of metformin for 11 days and exposed to 400 mJ/cm² of UVB radiation. Twenty-four hours later, we obtained skin and blood samples to determine oxidative stress and the inflammatory response. A second group of mice were used to determine the effect of metformin on UVB-induced immunosuppression, using a CHS reaction to oxazolone.

Results. We observed that metformin did not prevent UVB-induced epidermal damage, Langerhans cells loss or mitochondrial alterations in epidermal cells. However, it improved the reducing state in the skin, increasing antioxidant molecules that led to reduced 4-hydroxynonenal and nitrotyrosine labeling. Local inflammatory mediators increased by UVB radiation, such as IL-6 and IL-1 β , were also reduced by metformin. Systemic alterations induced by UVB radiation were also reverted by metformin, increasing thiol in erythrocytes and decreasing serum malondialdehyde and IL-6. Finally, metformin partially prevented the development of UVB-induced immunosuppression.

Conclusion. We demonstrated that metformin reduces UVB-induced local and systemic damage, changes that could explain its antitumoral effect. Thus, the use of metformin as a potential agent to maintain skin homeostasis and prevent UVB-induced lesions requires evaluation.

Keywords: *Metformin, UVB radiation, Skin oxidative damage, Systemic oxidative damage,*

Immune alterations, Immunosuppression.

1. Introduction

Solar radiation is composed of ultraviolet (UV), visible and infrared radiations. Great attention is given to UV radiation because of its high energy, which allows it to react with DNA, contributing to skin carcinogenesis¹. The UV radiation that reaches the Earth's surface consists of approximately 95% UVA radiation (321-400nm) and a small percentage (<5%) of UVB (281-320nm)^{2,3}. UVB radiation induces skin oxidative stress, inflammation and DNA damage, through the generation of different photoproducts. These products require the formation of two adjacent pyrimidines, producing cyclobutene pyrimidine dimers (CPDs) and 6-4 photoproducts, which can have mutagenic consequences that lead to the development of skin cancer^{4,5}. In order to repair the damage, or to eliminate damaged cells, p53 is activated in exposed cells. This protein is central in the control of the UV-induced damage and is frequently mutated in skin tumors⁶. Besides its local effects, UV radiation also produces systemic immunosuppression, which is responsible for the progression of skin cancer¹. After skin UVB irradiation, reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) are formed. These molecules promote oxidative damage to DNA, proteins and lipids, affecting different cell functions⁵. Skin present different molecules to counteract the effects of ROS, including enzymes like catalase, thiol-based antioxidants and vitamins, which can prevent UV-induced DNA damage³. Besides oxidative stress, UVB radiation directly promotes local inflammation and systemic immunosuppression. Different cytokines and mediators are involved in those processes, including TNF- α , IL-6 and IL-1 β for inflammation, and IL-4, IL-10 and prostaglandin E₂, for immunosuppression⁷. The search for substances that diminish or prevent the harmful effects of UVB on the skin has been comprehensive. Thus, metformin, the most widely used anti-diabetic drug, has emerged as a new alternative. Some studies show that the inhibition of complex I of the oxidative phosphorylation chain produced by metformin increases ROS and RNS, favoring the activation of the main energetic sensor within the cell, the enzyme AMPK^{8,9}. Others claim that metformin promotes a reduced state within the cell, interfering with essential transcription factors in cellular redox homeostasis^{10,11}. It has

been demonstrated that metformin has a role in chemoprevention of skin cancer, by enhancing DNA repair and decreasing cell proliferation in a photocarcinogenesis model¹².

A previous work by our group showed an antimelanoma effect of metformin, reducing the size of murine melanoma and favoring an increased systemic redox potential¹³. Considering the deleterious effects of UVB radiation and the importance of ROS and RNS in the cellular damage caused by this irradiation, we aimed to study the effect of metformin treatment in an acute UVB irradiation mouse model. Using this model, we analyzed modifications in oxidative damage, in the inflammatory response, and the immunosuppressive effects of UVB radiation that ultimately lead to skin carcinogenesis.

2. Materials and Methods

2.1 Animal model and metformin treatment

Female C57/BL6 mice (8 to 12 weeks old) were divided into four groups (n=6): controls treated with PBS (C+PBS) or metformin (C+MET); UVB irradiated treated with PBS (IRR+PBS) or metformin (IRR+MET).

Mice were treated with an intraperitoneal injection (IP) of metformin (90 mg/kg)¹⁴ or vehicle (PBS) for 11 consecutive days¹³. On day 12, the mice were irradiated on their depilated back with a PHILIPS TL/12 40W UVB fluorescent lamp (emission range 270-400 nm, maximum 313 nm), which includes 20–30% UVA. A single dose of UVB radiation (400 mJ/cm²) was used, as previously described¹⁵, except in the UV-induced immunosuppression experiment. Twenty-four hours later, the mice were anesthetized (ketamine 80 mg/kg, xylazine 10 mg/kg IP), blood was collected by cardiac puncture and they were sacrificed using a CO₂ chamber. The dorsal skin was carefully removed for specific procedures.

The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the State University of Londrina (CEUA/UEL: 14636.2011).

2.2 Histological analysis

Skin samples of approximately 1 cm² were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, embedded in paraffin, sectioned, stained with hematoxylin and eosin (H&E) and mounted. Blank sections were deparaffinized (xylol and ethanol), blocked with normal serum (Vectastain Elite ABC Kit, Universal, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) and incubated with monoclonal primary antibodies against p53, 4-hydroxynonenal (4-HNE) and nitrotyrosine (NT) for 2 h at room temperature in a humid chamber. Sections were washed, incubated with biotinylated pan-specific universal secondary antibody, for 1 h at room temperature, washed again, incubated with avidin-biotin-peroxidase complex and, finally, color was developed with the Vector NovaRED kit (Vector Laboratories Inc.). Samples were counterstained (Harris hematoxylin), dehydrated and mounted (Permount, Biomed, Foster City, CA, USA). Isotope-matched control antibody was used as negative controls. Each staining was evaluated randomly in at least 10 representative high-power fields (x40).

2.3 Characterization of epidermal cell damage

Skin samples were obtained using an 8 mm biopsy punch and incubated with dispase (25 mg/mL) in PBS for 90 min at 37°C. The epidermis was separated and placed in a solution of collagenase (1.5 mg/mL) and DNase (45 µg/mL) under agitation for 15 min at 37°C. Cellular suspensions were obtained, filtered through a 50 µm nylon mesh, counted and prepared for flow cytometry analysis.

