

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**



RODRIGO AUGUSTO DA SILVA

**VIAS DE SOBREVIVÊNCIA E MORTE EM QUERATINÓCITOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE OXIDATIVO E CHOQUE HIPEROSMÓTICO**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Rodrigo Augusto da Silva e aprovada pela Comissão Julgadora. Giselle Zenker Justo

ORIENTADORA: Profa. Dra. GISELLE ZENKER JUSTO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA CAROLINA SANTOS DE SOUZA GALVÃO

CAMPINAS – SP

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Si38v

Silva, Rodrigo Augusto da
Vias de sobrevivência e morte em queratinócitos submetidos ao estresse oxidativo e choque hiperosmótico / Rodrigo Augusto da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Giselle Zenker Justo.
Coorientador: Ana Carolina Santos de Souza Galvão.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Queratinócitos. 2. Estresse oxidativo. 3. Estresse hiperosmótico. 4. Morte celular. 5. Transdução de sinal.
I. Justo, Giselle Zenker. II. Galvão, Ana Carolina Santos de Souza. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Survival and death signaling pathways in keratinocytes exposed to oxidative stress and hyperosmotic shock.

Palavras-chave em inglês: Keratinocytes; Hyperosmotic stress; Oxidative stress; Cell death; Signal transduction.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Giselle Zenker Justo, Nilana Meza Tenório, Ana Paula de Souza Pardo, José Mauro Granjeiro, Fábio Dupart Nascimento.

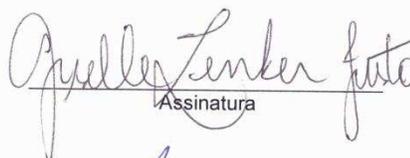
Data da defesa: 27/06/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 27 de Junho de 2011

BANCA EXAMINADORA

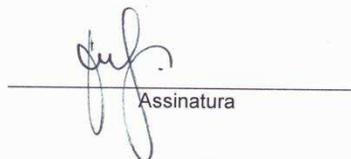
Profa. Dra. Giselle Zenker Justo (Orientadora)


Assinatura

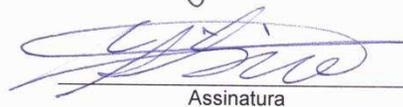
Profa. Dra. Nilana Meza Tenório de Barros


Assinatura

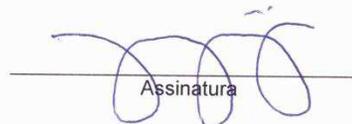
Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo


Assinatura

Prof. Dr. Fábio Dupart Nascimento


Assinatura

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro


Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal

Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Dedicatória

*Primeiramente,
a Deus*

Ser transcendental e perfeito, substância infinita e soberana, imanente a todo real, que certamente “se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos de minha caminhada”.

E, passo a passo, pude sentir a sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir...

“A sua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e sinto que, em meu gesto existe o seu gesto e, em minha voz, a sua voz”.

(Vinícius de Moraes)

Aos meus pais

Valter Salvador Ribeiro da Silva
e
Aparecida Donizete Foganholi da Silva

Dedico a vocês dois pensamentos, que estão intimamente relacionados com a vida que viveram e vivem.

Saibam que os ensinamentos que repassaram, os ideais de honra e honestidade que sempre cultivaram, o amor e carinho sempre estiveram e estarão presentes em nossa família.

“Não possuir algumas das coisas que desejamos é parte indispensável da felicidade”.

(Bertrand Russel)

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio”.

(Martin Luther King Jr.)

*Aos meus irmãos
Raeder Augusto da Silva
e
Rafaela Cristina Foganholi da Silva*

*Cada um com sua particularidade, sua personalidade, trajetória e
história de vida.*

*Saibam que mesmo que nossos caminhos nos levem para
destinos diferentes, separados pelo espaço físico, sempre estaremos
juntos.*

Este é nosso maior trunfo...

*Esta é exatamente a maior das alegrias que guardo e cultivo com
muito carinho, o fato de compartilhar
com vocês a minha vida, as minhas conquistas.*

*Saibam que a conquista de um é a comemoração de todos.
O obstáculo de um sempre reflete no auxílio e dedicação de todos
para sua superação.*

Amo todos vocês...

Agradecimentos especiais

Daisy, Mika, Ana e Nize

Hoje sei ...

Quais foram as pessoas que realmente fizeram a diferença, e quais realmente fazem parte desse “eu” que eu me tornei.

(autor desconhecido)

Saibam que não poderia deixar de agradecer de forma especial a vocês...

Gostaria que soubessem que sem o apoio e amizade de vocês dificilmente teria iniciado e finalizado mais esta etapa de minha formação pessoal e profissional. A presença de vocês foi decisiva nesta etapa.

Hoje tenho a certeza que sou uma pessoa de sorte, pois fui privilegiado com a presença de pessoas especiais em minha vida, em minha formação. Muito mais importante que minha formação profissional, a convivência com vocês me fez crescer como pessoa, respeitando em primeiro lugar o eu de cada pessoa.

Deixo aqui meu muito obrigado por vocês terem me adotado como colega de trabalho, amigo, irmão mais novo, pelos mimos, que por sinal assumo, adoro ser mimado, por tudo ...

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos professores que foram responsáveis por despertar em mim a paixão pela ciência. Deixo aqui meus agradecimentos aos professores do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Sagrado Coração de Jesus – USC-Bauru, foi lá que tudo começou.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Giselle Zenker Justo** e minha co-orientadora, **Profa. Dra. Ana Carolina S.S. Galvão**, pela orientação concedida e por todos os ensinamentos e contribuições durante minha formação e desenvolvimento desse projeto.

Ao **Prof. José Mauro Granjeiro**, pois foi o primeiro “doido” a aceitar orientar um aluno desorientado. Foi em seu laboratório, em Bauru, que tudo começou. Confesso que o primeiro dia foi assustador. Com uma postura dura e objetiva perguntou-me: - Vocês estão aqui pra fazer pesquisa, estão dispostos? - Mas com o passar dos dias se revelou a pessoa fantástica que é. Saiba que guardo até hoje perguntas simples, mas que fizeram toda diferença durante minha formação: “Qual a forma estrutural e molecular do composto? Qual sua função? Qual o fundamento da técnica utilizada?” E por ai vai... Deixo aqui meus sinceros agradecimentos pela paciência e pela orientação concedida.

Não posso deixar de lembrar da **Thelma Lopes** e do **Ovídio dos Santos Sobrinho**, técnicos da FOB – Bauru. Estes sim tiveram trabalho!

A **Profa. Ana Paula de Souza Pardo**, pessoa fantástica, responsável e excelente profissional. Abriu as portas de seu laboratório e me apresentou na prática o mundo molecular que antes só conhecia na teoria. Em seu laboratório, realizei minha primeira extração de DNA, meu primeiro PCR, genotipei meu primeiro paciente, primeiro de muitos que vieram. Trabalhamos juntos por um curto período, mas talvez, um dos mais produtivos cientificamente. Agradeço pela confiança depositada em mim, na época em que era apenas um aluno de iniciação científica. Hoje realmente posso afirmar que as coisas não acontecem por acaso, pois mesmo você sendo professora da USC, foi por intermédio do Mauro, na FOP, que fomos apresentados e hoje teremos a possibilidade de trabalharmos juntos novamente. Estou na torcida!

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular do curso de Biologia Oral- USC/Bauru, em especial ao colega de turma, parceiro de iniciação e técnico **Wilson Orcini**.

A Profa. **Carmen V. Ferreira**, exemplo de postura, conduta, dedicação e profissionalismo. Agradeço pela oportunidade de desenvolver em seu Laboratório a maior parte de minha tese. Com isso tive a oportunidade de aprender muito mais que técnicas experimentais ou cultivo celular, aprendi o respeito pelo próximo e pelo grupo.

Aos membros do “**Laboratório de Bioensaios *in vitro* e Transdução de Sinal-IB/UNICAMP**”, professores, técnicos, alunos de iniciação científica e pós-graduandos. Em especial as técnicas Cláudia e Denise, pelos ensinamentos e treinamentos de cultura celular.

Ao **Prof. Dr. Hiroshi Aoyama**, uma pessoa indescritível por palavras, exemplo fantástico de ser humano e pesquisador, no qual todos deveriam se espelhar.

Aos membros do Laboratório de Enzimologia-IB/UNICAMP, em especial a **Erika Ferraresso**, agradeço pela paciência e disponibilidade em sempre estar pronta a socorrer e ajudar nos momentos de necessidade, principalmente nos ajustes finais de formatação.

A turma de Biologia – USC-Bauru, as amigadas que perduram até hoje em especial a **Karina**, mais conhecida como **Micum**, companheira indispensável de projetos, trabalhos, estudos, festas e bebedeiras.