2.3.1 Analysis of Langerhans cells (LCs)

The percentage of LCs was analyzed in one biopsy punch per mouse. Cell suspensions were stained using 0.2 µg of anti-CD11c-PE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 30 min at 4°C, washed and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Cells were then permeabilized (0.3% saponin) and stained with anti-CD207-APC (langerin) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Finally, cells were washed and analyzed.

2.3.2 Analysis of epidermal cell mitochondrial function

Analysis was performed on one biopsy punch per mouse. Cells were stained for 30 min at 37°C with DiOC₆ 100 nM (mitochondrial membrane potential, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and MitoSOX Red 5 µM (mitochondrial superoxide anion production, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cells were washed and analyzed.

Flow cytometry data were determined on a PAS III PARTEC flow cytometer (Partec, Gorlitz, Germany) and analyzed using Cyflogic software (CyFlo Ltd., Turku, Finland).

2.4 Molecular alterations associated with skin damage

2.4.1 Oxidative damage

Dorsal skin samples were homogenized in an Ultra Turrax homogenizer using 30 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer, 120 mM KCl, pH 7.4. Protein concentration was determined by Lowry and modified by Miller^{16,17}, using bovine serum albumin as standard. Skin samples were diluted to 50 mg/mL.

Skin lipoperoxidation was evaluated by chemiluminescence¹⁸. Samples were diluted to 7.5 mg/mL using PBS. The reaction was initiated by the addition of tert-butyl hydroperoxide at a final concentration of 3 mM in 1 mL of total volume. To increase the sensitivity of the test, hemin 1mM was added at a final concentration of 10 µM¹⁹. The results were expressed as the area under the curve AUC/skin (µg protein.mL⁻¹).

Total antioxidant capacity (TRAP) was measurement in samples diluted 1:50, which were mixed with 880 µL of 0.1M glycine buffer, pH 8.6, in 1 mL of total volume^{18,20}. Chemiluminescence was measured in a reaction medium containing 20 µM of 2-azobis-(2-amidinopropane) and 200 µM luminol. Then, another curve was measured in the presence of the standard antioxidant 1.75 µM Trolox. Chemiluminescence curves were obtained in a GloMax[®] luminometer 20/20 (Promega, Madison, USA). The results are expressed as mmol of Trolox/g skin protein.

Catalase activity was measured in a 1:20 dilution. The decrease in the absorbance of hydrogen peroxide (H₂O₂) was monitored at 240 nm for 5 min, in a 1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0^{18,21}. The results are expressed as absorbance decrease in 1 min Vabs/g skin (protein⁻¹.mL⁻¹).

Total thiol levels were measured in samples diluted 1:10, at 412 nm with a microplate reader. The number of total thiol groups was calculated by using a calibration curve prepared with GSH (Sigma Aldrich®, Saint Louis, MO, USA)²². The results were expressed in μmol of thiol.

2.4.2 Inflammatory damage

Epidermis and dermis were separated by immersing the skin in a water bath at 60°C for 30 s, and then the epidermis was scrapped using a scalpel. Dermis and epidermis were homogenized separately in PBS using a tissue tearor (PRO Scientific, Oxford, CT, USA), and centrifuged for 10 min at 13.500 xg. Protein concentration was measured with the BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), using BSA as standard.

Interleukin-(IL)-6, IL-10 and TNF-α were measured by ELISA using the OPTeia system (BD Biosciences) and IL-1β was determined using an uncoated ELISA kit (eBioscience), all determinations were performed according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentration was expressed as pg/mg of protein.

2.5 Molecular alterations associated with UV-induced systemic damage

2.5.1 Oxidative damage

Red blood cell (RBC) lipoperoxidation was evaluated by chemiluminescence (CL)¹⁸. The reaction was initiated by adding 10 μL of tert-butyl hydroperoxide at a final concentration of 3 mM in 1 mL of RBC sample diluted in PBS (1:1300). The results were expressed as the area under the curve AUC/RBC (μg.mL⁻¹ protein).

Total thiol levels and catalase activity were measured in erythrocytes, as previously described for skin.

SOD activity was determined in erythrocytes by the inhibition of pyrogallol autoxidation, which was measured at 420 nm in a UV-1650 PC UV–visible spectrophotometer (Shimadzu).^{18,23} The final SOD results were expressed as Log (USOD/RB protein mg.mL⁻¹).

Protein concentration in RBC samples was determined according to Lowry^{16,17}, using BSA as standard. Plasma malondialdehyde (MDA) was measured by HPLC in an LC-20AT HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) as previously described²⁴. Briefly, 100µL of 0.5M perchloric acid was added to 100µL of plasma and incubated for 10 min on ice. Then the samples were incubated with 1% thiobarbituric acid (TBA) in boiling water for 30 min, followed by pH neutralization with 1M potassium phosphate buffer, pH 7. Readings were obtained at 535 nm over 11 min at a flow rate of 0.8 mL/min at 35°C and the results were expressed as Log (nmol MDA/g plasm protein).

2.5.2 Inflammatory damage

IL-6, IL-10, IL-1β and TNF-α were determined in serum samples using the ELISA kits previously described, according to manufacturer's instructions.

2.6 UV-induced immunosuppression evaluation

The contact hypersensitivity (CHS) reaction to oxazolone was used to determine the suppression of T cell mediated immune response^{25, 26}. Mice treated with metformin or PBS were exposed to 150 mJ/cm² of UVB radiation on three consecutive days, with their ears covered, or sham irradiated. Twenty-four hours after the final irradiation, mice were sensitized with 150 µL of 3% OXA in ethanol on abdominal skin. Six days after sensitization, mice were challenged on the ears with 10 µL of 1% OXA. Ear thickness was measured before the challenge and 24 h later. The results were expressed as ear swelling in mm.

2.7 Statistical analysis

The normality of the data sets was verified using the Shapiro–Wilk test. Differences between groups were investigated by ANOVA, using Tukey's post-test. All the statistical analyses were performed

using GraphPad Prism, version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and were considered statistically significant when (the P value was less than 0.05).

3. Results

3.1 Skin and epidermal damage

3.1.1 Histological alterations

Tissue damage was initially analyzed using H&E staining (Figure 1A). The skin of irradiated mice showed ulcerations with the loss of almost the entire epidermis (full arrow) and cellular infiltration of the upper dermis (Figure 1A IRR+PBS). Metformin treatment promoted partial recovery of the epidermis (empty arrow) and prevented the recruitment of cells to the upper dermis (Figure 1A IRR+MET).

3.1.2 p53 expression in skin cells

To further analyze cellular damage, we detected p53 expression in skin sections. Control groups (C+PBS and C+MET) showed no specific staining (Figure 1B). In contrast, this key protein in DNA repair was expressed in areas where the epidermis was still preserved (Figure 1B, IRR+PBS, full arrow). Cytoplasmic and nuclear labeling around hair follicles or exocrine glands was observed in metformin-treated mice (Figure 1B, IRR+MET, empty arrow).

3.2 Characterization of epidermal cell damage

To characterize the damage at a cellular level, we isolated epidermal cells to analyze Langerhans cells and the mitochondrial function of total cells.

3.2.1 Analysis of Langerhans cells (LCs)

CD11c⁺/CD207⁺ cells were selected as LCs (Figure 1C). UV irradiation promoted a dramatic decrease in the percentage of LCs (IRR+PBS). As described for the histological alterations, metformin partially prevented this effect (IRR+MET).

3.2.2 Analysis of epidermal cell mitochondrial function

Cells with an adequate mitochondrial membrane potential (high fluorescence in DiOC₆ probe) with low mitochondrial superoxide anion production (low fluorescence in MitoSOX probe) were considered to be metabolically active cells (Figure 3A, blue). Cells with higher MitoSOX and lower DiOC₆ labeling were considered to be metabolically defective cells (Figure 3A, red).

UV irradiation significantly reduced the metabolically active cells (Figure 3B, IRR+PBS: 36.20% vs C+PBS: 53.52%), and metformin treatment did not prevent this damage (IRR+MET: 33.28%). Concomitantly, the number of metabolically defective cells increased after UV irradiation (Figure 3C, IRR+PBS: 36.12% vs. C+PBS: 11.4%), and metformin had no effect (IRR+MET: 37.96%).

3.3 Molecular alterations associated with skin damage

3.3.1 Oxidative damage

The location of lipid peroxidation and nitrosative stress were analyzed (4-HNE and NT staining), and the levels of lipid peroxides, total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), catalase activity and total amount of thiol were quantified in skin homogenates.

In irradiated skin, labeling for 4-HNE and NT was observed in areas where the epidermis was still preserved (Figures 2A and B, IRR+PBS, full arrow). In metformin-treated mice, both stains were detected next to hair follicles and exocrine glands (Figures 2A and B, IRR+MET, empty arrow).

The levels of lipid peroxides in the irradiated group (IRR+PBS) were lower than those in control mice (1746 vs. 2372 AUC/skin $\mu\text{g protein.mL}^{-1}$) (Figure 2C). This decrease was prevented by metformin treatment (IRR+MET: 2469 AUC/skin $\mu\text{g protein.mL}^{-1}$).

TRAP showed similar results to lipid peroxide levels (Figure 2D). Total antioxidant capacity was significantly reduced in irradiated mouse skin compare with control samples (IRR+PBS: 510.8 vs. C+PBS: 941.2 mmol Trolox/g skin protein). Metformin treatment significantly increased the antioxidant capacity of mouse skin after irradiation (IRR+MET: 740.1 mmol Trolox/g skin protein).

Catalase activity was also affected by UV irradiation (Figure 2E). It significantly decreased in the IRR+PBS group compare with the C+PBS group (28.11 vs. 72.23 Vabs/g skin protein⁻¹.mL⁻¹).

Metformin treatment partially reversed this effect, such that catalase activity remained significantly lower than in control mice (IRR+MET: 49.42 Vabs/g skin protein⁻¹.mL⁻¹).

Finally, the total amount of thiol showed similar results to those described for TRAP (Figure 2F).

Irradiation decreased thiol levels (IRR+PBS: 14.24 vs. C+PBS: 26.39 thiol $\mu\text{mol/g}$ protein) and metformin restored them to the normal range (IRR+MET 22.17 thiol $\mu\text{mol/g}$ protein)

3.3.2 Inflammatory damage

Skin inflammation was determined by cytokine quantification in isolated epidermis and dermis homogenates (Figure 4). We determined three pro-inflammatory (IL-6, TNF- α and IL-1 β) and one anti-inflammatory cytokines (IL-10).

Regarding the epidermis, UV irradiation promoted a significant increase in the amount of IL-6 compare with control samples (IRR+PBS: 125.4 vs. C+PBS: 66.7 pg/mg protein) that was not prevented by metformin treatment (IRR+MET: 157.8 pg/mg protein) (Figure 4A). There were no significant changes in the other cytokines analyzed.

Regarding the dermis, irradiation promoted increases in all the pro-inflammatory cytokines analyzed (IRR+PBS: IL-6, 142.9; TNF- α , 147.1 and IL-1 β , 44.3 vs. C+PBS: 25.9; 81.7 and 13.8 pg/mg protein, respectively). Metformin treatment significantly reversed the increase in all three cytokines (IRR+MET: 51.4; 28.4 and 27.6 pg/mg protein, respectively) (Figure 4B). No significant differences were observed in IL-10 levels.

3.4 Molecular alterations associated with UV-induced systemic damage

3.4.1 Oxidative damage

To analyze the systemic effects of metformin treatment, we studied oxidative damage to RBCs and plasma MDA levels.

No alterations were observed in the lipoperoxidation of RBCs (Figure 5A) or in superoxide dismutase activity (Figure 5D). However, UV irradiation induced a significant reduction in thiol levels (Figure 5B, IRR+PBS: 270.1 vs. C+PBS: 404.6 thiol $\mu\text{mol}/\text{g}$ protein), which was reversed by metformin treatment (IRR+MET: 389.3 thiol $\mu\text{mol}/\text{g}$ RB protein). In contrast, catalase activity was increased by UV irradiation (Figure 5C, IRR+PBS: 1.675 vs. C+PBS: 1.52 Log[Abs.min-1/ RB protein mg.mL-1]), an effect that was prevented by metformin treatment (IRR+MET: 1.484 Log[Abs.min-1/ RB protein mg.mL-1]). Finally, plasma MDA levels increased about 20% following UV irradiation (Figure 5E, IRR+PBS vs. C+PBS) and were restored to basal level in the group treated with metformin (IRR+MET).