Aos Professores **Dr. Jörg Kobarg**, **Dra. Luciana Maria de Hollanda** e **Dra. Nilana Barros**, pelas colocações no exame de qualificação.

A **FAPESP**, **CAPES**, **rede Nanocosméticos (CNPq/MCT)** e **CNPq**, pela concessão de bolsa de estudo, reserva técnica e financiamento para pesquisa.

Aos funcionários das Secretarias de Graduação e de Pós-Graduação do Instituto de Biologia, **Andréia**, **Marina** e **Silvia**, pelo profissionalismo e atenção dispensados.

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular-INFAR/UNIFESP, em especial as técnicas responsáveis e principalmente ao **Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero** do Departamento de Biofísica-UNIFESP, pelo apoio logístico e científico. Sua colaboração foi fundamental para a qualidade final deste trabalho.

Aos meus amigos de república **Marina**, **Paula**, **Géssika**, **Willian**, **Alex**, **José Evaristo**, **Antônio** e **Alexandre**, convivência muitas vezes difícil, mas de grande aprendizado.

A “**Família Machado**”, pelo carinho e amizade.

Aos meus colegas de laboratório, **Camila**, **Luciana**, **Roberta**, **Bispo**, **Karla**, **Maria Augusta**, **Paula**, **Marylia**, **Ana Laura**, **Luisa**, **Rodolpho**, **Sarah**, **Júlia**, **Josélia**, **Karin** e **Cintia** pela convivência e paciência.

A **Cláudia de Lourdes Soraggi**, pela paciência, impecável organização e pela força nos preparativos de minha comemoração de defesa, com você como responsável sei que posso ficar despreocupado, pois a qualidade e organização são certas.

A **Sarah Azoubel** que sempre se mostrou uma ótima amiga. Companheira para as corridas matinais de domingo na lagoa do Taquaral, pelas pedaladas pelo campus, pela correção dos resumos em inglês, pela confecção dos esquemas que sempre fazem sucesso na apresentação dos pôsteres, seminários, etc.

Ao **Gilbert**, mais que um professor de inglês, um psicanalista, um psicólogo, um amigo, um irmão mais velho, que em pouco tempo conseguiu fazer milagres e colocar, nem sei como em minha cabeça, o básico do básico desta língua fantástica, que pra mim era grego. Valeu!

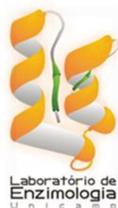
Às Instituições:



Aos Professores:



Profa. Dra. Helena Nader



Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

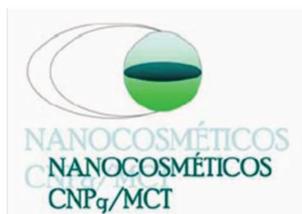


Profa. Dra. Carmen V. Ferreira



Prof. Dr. Maikel Peppelenbosch

Às Agências de fomento:



SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xxi
RESUMO.....	xxxiii
ABSTRACT.....	xxxv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Estresse oxidativo e estresse hiperosmótico em queratinócitos	04
1.1.1. Estresse oxidativo.....	04
1.1.2. Estresse hiperosmótico.....	06
1.2. Sobrevivência e morte de queratinócitos	09
1.3. Lisossomos e apoptose.....	16
1.4. Estado redox celular e apoptose	18
1.5. Sinalização celular e proteínas fosfatases.....	21
1.6. Metaloproteinases	24
1.7. Citoesqueleto.....	26
1.8. Microarranjos de peptídeos (PepChip).....	28
1.9. Riboflavina	30
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Reagentes	39
3.2. Métodos.....	42
3.2.1. Manutenção de células HaCaT	42
3.2.2. Curva de crescimento celular.....	42
3.2.3. Exposição das células HaCaT ao choque hiperosmótico (sorbitol) e ao estresse oxidativo (H ₂ O ₂)	43
3.2.4. Irradiação da riboflavina	44
3.2.5. Avaliação dos efeitos da riboflavina e riboflavina irradiada sobre a viabilidade de células HaCaT.....	44
3.2.6. Análise da viabilidade celular.....	45
3.2.7. Pré-tratamento das células HaCaT submetidas aos dois tipos de estresse com geldanamicina (GA)	48
3.2.8. Determinação da atividade de caspases 3, 8 e 9	48
3.2.9. Citometria de fluxo	49
3.2.10. Microscopia confocal.....	51
3.2.11. Análise do perfil quinásico de células HaCaT expostas ao estresse hiperosmótico e oxidativo empregando-se o PepChip	55
3.2.12. Avaliação da atividade de LMWPTP	57
3.2.13. <i>Western blotting</i>	59
3.2.14. Zimografia	60
3.2.15. Análise estatística	61
4. RESULTADOS	63
4.1. Curva de crescimento celular	63
4.2. Exposição das células HaCaT ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo	64

4.3. Avaliação da capacidade de recuperação das células HaCaT após exposição ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo.....	65
4.4. Avaliação da morte celular	67
4.4.1. Alterações morfológicas induzidas pelo estresse em células HaCaT	67
4.4.2. Análise de morte celular por citometria de fluxo após marcação das células com AnexinaV-FITC/PI	70
4.4.3. Avaliação da integridade da membrana plasmática pela atividade da LDH	73
4.4.4. Ativação de caspases em células HaCaT submetidas ao estresse.....	74
4.4.5. Avaliação da expressão de proteínas pró- e anti-apotóticas em células HaCaT expostas ao estresse.....	75
4.4.6. Potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e distribuição celular de fatores apoptogênicos em células HaCaT submetidas ao estresse.....	81
4.4.7. Permeabilização da membrana lisossomal e participação de catepsina B na morte celular induzida pelos agentes estressores	86
4.5. Avaliação do estado redox celular	89
4.6. Expressão e atividade de proteínas quinases da família das MAPKs	92
4.7. Avaliação do envolvimento da via JAK/STAT na resposta de células HaCaT aos diferentes tipos de estresse	94
4.8. Expressão e atividade da LMWPTP após exposição de células HaCaT aos diferentes tipos de estresse	96
4.9. Organização estrutural dos filamentos de actina e avaliação de proteínas relacionadas ao rearranjo do citoesqueleto	97
4.10. Avaliação da atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9.....	102
4.11. Análise do perfil quinásico de células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo empregando-se o PepChip	103
4.12. Avaliação dos efeitos da riboflavina e riboflavina irradiada sobre a viabilidade de células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo	107
5. DISCUSSÃO	111
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	145
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
8. ANEXO	171

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de uma secção transversal da pele	02
Figura 2: Indução de apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca.....	11
Figura 3: Layout do “Pepchip Kinomics”	29
Figura 4: Estrutura química da riboflavina.....	30
Figura 5: Mecanismos de fotodegradação da riboflavina.....	34
Figura 6: Estrutura química dos principais fotoprodutos da riboflavina ..	35
Figura 7: Curva de crescimento de queratinócitos humanos da linhagem HaCaT	63
Figura 8: Efeitos do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo sobre a viabilidade de células HaCaT	64
Figura 9: Análise da viabilidade de células HaCaT submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo por 2 e 4 h respectivamente	65
Figura 10: Viabilidade de queratinócitos humanos expostos ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo após diferentes tempos de recuperação	66
Figura 11: Curva de crescimento de células HaCaT após exposição ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo.....	67
Figura 12: Alterações morfológicas induzidas pelo choque hiperosmótico e estresse oxidativo em células HaCaT	69
Figura 13: Indução de apoptose e necrose em células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico	71
Figura 14: Indução de apoptose e necrose em células HaCaT expostas ao estresse oxidativo	73
Figura 15: Integridade da membrana plasmática de queratinócitos expostos ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo.....	74
Figura 16: Alterações na atividade das caspases 3, 8 e 9 em células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico	76
Figura 17: Alterações na atividade das caspases 3, 8 e 9 em células HaCaT expostas ao estresse oxidativo	77

Figura 18: Efeitos da exposição de células HaCaT ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo sobre a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas.....	79
Figura 19: Viabilidade de células HaCaT pré-tratadas com geldanamicina (GA) e expostas ao estresse oxidativo.....	80
Figura 20. Efeito do pré-tratamento com geldanamicina (GA) sobre a ativação de caspase 9 em células HaCaT expostas ao estresse oxidativo	81
Figura 21: Efeitos do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo sobre o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de células HaCaT.....	83
Figura 22: Liberação de citocromo c em células HaCaT submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo.....	84
Figura 23: Liberação de AIF em células HaCaT submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo	85
Figura 24: Avaliação da integridade da membrana lisossomal em células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo.....	87
Figura 25: Localização celular da catepsina B após exposição de células HaCaT ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo	89
Figura 26: Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células HaCaT submetidas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo	90
Figura 27: Efeitos do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo sobre a expressão de enzimas do sistema antioxidante celular	91
Figura 28: Níveis de expressão e fosforilação de MAPKs	93
Figura 29: Efeitos do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo sobre a fosforilação das proteínas JAKs, STATs e fosfatase SHP2 em células HaCaT	95
Figura 30: Alterações na expressão e atividade da LMWPTP em células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo.....	97
Figura 31: Análise da distribuição da cofilina e da organização dos filamentos de F-actina após exposição de células HaCaT ao estresse oxidativo.....	99