3.4.2 Inflammatory damage

The systemic inflammatory state was analyzed by the quantification of pro-inflammatory (IL-6, TNF- α and IL-1 β) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) in serum samples (Figure 6A).

Only serum IL-6 was increased by UV irradiation (IRR+PBS: 95.3 vs. C+PBS: 32.3 pg/ml), and metformin treatment partially reversed this increase (IRR+MET: 59.2 pg/ml).

3.5 Evaluation of UV-induced immunosuppression

Finally, we evaluated the effects of metformin on UV-induced immunosuppression of the CHS response. Exposure to three doses of UV radiation promoted a dramatic decrease in T cell-mediated inflammation (Figure 6B, IRR+PBS: 0.032 vs. C+PBS: 0.205 mm of ear swelling). As observed for the molecular mediators, metformin treatment partially restored the immune response (IRR+MET: 0.096 mm of ear swelling).

4. Discussion

UV radiation promotes DNA damage through alterations induced directly, as described by Finley²⁶, or indirectly via reactive oxygen and nitrogen species,^{1,27,28} which persists once exposure ceases⁵. The role of AMPK as a tumor suppressor has been demonstrated, due to its role in DNA repair

mechanisms¹². UV radiation also leads to immunological alterations, promoting local cytokine production and systemic immunosuppression^{1,3,5,29,30}.

Metformin presents effects that exceed glycemic control. This drug activates AMPK, favoring catabolic pathways^{8,31}, but it has also shown antioxidant, anti-inflammatory and cellular homeostasis modulatory capacity^{10,11,13}. In a previous study by our group, we observed a 54% reduction in melanoma size induced by metformin treatment¹³. Our hypothesis for this work was that metformin prevents skin and systemic oxidative and immunological alterations, which ultimately mediates its antitumoral effect.

First, we analyzed skin alterations. UVB produced skin alterations, including ulcerations and epidermal loss, that were partially prevented by metformin treatment^{12,32}. The p53 tumor suppressor protein was increased in UVB-exposed mice, in areas where the epidermis was still preserved. After irradiation of metformin-treated mice, p53 was observed at deeper sites in the skin, next to hair follicles and exocrine glands, where skin stem cells reside³³. This suggests a compensatory mechanism for UVB-induced damage.

Epidermal cells are deeply affected by UVB radiation. Langerhans cells were reduced after irradiation; however, metformin treatment partially prevented this effect. These cells are crucial epidermis resident antigen presenting cells, and their significant increase in the epidermis after irradiation may explain in part the anti-tumoral role of metformin. Epidermal cell metabolism is also affected by UVB radiation, leading to loss of mitochondrial membrane polarization and an increase in superoxide anion production^{15,34}. These effects were observed in irradiated mice, with a decrease in metabolically active cells and an increase in deficient cells. In this case, metformin produced no effects.

Next, we studied molecular alterations produced in the skin. To study oxidative and nitrosative damage, we evaluated the end products 4-HNE and NT in skin sections, which were increased after UVB exposure, as previously described by our group³⁵. Both products were present in UVB-irradiated mice, in areas where the epidermis was still preserved. Metformin treatment partially reversed these

alterations, resulting in less intense staining and damage to different sites, thus the stem cells were differentially affected. A recent study reported that these stem cells may be a useful treatment for UVB-induced skin damage, via an increase in antioxidant defenses mediated by nuclear factor erythroid-derived 2 (NRF-2)³⁶. Surprisingly, lipid peroxides were reduced in irradiated mouse skin, and were restored to control levels by metformin treatment. This reduction coincides with previously described decreases in lipid peroxides during the first 24 hours after irradiation³⁷. Regarding the antioxidant defense evaluated, TRAP was increased by metformin treatment, overcoming the failure caused by irradiation. A similar result was observed when we analyzed the amount of skin thiol and catalase activity in the skin. It is worth highlighting that metformin treatment has a strong tendency to promote the control of all prooxidant and antioxidant parameters, rather than functioning as a classical antioxidant. For instance, it decreased the prooxidants 4-HNE and NT and increased lipid peroxides and all antioxidant parameters. These results demonstrate that metformin mainly participates in maintaining balance in the redox profile of the skin following exposure to UVB radiation, which is very important trigger in cancer signaling.

In addition to oxidative damage, UVB radiation promotes local cytokine release (both pro- and anti-inflammatory) by epidermal and dermal cells, which may affect the immune response^{33,38}. In the epidermis, we only observed an UVB-induced increase in IL-6 production that was not affected by metformin treatment. In contrast, we observed increases in the three pro-inflammatory cytokines evaluated in the dermis (TNF- α , IL-6 and IL-1 β), which were all downmodulated by metformin treatment. These results demonstrate that metformin treatment protects the skin against the UVB-induced inflammation, as previously described in tumor models via inhibition of NF- κ B translocation¹⁰.

Finally, we evaluated the role of metformin in UVB-induced systemic alterations. No significant alterations were observed in lipid peroxides or SOD activity in RBCs induced by radiation or metformin treatment. Total thiol levels, the main antioxidant of the cells³⁹, were diminished after irradiation, but normal levels were restored by metformin treatment. The antioxidant effect of

metformin has been described against different stimuli, via an increase in the antioxidant enzyme through NRF-2¹¹. We observed an increase in the levels of catalase activity in irradiated mice, which may be a response to increased H₂O₂. This increase in catalase activity was prevented in metformin-treated animals, suggesting that the oxidative damage that triggered the production of the enzyme was controlled by the treatment^{35,37}. MDA plasma levels, a major product of membrane lipoperoxidation, were increased by irradiation and returned to basal levels by metformin treatment. A similar result was obtained in a murine melanoma model treated with metformin¹³, demonstrating the role of the drug against systemic lipoperoxidation.

Systemic immunological alterations were evaluated by serum cytokine quantification and the evaluation of T cell-mediated systemic response to cutaneous applied antigen (CHS reaction). UVB radiation induced systemic inflammation (increased IL-6 serum levels), which was reversed by metformin treatment, as observed for cutaneous inflammation. Finally, we studied UVB-induced systemic immunosuppression, a reaction that involves many cellular and molecular mediators, not only cytokines, but also ROS, and is strongly associated with skin cancer development^{25,26,34}. As is well known, UVB radiation dramatically decreases the CHS reaction. In agreement with most of the experiments presented, metformin treatment efficiently prevented the damage, by partially restoring the CHS response.

Finally, it should be pointed out that there is a narrow link between the redox system, immune response and cell injury mediated by signaling pathways. Thus, the present work showed that the UVB exposure in mice leads to local and systemic deregulation of the oxidative balance, increasing certain mechanisms of oxidative damage and decreasing others, while decreasing antioxidant defense. Metformin treatment, partially or totally restored control of all these parameters, which was accompanied by improvement in tissue injury. Moreover, metformin improved the balance of the immune response, reversing inflammation and immunosuppression. These findings indicate metformin is worth evaluating as a potential agent to maintain skin homeostasis, potentially preventing UVB-induced lesions that could progress to cancer.

References

- [1] G.M. Halliday, Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis, *Mutat. Res* 571 (2005) 107–20.
- [2] A. Tewari, K. Grysb, J. Kollet, R. Sarkany, A.R. Young, Upregulation of MMP12 and Its Activity by UVA1 in Human Skin: Potential Implications for Photoaging, *J. Invest. Dermatol* 134 (2014) 2598–2609.
- [3] G.J. Delinasios, M. Karbaschi, M.S. Cooke, A.R. Young, Vitamin E inhibits the UVA1 induction of “light” and “dark” cyclobutane pyrimidine dimers, and oxidatively generated DNA damage, in keratinocytes, *Scientific Reports* 8 (2018) 423-8.
- [4] L. Marrot, J.R. Meunier. Skin DNA photodamage and its biological consequences, *J. Am. Acad. Dermatol* 58 (2008) 139-148.
- [5] S. Premi, S. Wallisch, C.M. Mano, A.B. Weiner, A. Bacchiocchi, K. Wakamatsu, *et al.*, Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure, *Science* 347 (2015) 842–847.
- [6] H. Nakazawa, D. English, P.L. Randell, K. Nakazawa, N. Martel, B.K. Armstrong, H. Yamasaki, UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 4 (1994) 360-4.
- [7] V. Shreedhar, T. Giese, V.W. Sung, S.E. Ullrich, A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression, *J Immunology* 15 (1998) 3783-89.
- [8] M.H. Zou, S.S. Kirkpatrick, B.J. Davis, J.S. Nelson, W.G. Wiles IV, U. Schlattner, *et al.*, Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo role of mitochondrial reactive nitrogen species, *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 43940-51.
- [9] D.G. Hardie, F.A. Ross, S.A. Hawley, AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nature reviews Molecular cell biology* 13 (2012) 251-62.

- [10] H.A. Hirsch, D. Iliopoulos, K. Struhl, Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (2013) 972-977.
- [11] J.D. Watson, Type 2 diabetes as a redox disease, *The Lancet* 383 (2014): 841-843.
- [12] C.L. Wu, L. Qiang, W. Han, M. Ming, B. Viollet, *et al.*, Role of AMPK in UVB-induced DNA damage repair and growth control, *Oncogene* 32 (2013) 2682-9.
- [13] F.P. Souza-Neto, S.S. Bernardes, P.C. Marinello, G.P. Melo, R.C. Luiz, R. Cecchini, *et al.*, Metformin: oxidative and proliferative parameters in-vitro and in-vivo models of murine melanoma. *Melanoma Research* 27 (2017) 536-544.
- [14] T. Tomic, T. Botton, M. Cerezo, G. Robert, F. Luciano, A. Puissant, *et al.*, Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell death & disease* 2 (2011) e199.
- [15] D.H. González Maglio, E.M. Cela, A. Ferrari, J. Leoni, Mitochondrial function evaluation in epidermal cells ex vivo after ultraviolet irradiation, *Experimental Dermatology* 20 (2011) 947-950.
- [16] O.H. Lowry, N.S. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry* 193 (1951) 265-275.
- [17] G.L. Miller, Protein determination for large number of samples, *Analytical Chemistry* 31 (1959) 964.
- [18] C. Panis, A.C.S.A. Herrera, V.J. Victorino, F.C. Campos, L.F. Freitas, T. Rossi, *et al.*, Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy, *Breast cancer research and treatment* 133 (2012) 89-97.
- [19] A. Zamburlini, M. Maiorino, P. Barbera, A.M. Pastorino, A. Roveri, L. Cominacini, *et al.*, Measurement of lipid hydroperoxides in plasma lipoproteins by a new highly-sensitive 'single photon counting' luminometer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1256 (1995) 233-240.

- [20] M. Repetto, C. Reides, M.L.G. Carretero, M. Costa, G. Griemberg, S. Liesuy, Oxidative stress in blood of HIV infected patients, *Clinica Chimica Acta* 255 (1996) 107-117.
- [21] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods in Enzymology* 105 (1984) 121-126.
- [22] M.L. Hu, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, *Methods in enzymology* 233 (1994) 380-385.
- [23] S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *European Journal of Biochemistry* 47 (1974) 469-474.
- [24] V. Victorino, C. Panis, F.C. Campos, R.C. Cayres, A.N. Colado-Simão, S.R. Oliveira, *et al.*, Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women, *Age* 35 (2013) 1411-1421.
- [25] V.E. Reeve, Ultraviolet radiation and the contact hypersensitivity reaction in mice, *Methods* 28 (2002) 20-24.
- [26] A. Schwarz, A. Maeda, M.K. Wild, K. Kernebeck, N. Gross, Y. Aragane, *et al.*, Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity, *The Journal of Immunology* 172 (2004) 1036-1043.
- [27] P. Ghezzi, V. Jaquet, F. Marcucci, H.H.W. Schmidt, The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects, *British journal of pharmacology* 174 (2017) 1784-1796.
- [28] L. Zastrow, M.C. Meinke, S. Albrecht, A. Patzelt, J. Lademann, From UV Protection to Protection in the Whole Spectral Range of the Solar Radiation: New Aspects of Sunscreen Development. In: *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* 996 (2017) 311-318.
- [29] M.L. Kripke, Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light, *Journal of the National Cancer Institute* 53 (1974) 1333-1336.
- [30] F.S. Weill, E.M. Cela, A. Ferrari, M.L. Paz, J. Leoni, D.H. Gonzalez Maglio, Skin exposure to chronic but not acute UV radiation affects peripheral T-cell function, *Journal of Toxicology and Environmental Health* 74 (2011) 838-847.