Figura 32: Expressão e níveis de fosforilação de proteínas envolvidas no remodelamento do citoesqueleto em células HaCaT expostas ao estresse oxidativo.....	101
Figura 33: Atividade de metaloproteinases após exposição de células HaCaT ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo	103
Figura 34: Perfil quinásico de células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico.....	105
Figura 35: Perfil quinásico de células HaCaT expostas ao estresse oxidativo.....	105
Figura 36: Citotoxicidade da riboflavina e da riboflavina irradiada em células HaCaT.....	108
Figura 37: Representação esquemática dos efeitos moleculares do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo em queratinócitos	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise densitométrica dos resultados de <i>western blot</i> das proteínas associadas ao citoesqueleto de células HaCaT expostas ao H₂O₂	102
Tabela 2: Principais proteínas quinases moduladas diferencialmente pelo choque hiperosmótico em lisado de células HaCaT	106
Tabela 3: Principais proteínas quinases moduladas diferencialmente pelo estresse oxidativo em lisado de células HaCaT	107
Tabela 4: Avaliação do potencial citoprotetor da riboflavina, previamente irradiada ou não, contra o choque hiperosmótico e o estresse oxidativo	109

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem

$\Delta\psi_m$: potencial transmembrânico mitocondrial

λ_{Em} : comprimento de onda de emissão

λ_{Exc} : comprimento de onda de excitação

$\lambda_{m\acute{a}x}$: comprimento de onda máximo

$\mu Ci/mL$: microcurie por mililitro

$\mu g/mL$: microgramas por mililitro

μL : microlitro

$\mu mol/L$: micromol por litro

$\mu mol/mL$: micromol por mililitro

$[Ca^{2+}]_i$: concentração de íons cálcio intracelular

$^{33}P\gamma$: fosfato gama do ATP marcado com ^{33}P

A: média

ACP1 (*acid phosphatase 1*): fosfatase ácida 1

AIF (“*apoptosis-inducing factor*”): fator de indução de apoptose

Akt: proteína quinase B

A/M: razão média por mediana

An: anexina

An⁺Pi⁻: células marcadas com anexina

An⁺Pi⁺: células com dupla marcação para anexina e iodeto de propídeo

An⁻Pi⁺: células marcadas com iodeto de propídeo

An⁻Pi⁻: células viáveis sem marcação para anexina e iodeto de propídeo

ANOVA: análise de variância

ANT: adenina nucleotídeo translocase

AO: acridina laranja

AP-1 (“*activating protein-1*”): proteína ativadora-1

AP-2 (“*activating protein-2*”): proteína ativadora-2

APAF-1 (“*apoptotic protease-activating factor-1*”): fator 1 de ativação de proteases pró-apoptóticas

APC: alofococianina

Ar: argônio

ATM: proteína quinase ATM

ATP: trifosfato de adenosina

Bad (“*Bcl-2 antagonist of cell death*”): proteína antagonista de Bcl-2 associada à morte celular

Bak (“*Bcl-2 antagonist killer 1*”): proteína 1 antagonista/exterminadora de Bcl-2

BALB/c 3T3: linhagem celular imortalizada de fibroblastos de embrião de camundongos BALB/c

Bax (“*Bcl-2-associated X protein*”): proteína X associada à Bcl-2

Bax/Bcl-2: razão Bax por Bcl-2

Bcl-2 (“*B-cell lymphoma protein-2*”): proteína 2 de linfoma de células B

Bcl-X_L (“*Bcl-2-like protein 1; Bcl-2-L-1*”): isoforma L da proteína 1 semelhante à Bcl-2

BD: *Becton, Dickinson and Company*

BH: domínio de homologia à Bcl-2

Bid (“*BH3-interacting domain death agonist*”): agonista do domínio de morte associado à BH3

BSA: albumina de soro bovino

Ca²⁺: íon cálcio

CaCl₂: cloreto de cálcio

CARD (“*caspase activator and recruitment domain*”): domínio de recrutamento e ativação de caspase

CAT: catalase

Cdc2 (“*cell division control protein 2 homolog*”): homóloga à proteína 2 reguladora da divisão celular ou quinase dependente de ciclina 1 (Cdk1)

Cdc25: proteína fosfatase reguladora da divisão celular 25

CDK: quinase dependente de ciclina

Chk2: quinase de ponto de checagem de danos ao DNA 2

c-IAP (“*cellular inhibitor of apoptosis*”): proteína inibidora de apoptose

CK2: caseína quinase 2

cm: centímetro

c-Myc: proteína oncogênica Myc

CO₂: dióxido de carbono

CrAr: criptônio/argônio

Csk: quinase Src carboxi-terminal

Ctr: controle

Cu²⁺: íon cobre

Cys: cisteína

DAPI: dihidroclorato de 4'-6'-diamidino-2-fenilindol

DCFH: diclorofluoresceína

DCFH-DA: diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

DCFoxi: diclorofluoresceína oxidada

DISC ("***death-inducing signaling complex***"): complexo de sinalização indutor de morte

DMEM ("***Dulbecco's modified Eagle's medium***"): meio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: ácido desoxirribonucléico

DR3 ("***death receptor 3***"): receptor de morte 3

DR6 ("***death receptor 6***"): receptor de morte 6

DSPs: proteínas tirosina fosfatases com dupla especificidade

DTT: ditioneitol

ECL: *enhanced luminol-based chemiluminescence*

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EGF: fator de crescimento epidérmico

EGFR: receptor de fator de crescimento epidérmico

EGTA: ácido etileno-glicoltetracético

eIF2 α : fator 2 alfa de iniciação da síntese proteica em eucariotos

EphA2: receptor ephrin do tipo A2

ERK1/2 ("***extracellular signal-regulated kinases 1/2***"): quinases reguladas por sinal extracelular 1/2

EROs: espécies reativas de oxigênio

F-actina: actina filamentosa

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FADD (“*Fas-associated death domain protein*”): proteína contendo domínio de morte associada ao receptor Fas

FAK: quinase de adesão focal

FAS: membro 6 da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral

FASL: proteína ligante do receptor Fas

FGFR3: receptor de fator de crescimento fibroblástico 3

Fig.: figura

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FMN: flavina mononucleotídeo

FoxO: fator de transcrição da família *Forkhead*

GA: geldanamicina

Gama-GT: gama-glutamil transpeptidase

GPX: glutaciona peroxidase

GR: glutaciona redutase

GSH: glutaciona reduzida

GSK: glicogênio sintase

GSSG: glutaciona oxidada

GST: glutaciona S-transferase

GTP: trifosfato de guanosina

h: hora

H⁺: íon hidrogênio

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HaCaT: linhagem imortalizada de queratinócitos humanos

HCl: ácido clorídrico

HeNe: hélio/neônio

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico

Hoechst: trihidrocloreto de 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol

Hsp (***“heat shock protein”***): proteína de choque térmico

Hsp27: proteína de choque térmico 27

Hsp90: proteína de choque térmico 90

IAP (***“inhibitory apoptosis protein type 1”***): proteína inibidora de apoptose

IC₅₀: concentração do composto teste que diminui em 50% a viabilidade celular

ICAM1: molécula de adesão intercelular 1

IgG: imunoglobulina G

IL-2: interleucina-2

IL-3: interleucina-3

IRS (***“insulin receptor substrate”***): substrato do receptor de insulina

J/cm²: joule por centímetro quadrado

JAK1 (***“Janus kinase 1”***): Janus quinase 1

JAK2 (***“Janus kinase 2”***): Janus quinase 2

JNK1/2 (***“c-Jun N-terminal kinases 1/2”***): quinases c-Jun N-terminal 1/2

KCl: cloreto de potássio

kDa: kiloDalton

LDH: lactato desidrogenase

LMW: baixa massa molecular

LMWPTP: proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular

M: mediana

MAPK p38: proteína quinase ativada por mitógeno p38

MAPKs (“mitogen-activated protein kinases”): proteínas quinases ativadas por mitógeno