- [31] Y. Saisho, Metformin and inflammation: Its potential beyond glucose-lowering effect, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 15 (2015) 196-205.
- [32] D.H.G. Maglio, M.L. Paz, A. Ferrari, F.S. Weill, J. Nieto, J. Leoni, Alterations in skin immune response throughout chronic UVB irradiation—Skin cancer development and prevention by naproxen, *Photochemistry and photobiology* 86 (2010) 146-152.
- [33] M. Merad, F. Ginhoux, M. Collin, Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells, *Nature Reviews Immunology* 8 (2008) 935-47.
- [34] E.M. Cela, C.D. Gonzalez, A. Friedrich, C. Ledo, M.P. Paz, J. Leoni, *et al.*, Daily very low UV dose exposure enhances adaptive immunity, compared with a single high-dose exposure. Consequences for the control of a skin infection, *Immunology* 154 (2018) 510-521.
- [35] V.A. Terra, F.P. Souza-Neto, R.C. Pereira, T.N.X. Silva, L.N.Z. Ramalho, R.C. Luiz, *et al.*, Nitric oxide is responsible for oxidative skin injury and modulation of cell proliferation after 24 hours of UVB exposures, *Free radical research* 46 (2012) 872-882.
- [36] D. Xian, X. Gao, X. Xiong, J. Xu, L. Yang, L. Pan, *et al.*, Photoprotection against UV-induced damage by skin-derived precursors in hairless mice, *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 175 (2017) 73-82.
- [37] D.H.G. Maglio, M.L. Paz, A. Ferrari, S.W. Federico, A. Czerniczyniec, J. Leoni, *et al.*, Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production, *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* 21 (2005) 311-317.
- [38] T.G. Kim, S.H. Kim, M.G. Lee, The Origin of Skin Dendritic Cell Network and Its Role in Psoriasis, *International journal of molecular sciences* 19 (2017)e42.
- [39] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, fourth ed., Oxford, 2007.

Figure Legends

Figure 1. Skin alterations in control (C+PBS), metformin-treated (C+MET), UVB-irradiated (IRR+PBS) and UVB-irradiated plus metformin-treated (IRR+MET) mice. A) Skin histological analysis (H&E staining) was performed on 5 animals per group. A representative image is shown for each experimental group. Non-irradiated mice showed no skin alterations. Irradiated mice showed ulcerations and epidermal loss (IRR+PBS, solid arrow), whereas mice treated with metformin showed partial recovery of the epidermis (IRR+MET, outline arrow). B) p53 immune staining in skin sections. Control mice showed no specific staining. In the UVB-exposed mice, areas of specific staining were observed in portions of epidermis that remain after irradiation (IRR+PBS, solid arrow). Metformin treatment promoted the expression of the protein in the hair follicle and exocrine gland cells (IRR+MET, outline arrow). C) Analysis of epidermal Langerhans cells (LCs) was performed on isolated epidermal cells, stained with anti-CD11c and anti-CD207 (Langerin) antibodies. One representative staining per group is presented, highlighting the population analyzed as LCs. The bar graph represents the percentage of LCs in each treatment group (mean \pm SD, n=6). Statistical significance was established by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

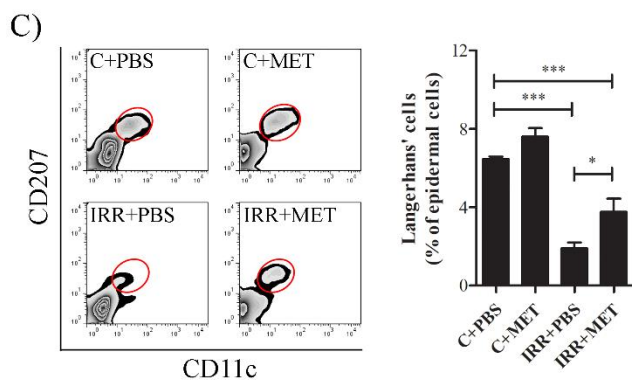
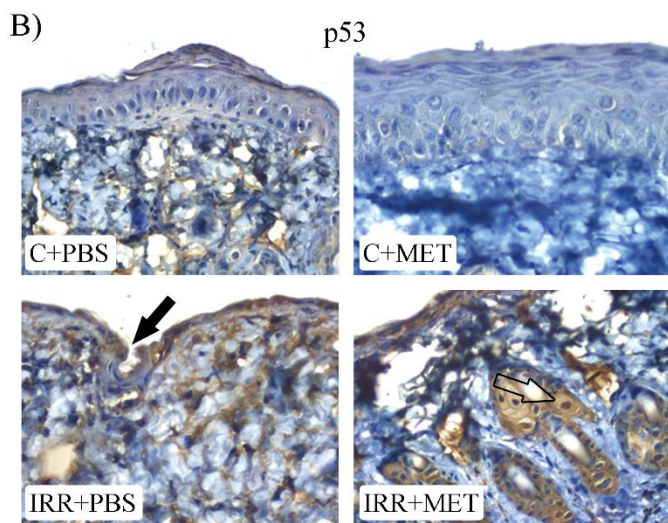
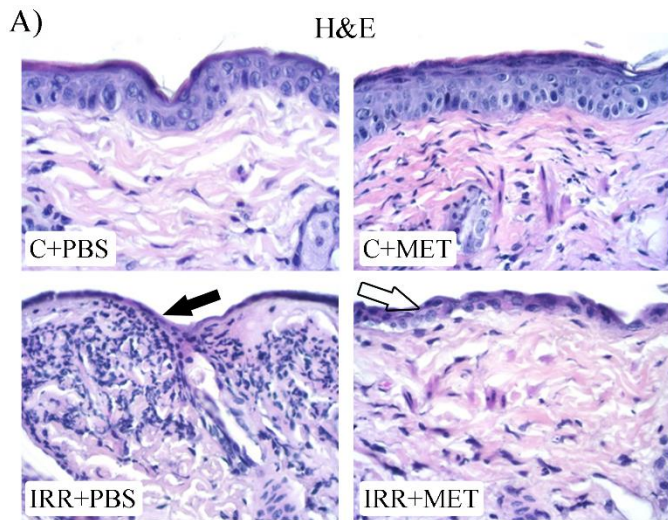
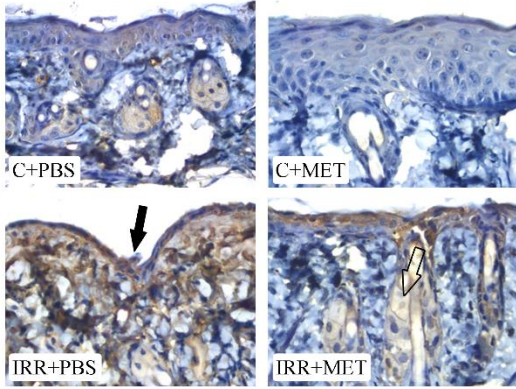
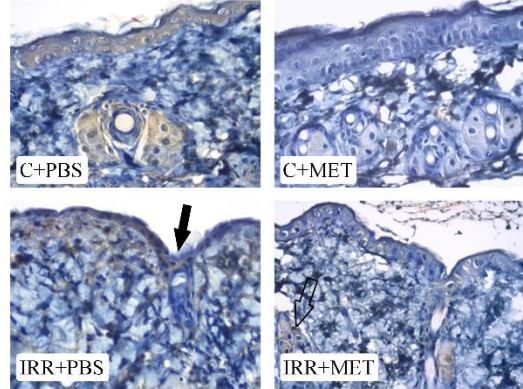


Figure 2. Cutaneous oxidative damage. A) and B), a representative image is shown for each experimental group (n=6). Control groups showed no staining. A) 4-HNE (final product of lipid peroxidation) specific staining on skin sections. In UVB-exposed mice, the damage was located in the epidermis, where it was still present (IRR+PBS, solid arrow); whereas in metformin-treated mice, the staining presented deeper in the dermis (IRR+MET, outline arrow). B) NT specific staining on skin sections. In UVB-irradiated mice, the nitrosative damage was high in epidermis (IRR+PBS, solid arrow). In metformin-treated mice, partial reversion of the damage was observed, indicated by light staining at the level of the hair follicle and in exocrine glands (IRR+MET, outline arrow). C) Lipid peroxides were evaluated by chemiluminescence in skin homogenates. The results were normalized by protein content. D) Total antioxidant capacity (TRAP) was evaluated in skin homogenates using luminol and normalized by total protein content. E) Catalase activity was measured by the decrease in hydrogen peroxide absorbance. Activity was normalized by total protein content. F) Total thiol groups were quantified against a GSH concentration curve. Results were normalized by protein concentration. C) to F) Bar graph represents the mean \pm SD values (n=6). Statistical significance was established by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

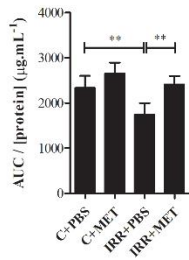
A) 4-Hydroxynonenal



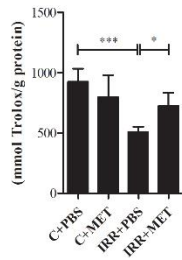
B) Nitrotyrosine



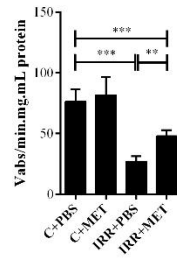
C) Lipoperoxides



D) TRAP



E) Catalase



F) Thiol

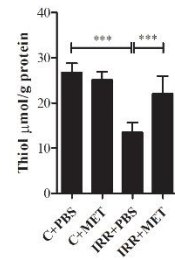


Figure 3. UVB-induced mitochondrial damage to epidermal cells. A) Epidermal cell populations were divided, according to their mitochondrial polarization (DiOC_6) and mitochondrial superoxide anion production (MitoSOX), into metabolically active (blue gate) and defective (red gate) cells. One representative mouse is shown for each experimental group. B) Quantification of metabolically active cells and C) Metabolically defective cells in the four experimental groups (mean \pm SD, $n=5$). Statistical significance was established by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

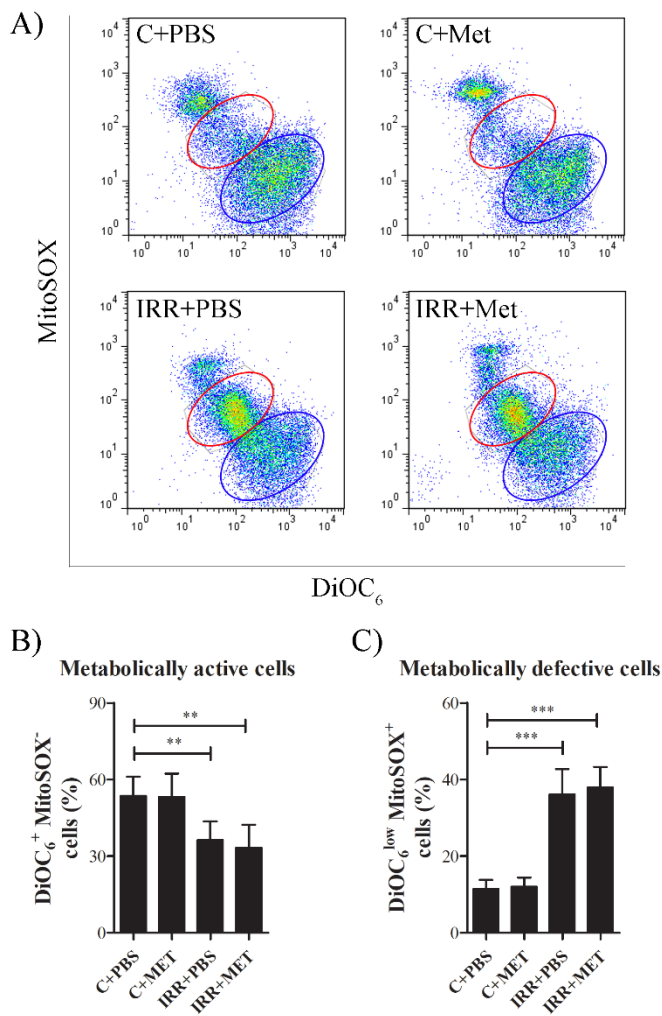
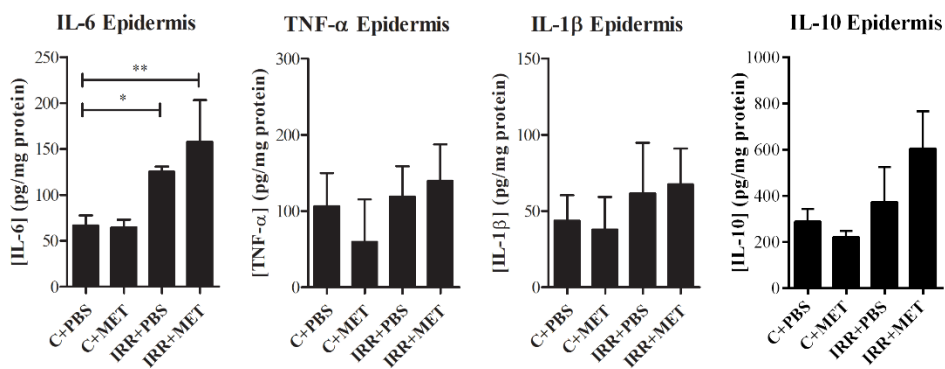