MEC: matriz extracelular

MEK: quinase quinase ativada por sinal extracelular

mg/mL: miligrama por mililitro

MgCl₂: cloreto de magnésio

MgSO₄: sulfato de magnésio

min: minuto

mL: mililitro

mmol/L: milimol por litro

MMP: metaloproteinase

MMP-2: metaloproteinase-2

MMP-9: metaloproteinase-9

Mn²⁺: íon manganês

Mnk1: quinase de interação com MAPK 1

mol/L: mol por litro

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

mW/cm²: miliwatt por centímetro quadrado

Na²⁺: íon sódio

NAC: conteúdo de ácidos nucleicos

NaCl: cloreto de sódio

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaF: fluoreto de sódio

NaH₂PO₄: fosfato de sódio monobásico

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NFκB: fator nuclear kappa B

NIH-3T3: linhagem celular imortalizada de fibroblastos de camundongos NIH/3T3

nm: nanômetro

NRU: captação de vermelho neutro

O₂^{•-}: ânion superóxido

°C: grau centígrado

OH[•]: radical hidroxila

PAGE (***“polyacrylamide gel electrophoresis”***): eletroforese em gel de poliacrilamida

PAK 1 (***“p21-activated quinase 1”***): quinase ativada pela p21-1

p-Akt: proteína quinase B fosforilada

PARP (***“poly(ADP-ribose) polymerase”***): poli(ADP-ribose) polimerase

p-Bcl-2: proteína Bcl-2 fosforilada

PBS (***“phosphate-buffered saline”***): solução salina tamponada com fosfato

PBS-Ca²⁺: solução salina tamponada com fosfato contendo cálcio

PDGFR: receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas

p-ERK: proteína quinase ativada por sinal extracelular fosforilada

pH: potencial hidrogênico

PI: iodeto de propídeo

PI3K-p85 (***“phosphatidylinositol-3 kinase p85”***): fosfatidilinositol-3 quinase subunidade 85

p-JNK: quinase c-Jun N-terminal fosforilada

PKA (***“protein kinase A”***): proteína quinase dependente de AMP cíclico

PKA α : proteína quinase dependente de AMP cíclico alfa

PK161: quinase quinase Cdc2

PKC (***“protein kinase C”***): proteína quinase C

PKC δ (***“protein kinase C δ ”***): proteína quinase C delta

PML: potencial de membrana lisossomal

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

pNA: cromóforo *p*-nitroanilina

PO $_4^{3-}$: íon fosfato

PP2A: proteína serina/treonina fosfatase 2A

p-p38 MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno p38 fosforilada

p-STAT1 (***“signal transducer and activator of transcription 1”***): proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição 1 fosforilada

p-STAT3 (***“signal transducer and activator of transcription 3”***): proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição 3 fosforilada

p-STAT5 (***“signal transducer and activator of transcription 5”***): proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição 5 fosforilada

PTP: proteína tirosina fosfatase

PVDF: *polyvinylidene difluoride*

Rac1: GTPase da subfamília Rac da família das Rho GTPases

RE: retículo endoplasmático

Rho: GTPase A

RNA: ácido ribonucleico

RNase: ribonuclease

rpm: rotação por minuto

RTQ: receptor de tirosina quinase

s: segundo

SD/A: razão desvio padrão por média

SD: desvio padrão

SDS: dodecilsulfato de sódio

Ser: serina

SFB: soro fetal bovino

SHP2 (***“SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2”***): proteína tirosina fosfatase com domínio SH2-2

SOD: superóxido dismutase

Sorb: sorbitol

Src: proteína tirosina quinase proto-oncogênica Src ou pp60c-src

STATs (***“signal transducers and activators of transcription”***): proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição

TBS: tampão Tris salino

TBST: tampão Tris salino contendo Tween 20

TCA: ácido tricloroacético

Thr: treonina

TiSa: titânio/safira

TMRE: perclorato de etil-éster-tetrametilrodamina

TNF: fator de necrose tumoral

TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa

TRAF: fator associado ao receptor de fator de necrose tumoral

TRADD (*“tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein”*): proteína contendo domínio de morte associada ao receptor de fator de necrose tumoral tipo 1

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

TRX: tioredoxina

Tyr: tirosina

U/L: unidade por litro

UI/mL: unidade internacional por mililitro

UV: ultravioleta

UVA: ultravioleta de comprimento de onda entre 400 e 320 nm, também conhecido como onda longa

UVB: ultravioleta de comprimento de onda entre 320 e 280 nm, também conhecido como onda média

UVC: ultravioleta de comprimento de onda entre 280 e 200 nm, também conhecido como onda curta

VDAC: canal aniônico dependente de voltagem

W: watt

WGA: aglutinina de gérmen de trigo

XIAP ("*X-linked inhibitor of apoptosis protein*"): proteína inibidora de apoptose ligada ao cromossomo X

Zn²⁺: íon zinco

RESUMO

A epiderme é constantemente confrontada por inúmeros agentes estressores. Variações na umidade ou exposição à radiação ultravioleta afetam o balanço osmótico e o estado redox celular alterando, assim, as características fisiológicas da pele. Em resposta aos diferentes estímulos os queratinócitos ativam vias distintas de sinalização. Portanto, o balanço entre as vias de sobrevivência e morte determina o destino celular. A fim de se determinar possíveis alvos moleculares associados a morte e sobrevivência de queratinócitos, vias de sinalização celular disparadas pela exposição ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo foram investigadas em células HaCaT tratadas com sorbitol e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que, em ambos os modelos, a redução da viabilidade celular dependeu da dose e do tempo de exposição ao agente extressor, apresentando valores de IC_{50} de aproximadamente 1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H_2O_2 após 2 e 4 h de exposição respectivamente. Os danos causados foram irreversíveis e estão associados à ativação da via intrínseca de morte celular apoptótica, acompanhada de perda da integridade da membrana lisossomal, extravasamento de catepsina B para o citosol e alterações morfológicas atípicas no citoesqueleto, principalmente no arranjo dos filamentos de actina. A investigação do *status* de funcionamento de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e do estado redox celular indicou que esses eventos foram mediados por espécies reativas de oxigênio e pela ação da quinase c-Jun N-terminal (JNK). Adicionalmente, a exposição dos queratinócitos aos diferentes estímulos estressores foi acompanhada de ativação da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular (LMWPTP), cuja relevância nos estudos de biologia celular aumentou nos últimos anos. A LMWPTP atua em importantes vias de sinalização que estão associadas à sobrevivência e morte celular. Cientificamente, este estudo é pioneiro ao demonstrar alterações no citoesqueleto e ação de proteínas quinases e fosfatases nos mecanismos que determinam o destino de queratinócitos expostos ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo. De fato, o melhor conhecimento da relação entre as vias de sobrevivência e morte celular em queratinócitos é fundamental para promover o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas aplicadas às doenças dermatológicas. Desta maneira, o presente trabalho apresenta resultados inéditos, contribuindo no conhecimento da biologia dos queratinócitos e com sua aplicação no desenvolvimento da terapia dermatológica.

ABSTRACT

The epidermis is constantly confronted with multiple environmental stressors. Changes in humidity or exposition to UV radiation affect the redox state and osmotic balance, modifying the physiological characteristics of the skin. In response to different stresses, epidermal keratinocytes can activate distinct signaling pathways and the balance between death and life signals will determine the cell fate, leading to programmed cell death or cell survival. In order to determine the possible molecular targets associated to death and survival of keratinocytes, the signaling pathways activated by the exposition of HaCaT cells to sorbitol (hyperosmotic shock) and H₂O₂ (oxidative stress) were investigated. The results showed that in both models the reduction in cellular viability was time and dose-dependent, displaying IC₅₀ values of 1 mol/L for sorbitol and 2 mmol/L for H₂O₂ after 2 and 4 h of exposition to the stressors, respectively. The damages caused by the stressors were irreversible and associated to the induction of the intrinsic apoptotic pathway, accompanied by the loss of lysosomal membrane integrity, release of cathepsin B to cytosol and atypical morphological alterations in cytoskeleton, particularly in the arrangement of actin filaments. Analysis of the functional status of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and the cellular redox state showed that such events were mediated by reactive oxygen species and occurred through c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation. Additionally, exposure of keratinocytes to the different stress inducers was followed by low molecular weight tyrosine protein phosphatase (LMWPTP) activation, which is responsible for the regulation of important signaling pathways associated to cell survival and death. It is important to highlight the novelty of these results showing alterations in the cytoskeleton and the action of protein kinases and phosphatases during exposure of keratinocytes to hyperosmotic and oxidative stresses. In fact, the development of more efficacious therapies against skin diseases depends on the establishment of the relationships between the survival and death signaling pathways in keratinocytes. In this direction, this work contributes to a better understanding of the keratinocyte biology and the improvement of traditional dermatological therapies.

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo, atingindo cerca de 16% do peso corporal dos animais (Bauer e Aiken, 1989; Gonzales, 2010). Ela possui diversas funções como proteção do organismo contra a perda de água e atrito, armazenamento de gordura, carboidratos e proteínas. Além disso, também participa ativamente nos processos de termorregulação corporal, formação de vitamina D3, resposta imunológica e, atua como receptor sensorial (Gurtler et al., 1994; Gonzales, 2010).

Devido ao fato da pele constituir a principal interface entre o ambiente e o organismo, ela é considerada uma barreira efetiva contra diversos tipos de estresse entre eles destacam-se a radiação ultravioleta (UV), a desidratação, o estresse mecânico e alterações na temperatura, além de fatores endógenos liberados pelas células, como por exemplo, em resposta à inflamação. Assim, a pele detém propriedades bioquímicas e mecânicas únicas que a tornam uma linha de defesa eficiente contra tais condições estressantes (Fig.1). A epiderme é um epitélio estratificado capaz de auto-renovação. A perda de células diferenciadas da superfície é balanceada por células que deixam a camada basal proliferativa e entram em diferenciação, migrando em direção à camada córnea (Watt, 1989; Fuchs e Byrne, 1994; Gonzales, 2010). Além disso, a camada basal é formada por células-tronco e queratinócitos. O queratinócito é o principal tipo celular da pele e, portanto, o principal alvo das alterações mediadas pelos diferentes tipos de estresse (Denning, 2004; Raj et al., 2006). O nome queratinócito deriva da presença de queratina que compreendem > 50% da massa proteica celular.

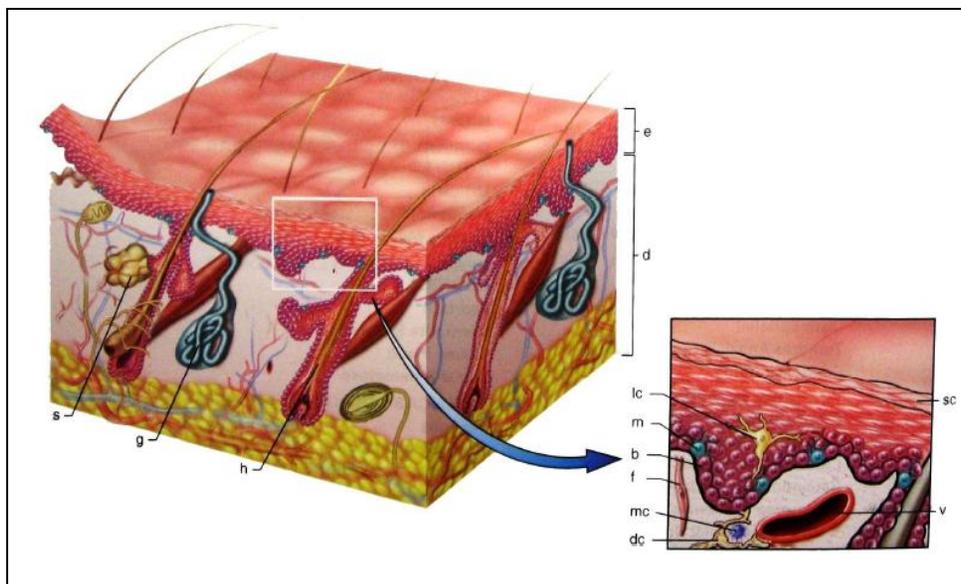


Figura 1: Esquema de uma seção transversal da pele. No esquema estão representadas a epiderme (e) e a derme (d), além de folículos pilosos (h), glândulas sudoríparas (g) e glândulas sebáceas (s) constituintes da pele. Na projeção estão representadas a epiderme (e) e parte da derme subjacente. A epiderme é constituída principalmente de queratinócitos dispostos em camadas, com destaque para o estrato córneo (sc), formado por células escamosas superficiais cornificadas (queratinócitos em estágio final de diferenciação), e para as células basais (b), além de outros constituintes como os melanócitos (m) e as células de Langerhans (lc). Pequenos vasos (v), fibroblastos (f), mastócitos (mc) e células dendríticas (dc) são constituintes representativos da derme. Fonte: Robbins e Cotran (2005).

Este tipo celular enquanto migra da camada basal para formar o epitélio, adquire gradualmente quantidades crescentes de queratina formando uma rede altamente dinâmica. Além disso, essa rede torna-se fisicamente resistente devido à presença do complexo juncional formado principalmente pelos desmossomos, zônulas de aderência, zônulas de oclusão, junções comunicantes e os hemidesmossomos. As junções podem ou não empregar proteínas integrais de membrana, associadas ou não a elementos do citoesqueleto, o que confere força e rigidez ao epitélio. Apesar da diferenciação terminal dos queratinócitos causar morte celular e esfoliação, os filamentos de actina permanecem intactos formando o centro estrutural da camada morta da pele queratinizada, protegendo contra a

abrasão (Denning, 2004). Desta forma, a integridade desta camada atua como uma barreira impermeável para impedir a dessecação, possuindo a importante função de barreira entre o organismo e o ambiente. Esta função impede que ocorra a invasão de patógenos, agressões químicas e físicas, assim como a perda de água e solutos (Freinkel e Woodley, 2001; Gonzales, 2010; Prosch et al., 2010).

Os requerimentos para a proliferação, migração e diferenciação terminal de queratinócitos envolvem um programa de alterações sequenciais na expressão gênica e na estrutura celular. Além disso, os queratinócitos devem responder às alterações ambientais, invasões por patógenos e lesões de forma a restaurar e/ou manter rapidamente esta barreira. O delicado equilíbrio entre robustez e morte celular deve-se a uma regulação única e sutil, envolvendo inúmeras vias de sinalização e diversos sinais extracelulares que devem ser interpretados corretamente pelos queratinócitos a fim de realizarem a função apropriada na epiderme (Denning, 2004). Embora a epiderme apresente como característica a capacidade da epiderme de produzir queratinócitos permita que a pele mantenha suas funções durante toda a vida do indivíduo, ela também predispõe o queratinócito a ser o tipo celular de maior incidência de câncer em humanos (carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas), além de contribuir para o aparecimento de outras doenças dermatológicas (Ahn et al., 2003; Lee et al., 2005; Haass et al., 2006). Hiperplasia epidérmica ou hiperqueratose também é observada em doenças como psoríase, queratose actínica, queratose seborreica, verrugas e líquen simples crônico (Raj et al., 2006).

1.1. Estresse oxidativo e estresse hiperosmótico em queratinócitos

Os queratinócitos representam os principais componentes da epiderme e respondem a diferentes tipos de estresse, modulando vias de sinalização que podem levar a apoptose, sobrevivência, senescência ou diferenciação celular. Desta maneira, o destino dos queratinócitos expostos aos diversos estímulos estressores irá depender, entre outros fatores, da intensidade e duração do estímulo estressor, bem como do próprio contexto celular.

1.1.1. Estresse oxidativo

Entre os tipos de estresse aos quais os queratinócitos são submetidos, o mais estudado e, talvez, o de maior relevância fisiológica, é o estresse causado pela radiação ultravioleta (UV) (Matsumura et al., 2004; Assefa et al., 2005; Krutmann, 2006). A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\bullet) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), possui papel central em iniciar e dirigir muitos dos eventos de sinalização que medeiam a resposta celular à irradiação UVA (ultravioleta de comprimento de onda entre 400 e 320 nm, também conhecido como onda longa) e UVB (ultravioleta de comprimento de onda entre 320 e 280 nm, também conhecido como onda média) (Wang et al, 1998; 2000; Maziere et al., 2001; Schieke et al., 2004; Assefa et al., 2005; Krutmann, 2006; Merk et al., 2006).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser formadas durante períodos de estresse celular ou podem ser geradas metabolicamente sob

condições normais como consequência do metabolismo aeróbio celular, ativação de receptores de fatores de crescimento ou como parte da resposta imune inflamatória. Adicionalmente, EROs são formadas fotoquimicamente e servem como mediadores de respostas celulares durante a irradiação UVA empregada para fins cosméticos e terapêuticos como, por exemplo, a terapia fotodinâmica (Krutmann, 2006). A alta reatividade química das EROs e sua capacidade de reagir com diferentes moléculas de maneira destrutiva têm sido explorada em diferentes terapias visando a eliminação de queratinócitos que tenham acumulado mutações ou outros danos genéticos (Takahashi et al., 2004). Contudo, a mesma reatividade e alta capacidade de eliminação celular que fazem das EROs potenciais agentes fototerapêuticos indutores de morte celular, também estão frequentemente associadas aos diversos efeitos colaterais, agudos ou crônicos na pele humana, os quais não podem ser separados dos efeitos benéficos da irradiação UV (Matsumura et al., 2004; Krutmann, 2006; Merk et al., 2006).