Figure 4. Cutaneous inflammatory response. Pro-inflammatory (IL-6, TNF- α and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines were evaluated in A) Epidermis and B) Dermis homogenates. Quantification was performed in the different experimental group (mean \pm SD, n=5). Statistical significance was established by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. *p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

A)



B)

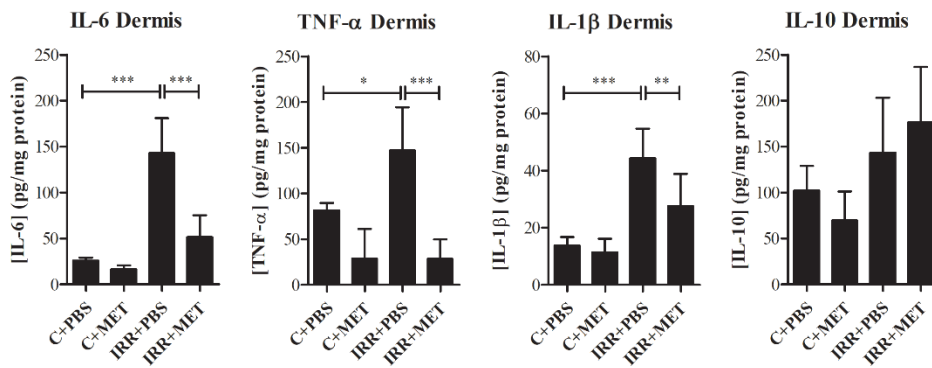
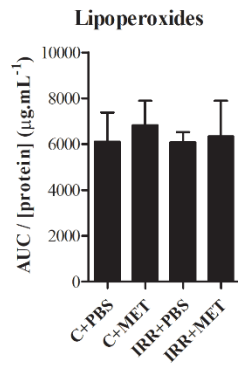
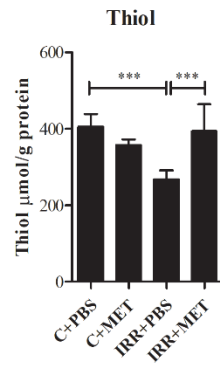


Figure 5. Systemic oxidative stress. Four parameters were evaluated in red blood cells (A to D), to study systemic oxidative damage induced by UVB radiation and modulated by metformin treatment. A) Lipid peroxides were evaluated by chemiluminescence. The results were normalized by protein content. B) Total thiol groups were quantified against a GSH concentration curve. Results were normalized by protein concentration. C) Catalase activity was measured by the decrease in hydrogen peroxide absorbance. Activity was normalized by total protein content. D) Superoxide dismutase was studied by the inhibition of pyrogallol autoxidation. Results were normalized by protein concentration. E) Malondialdehyde was evaluated on serum samples by HPLC. Results were normalized by protein concentration. Bar graphs represent the mean \pm SD (n=6). Statistical significance was established by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. *p<0.05; *** p<0.001.

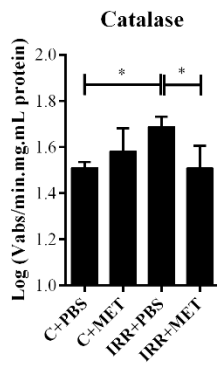
A)



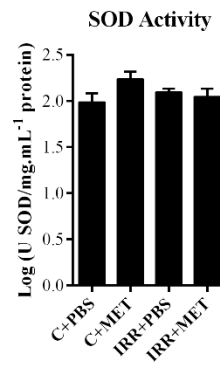
B)



C)



D)



E)

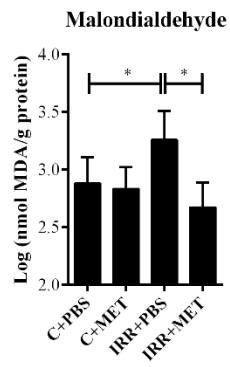
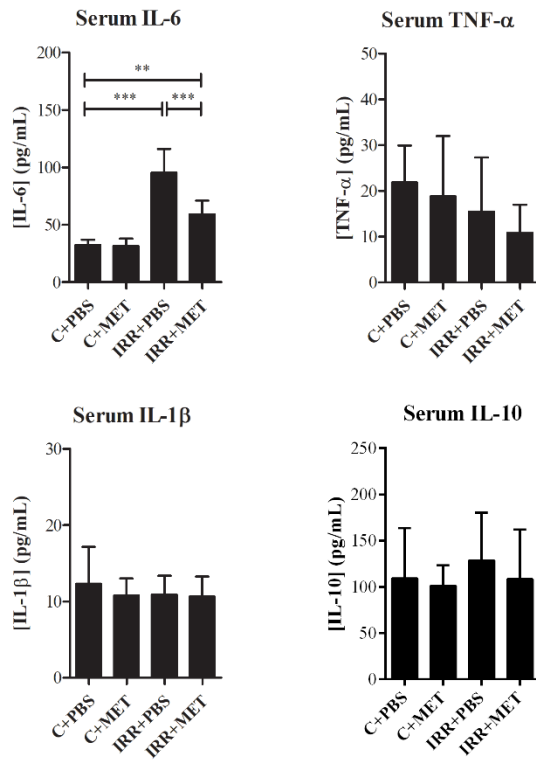


Figure 6. Systemic immune response. A) Pro-inflammatory (IL-6, TNF- α and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines were evaluated in serum samples from the control, UVB-exposed and metformin-treated mice. B) Contact hypersensitivity reaction to oxazolone was used to study systemic alterations of a T cell-mediated immune response. Sensitization of the mice was performed on abdominal skin after PBS or metformin treatment, and three exposures to UVB or sham irradiation, according to the experimental group. Six days after sensitization, ears were measured and challenged with oxazolone. Twenty-four hours later, the ear swelling was evaluated. For all the experimental groups, n=5. Statistical significance was established by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. *p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

A)



B)