Em doses fisiologicamente relevantes, a geração de EROs pela radiação UV ativa inúmeras vias de sinalização, causa peroxidação lipídica e induz dano oxidativo ao DNA e proteínas celulares. Queratinócitos que são severamente danificados e impossibilitados de reparar o DNA induzem apoptose como um mecanismo de escape, causando sua própria eliminação em benefício do organismo. Neste processo, a proteína supressora de tumor p53 possui um importante papel, induzindo a parada do ciclo celular na fase G1 em resposta à irradiação UV (Campbell et al., 1993). Células que não possuem a proteína p53 funcional são incapazes de reparo e acumulam mutações. Além disso, a proteína p53 foi associada à resposta de queratinócitos ao estresse, incluindo o câncer de

pele. Vários estudos demonstraram que a apoptose de queratinócitos induzida pela radiação UV, estresse oxidativo, ou agentes citotóxicos, é precedida pela despolarização da membrana mitocondrial, liberação do citocromo *c* e ativação de caspase 9 (via intrínseca de ativação da apoptose) (Assefa et al., 2000; Takahashi et al., 2001). Além disso, tanto a multimerização dos receptores de morte membro 6 da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (Fas), que levam à ativação de caspase 8 (via extrínseca de ativação da apoptose), como a clivagem e ativação da proteína pró-apoptótica Bid pela caspase 8 são importantes eventos para a amplificação da resposta apoptótica (Assefa et al., 2000; Takahashi et al., 2001).

Na maioria dos sistemas envolvendo queratinócitos, a apoptose induzida pela radiação UV provavelmente é dependente das caspases, embora não exclua a indução de morte apoptótica independente da atuação dessas proteases, a qual seria mediada pela translocação do fator de indução de apoptose (AIF) para o núcleo (Liu et al., 2006). De maneira geral, embora as caspases 8 e 9 pareçam ser ativadas concomitantemente pela luz UV, a ativação da caspase 9 *upstream* é crítica para estas respostas (Sitailo et al., 2002).

1.1.2. Estresse hiperosmótico

Devido ao fato da pele constituir a principal interface entre o organismo e o ambiente, o estresse hiperosmótico também é considerado um importante fator estressor de queratinócitos, capaz de alterar a estrutura e função epidérmica. Neste contexto, quando a camada córnea é sensibilizada devido à ação de

diversas patologias, como dermatoses, eczemas e psoríase, ela não exerce sua função protetora adequadamente, deixando as camadas epidérmicas subjacentes mais suscetíveis aos efeitos do estresse (Denda et al., 1998; Garmyn et al., 2001). Além disso, a exposição da pele a eventos como variações de temperatura e umidade ambiental ou a substâncias metabolicamente inertes, tais como o sorbitol, também provocam alterações na homeostase da epiderme, estando associadas ao estresse hiperosmótico (Dascalu et al., 2000; Rodríguez et al., 2002). O sorbitol ou D-glucitol é um poliálcool encontrado naturalmente em diversas frutas, sendo obtido a partir da hidrogenação da glicose. Substâncias não iônicas e osmoticamente ativas, como o sorbitol e o manitol, são geralmente utilizadas como agentes estabilizantes ou preservativos. O sorbitol é o poliol mais conhecido e sua aplicação na indústria alimentícia como adoçante é amplamente difundida. Além disso, ele apresenta diversas aplicações na indústria farmacêutica e é utilizado em formulações cosméticas. Isso se deve as suas propriedades químicas que garantem baixa reatividade e sua ação umectante. Na indústria farmacêutica e cosmética, ele é usado para aumentar a estabilidade de princípios ativos, principalmente em formulações para aplicação tópica ou transdérmica, prevenindo a floculação e a coagulação. Seu emprego na indústria de cosméticos também se deve a sua ação umectante e emoliente (Jonas e Silveira, 2004). Apesar de sua ampla utilização, os mecanismos associados à resposta dos queratinócitos ao sorbitol ainda são pouco conhecidos. Portanto, o estudo dos efeitos do estresse hiperosmótico causado pelo sorbitol sobre o principal constituinte da epiderme é altamente oportuno e desejável.

Embora o estresse hiperosmótico possa provocar a morte de células da epiderme, em queratinócitos, este estímulo estressor pode ativar diferentes vias de sinalização, levando à morte ou à diferenciação celular (Maldonado et al., 2005; Eisner et al., 2006; Reinehr e Häussinger 2006; Criollo et al., 2007; Mammone et al., 2008). Estudos demonstraram que a apoptose induzida pelo choque hiperosmótico pode ser ativada por mecanismos moleculares distintos, sendo, muitas vezes, facultativa a ocorrência de eventos como ativação de caspases, liberação do citocromo *c* e aumento da produção de EROs (Criollo et al., 2007; Kroemer et al., 2007). A translocação do AIF e alterações no potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) relacionam-se à ativação da apoptose sem participação de caspases (Criollo et al., 2007). Adicionalmente, dados da literatura demonstraram que em queratinócitos humanos, o estímulo hiperosmótico causa aumento transitório da concentração de cálcio intracelular, aumento da expressão de proteínas do choque térmico (Hsp), ativação de caspases e ativação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) e da proteína quinase ativada por estresse c-Jun N-terminal (JNK/SAPK) (Garmyn et al., 2001; Diker-Cohen et al., 2006). Interessante observar que a exposição de queratinócitos ao estímulo hiperosmótico também induz aumento na expressão de importantes marcadores de diferenciação deste tipo celular, como, por exemplo, as proteínas queratina 1 e 10 e a proteína involucrina (Mammone et al., 2008).

1.2. Sobrevivência e morte celular de queratinócitos

Os diferentes tipos de morte celular conhecidos são classificados de acordo com aspectos morfológicos (morte apoptótica, necrótica ou autofágica), enzimáticos (com ou sem o envolvimento de nucleases, caspases, catepsinas e outras proteases) e funcionais (morte celular programada e acidental fisiológica ou patológica) (Kroemer et al., 2009). A apoptose é definida como um mecanismo de morte celular geneticamente programado e conservado evolutivamente, que capacita as células a desencadear um processo de morte altamente regulado em resposta a estímulos inerentes ao desenvolvimento normal ou em situações de estresse celular. Desta maneira, a apoptose é considerada a principal forma de “suicídio celular”, exercendo papel central em vários processos fisiológicos, essenciais para a manutenção da homeostase em organismos multicelulares (Hetz e Glimcher, 2008; Krysko et al., 2008).

Os mecanismos moleculares responsáveis pela execução e regulação da apoptose foram amplamente caracterizados levando a um crescente conhecimento dos aspectos bioquímicos responsáveis pelas características morfológicas, enzimáticas e funcionais específicas deste tipo de morte celular (Degterev et al., 2003; Orrenius et al., 2003; Krysko et al., 2008; Kroemer et al., 2009). De maneira simplificada, a apoptose é um mecanismo de morte celular desencadeado por estímulos intra ou extracelulares, que leva à ativação de caspases (*cysteine aspartate-specific proteases*), um grupo de cisteíno peptidase capaz de clivar substratos exclusivamente após um resíduo de ácido aspártico (Asp), sendo esta especificidade pouco comum entre o grupo das proteases (Turk e

Stoka, 2007). Estas enzimas proteolíticas são responsáveis pelas características típicas de morte celular apresentada pelas células apoptóticas. A ativação das caspases pode ocorrer por duas vias sinalizadoras. A via extrínseca (Fig. 2B). é desencadeada pela ativação de receptores de morte da família do fator de necrose tumoral (TNFR), enquanto que, na via intrínseca (Fig. 2A) a mitocôndria é mediadora chave do processo de apoptose (Guimarães e Linden, 2004; Criollo et al., 2007; Kroemer et al., 2009). Uma vez ativadas, as caspases colapsam a infra-estrutura celular, desintegrando o citoesqueleto, desarranjando metabolicamente a célula e causando a fragmentação genômica (Schmitt et al., 1999; Köhler et al., 2002; Ghobrial et al., 2005).

Embora atualmente seja consenso a participação das caspases no mecanismo molecular de iniciação e execução da apoptose, é importante ressaltar a existência de uma variedade de funções dessas enzimas não relacionadas à apoptose. As caspases também participam de processos diversos como a regulação da resposta imunológica e o controle da progressão do ciclo celular. Além disso, recentemente, diversos trabalhos relacionam a participação de caspases, em particular a caspase 14, no processo de diferenciação celular de queratinócitos e de células pré-osteoblásticas (Denecker e Declercq, 2008; Mammome et al., 2008; Chaves Neto et al., 2010). Assim, a ativação de caspases em uma célula não é sinônimo de indução de apoptose, sendo que o número de caspases ativas, a exata localização celular onde são ativadas, a abundância de inibidores específicos e o tipo de caspase ativada constituem determinantes centrais do destino celular (Los et al., 2003).

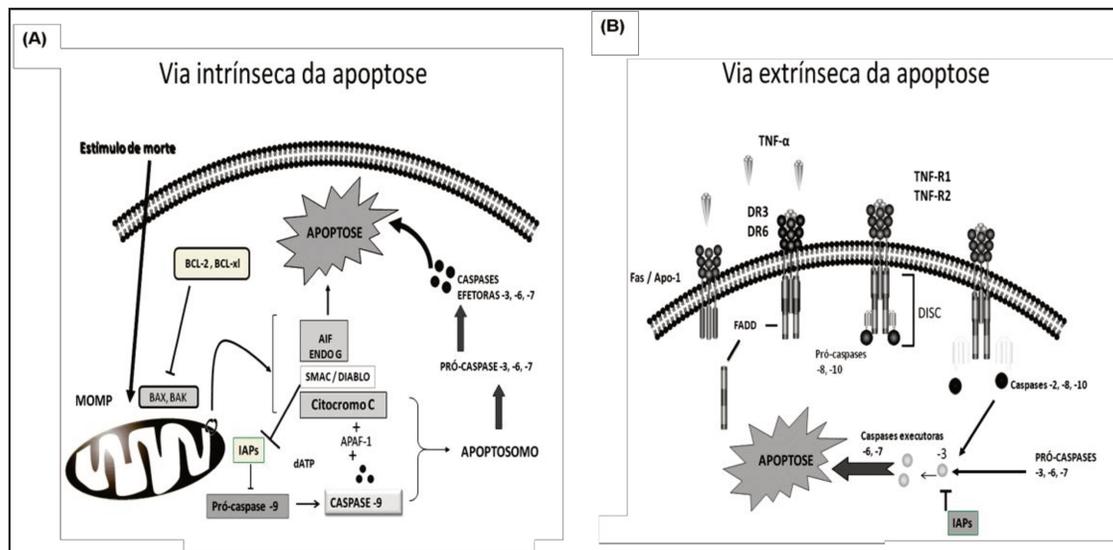


Figura 2: Indução de apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca. (A) A via intrínseca de apoptose envolve a ativação da pró-caspase 9 pela liberação de proteínas apoptogênicas para o citoplasma celular, incluindo AIF e citocromo c. Com interação do fator de ativação de proteases pró-apoptóticas-1 (Apaf-1) e formação do apoptossomo, ocorre a consequente ativação da caspase 9. Uma vez ativada, a caspase 9 ativa uma série de outras pró-caspases como, por exemplo, as caspases 3, 6 e 7, clivando estas pró-caspases em proteínas menores, resultando na amplificação do sinal e em alterações bioquímicas e morfológicas características da morte apoptótica (via mitocondrial). (B) A via extrínseca da apoptose é mediada pelos receptores de morte, os quais transmitem um sinal de morte para o interior da célula. Receptores de morte incluem o TNFR, Fas (CD95), DR3 e DR6. A trimerização leva à ativação dos receptores de morte. Subsequentemente, o sinal é transduzido para o interior do citoplasma sendo reconhecido pelo domínio de morte do receptor. Proteínas adaptadoras do tipo proteína contendo domínio de morte associada ao receptor Fas (FADD) e TRADD possuem domínios de morte que ativam os complexos indutores de morte, denominados DISC. Em adição aos domínios de morte, os adaptadores FADD contêm domínios efetores de morte, os quais interagem formando um complexo e sequestrando as pró-caspases 8 ou 10 para o complexo DISC. Uma vez ativadas, estas caspases ativam as pró-caspases executoras 3, 6 ou 7 resultando nas alterações bioquímicas e morfológicas características da morte apoptótica. Adaptado de Anazetti e Melo (2007).

Em nenhum outro sistema a apoptose possui tantas funções vitais como na pele, onde é crítica tanto para a proliferação controlada de queratinócitos como para a formação do estrato córneo, que é o resultado final da diferenciação epidérmica. A apoptose também representa um importante mecanismo de defesa contra o câncer, pois queratinócitos que tenham acumulado mutações ou outros danos genéticos como consequência da radiação UV ou estresse oxidativo são eliminados por apoptose (Maruoka et al., 1997; Gandarillas, 2000).

Além disso, em resposta ao estresse, os queratinócitos ativam vias de sinalização que podem levar à morte celular programada ou à sobrevivência. O balanço entre os sinais de morte e sobrevivência determinarão o destino celular (Eckert et al., 2002). Neste sentido, a reorganização na membrana e internalização de receptores da superfície celular como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a fosforilação e desfosforilação de MAPKs e alterações na expressão gênica constituem etapas essenciais da resposta celular aos eventos fisiológicos e patológicos disparados por efetores extracelulares tais como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores e xenobióticos (Raj et al., 2006).

As vias de sinalização que levam à morte celular são mediadas, principalmente, pela fosforilação das quinases JNK e MAPK p38 (Kyriakis e Avruch, 2001; Eckert et al., 2002; Wada e Penninger, 2004).

Inúmeros trabalhos demonstram ativação de JNK e MAPK p38 em queratinócitos por vários fatores de estresse incluindo radiação UV, estresse oxidativo, choque térmico, citocinas pró-inflamatórias e choque osmótico (Shimizu et al., 1999; Brenneisen et al., 2002; Cheng et al., 2002; Ravid et al., 2002; Bode e Dong, 2003; Schieke et al., 2005; Diker-Cohen et al., 2006; Krutmann, 2006). Estas quinases medeiam, entre outros processos, a interrupção do ciclo celular, reparo e apoptose, atuando sobre diferentes substratos como proteínas do citoesqueleto, outras quinases, fosfatases, fosfolipases e fatores de transcrição (Bode e Dong, 2003). Estudos demonstraram a fosforilação e estabilização da MAPK p38 como eventos iniciais da sinalização induzida pela radiação UV em queratinócitos, precedendo a ativação de caspases (Shimizu et al., 1999). De fato,

a inibição da MAPK p38 impede a translocação de Bax para a mitocôndria e a liberação do citocromo *c*. Além disso, a radiação UVB pode ativar vias apoptóticas pela indução da ceramida sintase e síntese de ceramida (Uchida et al., 2010). Ceramidas também foram caracterizadas como mediadoras da sinalização induzida por UVA/oxigênio singlete, levando à ativação do fator de transcrição AP-2 e à consequente expressão de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) em queratinócitos normais (Grether-Beck et al., 1996).

Em contraste, as vias de sobrevivência intracelulares são constitutivamente ativas, mantendo a viabilidade celular. Porém, elas podem ser ativadas para contra-atacar mecanismos de morte induzidos por estresse (Eckert et al., 2002). A proteína quinase ativada por sinal extracelular (ERK1/2), a fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e a quinase Src (proteína tirosina quinase proto-oncogênica Src ou pp60c-src) são importantes mediadoras de vias promotoras da sobrevivência de queratinócitos (Calautti et al., 1998; Datta et al., 1999; Jost et al., 2001; Eckert et al., 2002; Bowen et al., 2003). Fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento de queratinócitos, agem de maneira autócrina ou parácrina para estimular seus receptores cognatos, levando à ativação de inúmeras vias de sinalização de sobrevivência (Datta et al., 1999; Jost et al., 2001; Bowen et al., 2003; Wang et al., 2003). A sinalização mediada por EGFR estimula a cascata de MAPKs que resulta na fosforilação sequencial e ativação das MAPK quinases (MEKs) e ERKs. Além disso, a sinalização desencadeada por EGF estimula uma segunda via de sobrevivência envolvendo a ativação induzida pela PI3K da proteína serina-treonina quinase Akt (PKB; proteína quinase B) (Wang et al., 2003). O eixo PI3K/Akt tem papel chave

na transdução de sinais de sobrevivência e eventos de adesão mediados pelas caderinas. A fosforilação da Akt inibe a atividade da proteína pró-apoptótica de domínio único BH3, Bad, e dos fatores de transcrição da família Forkhead (FoxO) (Calautti et al., 2005; Raj et al., 2006). A Akt também promove a sobrevivência de queratinócitos por efeitos indiretos sobre a p53 e o fator nuclear κ B (NF κ B). A ativação do fator de transcrição NF κ B pela sinalização via Akt pode promover a sobrevivência de queratinócitos pela modulação da expressão de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), as quais atuam na inibição de caspases, ou de proteínas adaptadoras do receptor de morte envolvido na cascata de sinalização do TNF (TRAF) (Nickoloff et al., 2002; Assefa et al., 2005). Evidências acerca do papel crítico da E-caderina em orquestrar os sinais celulares, favorecendo a sobrevivência e a diferenciação de queratinócitos epidérmicos, indicaram que a via de sinalização PI3K regula a escolha entre diferenciação e morte por um mecanismo que requer a cooperação entre a atividade de tirosina quinases, como Src e EGFR, e as funções adesivas da E-caderina (Calautti et al., 2005).

Finalmente, é importante salientar que o estímulo apoptótico pode ativar, simultaneamente, múltiplas vias de sinalização em queratinócitos. Por exemplo, vários estudos demonstram que o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a radiação UVB podem ativar a via de morte induzida pela MAPK p38 e as vias de sobrevivência MEK/ERK e Akt/NF κ B (Nickoloff et al., 2002). Produtos das vias das MAPKs interagem em um complexo MAPK p38/ERK que transloca para o núcleo em resposta à ativação da proteína quinase C delta (PKC δ) (Efimova et al., 2004). Desta forma, os queratinócitos coordenam um delicado balanço entre forças

pró-apoptóticas e anti-apoptóticas em resposta ao estímulo extracelular, deslocando o equilíbrio no sentido de sobrevivência ou morte celular quando uma das vias predomina (Calautti et al., 2005). Tendo em vista o papel da apoptose no mecanismo de eliminação de células geneticamente ou funcionalmente danificadas, é razoável supor que falhas no mecanismo apoptótico de eliminação celular contribuam significativamente para o aparecimento de células tumorais (Allombert-Blaise et al., 2003; Calautti et al., 2005). De fato, a apoptose representa um importante mecanismo de defesa contra o câncer, incluindo os casos de neoplasias dérmicas, onde queratinócitos que acumulam mutações ou outros danos genéticos como consequência da exposição à radiação UV ou estresse oxidativo são eliminados por este processo. Embora possa parecer, à primeira vista, que o mecanismo molecular associado à apoptose de queratinócitos seja deflagrado em ocasiões que requerem a morte celular, estudos indicam que a relação entre a maquinaria apoptótica e o destino dos queratinócitos não é simples (Eckert et al., 2002). De fato, neste tipo celular, a ativação da maquinaria apoptótica nem sempre é sinônimo de morte celular, o que sugere a existência de uma complexa e altamente integrada rede molecular responsável pelo destino dos queratinócitos (Eckert et al., 2002). Nessa rede, a maquinaria molecular apoptótica compartilha inúmeros mecanismos efetores e diversas moléculas (proteínas) sinalizadoras com outros processos celulares como, por exemplo, a diferenciação (Allombert-Blaise et al., 2003; Calautti et al., 2005).

Embora a apoptose e a diferenciação de queratinócitos compartilhem alguns mecanismos efetores de sinalização, eles são processos distintos, executados em tempos diferentes e com resultados biológicos diversos: o primeiro

levando à eliminação de células mortas individuais dos tecidos em horas, enquanto que o segundo reside na sobrevivência e maturação sincronizada de todas as camadas de células em semanas (Maruoka et al., 1997; Gandarillas, 2000). Como dois mecanismos com finalidades tão diferentes podem compartilhar vias de sinalização ainda não foi totalmente esclarecido e, certamente, o crescente conhecimento sobre esses processos terá importantes implicações na elucidação da biologia deste tipo celular e, conseqüentemente, na terapêutica dermatológica.

1.3. Lisossomos e apoptose

Recentemente, grande importância é atribuída à participação dos lisossomos nos processos de morte celular. A princípio, os lisossomos eram organelas apenas relacionadas com os mecanismos de morte celular autofágica e necrótica, tendo importância somente na eliminação dos corpos apoptóticos (Ferri e Kroemer, 2001; Leist e Jäättelä, 2001). Atualmente, devido ao crescente conhecimento sobre os mecanismos moleculares de morte celular, sua participação na indução de apoptose é fato cientificamente confirmado (Guicciard et al., 2004; Kirkegaard e Jäättelä, 2009). A descrição da ruptura e/ou permeabilização parcial da membrana lisossomal ocorre em vários modelos de iniciação e execução da apoptose (Guicciard et al., 2000; Foghsgaad et al., 2001; Queiroz et al., 2009). O principal fator para seleção entre apoptose induzida pela via lisossomal e necrose mediada pelas enzimas lisossomais relacionam-se com a permeabilização lisossomal e, conseqüentemente, com a quantidade de enzimas proteolíticas lançadas para o citosol (Kirkegaard e Jäättelä, 2009). A completa

ruptura desta organela e a liberação de uma alta concentração de enzimas lisossomais para o citosol resultam em necrose, enquanto que a permeabilização parcial da membrana lisossomal pode causar apoptose (Bursch, 2001; Turk et al., 2002).

Varios estímulos de morte desencadeiam a permeabilização parcial da membrana lisossomal (Guicciardi et al., 2004; Fehrenbacher e Jäättela, 2005). Entretanto, os mecanismos envolvidos na ativação da apoptose via lisossomal ainda não foram totalmente elucidados (Guicciardi et al., 2000; Kirkegaard e Jäättela, 2009).

A catepsina B é uma das enzimas quantitativamente mais abundantes dos lisossomos. Ela está envolvida em diferentes processos celulares, como processamento e liberação de proteínas, resposta celular a antígenos exógenos e mecanismos de morte celular (Foghsgaad et al., 2001; Turk et al., 2002; Werneburg et al., 2002; Guicciardi et al., 2004). A catepsina B apresenta papéis importantes na iniciação e execução apoptóticas. Além disso, ela medeia a invasão tumoral nos processos neoplásicos (Guicciardi et al., 2004). Werneburg e colaboradores (2002) descreveram o papel das catepsinas na apoptose. Estes autores demonstraram que a catepsina B aumenta a permeabilização da membrana lisossomal em hepatócitos, sugerindo que as enzimas lisossomais além de serem lançadas para o citosol, também participam da desestabilização da membrana lisossomal (Werneburg et al., 2002). A permeabilização da membrana lisossomal com consequente liberação das catepsinas para o citosol não está limitada à ativação da via intrínseca apoptótica pela liberação do citocromo c, clivagem e ativação das caspases 9 e 3 (Kroemer e Jäättela, 2005), podendo

também induzir apoptose de maneira independente de caspases (Queiroz et al., 2009).

1.4. Estado redox celular e apoptose

Os efeitos das alterações redox em eventos celulares e moleculares foram muito estudados nos últimos anos. O estado redox das células é uma consequência do balanço entre os níveis de EROs formadas pelas células e de agentes redutores equivalentes disponíveis (Mccall e Frei, 1999). A elevação nos níveis de EROs acima da capacidade celular de tamponamento resulta em desequilíbrio e estresse oxidativo potencialmente citotóxico (Alidosst et al., 2006). Nesse contexto pró-oxidante, os radicais altamente reativos gerados podem danificar o DNA, RNA, o enovelamento de proteínas e componentes lipídicos (Mccall e Frei, 1999). Além disso, podem ativar fatores transcricionais que regulam a expressão de genes associados à patogénia de algumas doenças, como câncer, aterosclerose e diabetes entre outras (Mccall e Frei, 1999). Apesar de várias macromoléculas estarem sujeitas ao ataque de EROs, os efeitos deletérios a nucleotídeos livres ou ao DNA pode ocasionar danos celulares permanentes (Allen e Tresini, 2000).

A primeira consequência do estresse oxidativo nas células é a alteração das propriedades físico-químicas das membranas celulares, causando perda de suas funções especializadas (Droge, 2002). O início da peroxidação lipídica ocorre pelo ataque de qualquer espécie capaz de abstrair um hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas com formação de um radical peroxil. Esta

reação se propaga tendo como resultado a peroxidação lipídica das membranas celulares. Os efeitos das EROs são mais severos na membrana mitocondrial interna devido à predominância da cardiolipina em sua constituição (Massoti et al., 1974). A cardiolipina apresenta importante função no controle da permeabilidade da membrana mitocondrial, bem como no estabelecimento do gradiente eletroquímico de prótons (Massoti et al., 1974). Desta maneira, a oxidação da cardiolipina pelas EROs ativa o mecanismo apoptótico devido a liberação do citocromo *c*, pois este se encontra ligado aos fosfolipídios da membrana externa da mitocôndria (Petrosillo et al., 2003). Além disso, hemoproteínas e complexos de ferro não heme e complexos de cobre ou manganês são constituintes de membranas celulares capazes de formar radicais livres, provocando a oxidação de ácidos graxos, mudanças na fluidez e na permeabilidade da membrana, resultando em alterações funcionais (Tyurina et al., 2010). Como a mitocôndria é uma organela cuja função depende inteiramente da integridade do sistema de membranas, alterações em seus constituintes comprometem a função mitocondrial. O acúmulo de produtos de peroxidação lipídica contribuem para a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol e consequente ativação do mecanismo apoptótico (Tyurina et al., 2010). As membranas mitocondriais também possuem enzimas contendo ferro e cobre como cofatores, que catalisam a reação do ânion superóxido com H_2O_2 , formando radical hidroxila. Esta reação é denominada reação de Fenton (Zhang et al., 1990).

No entanto, quando a concentração de EROs é maior que a capacidade antioxidante mitocondrial, proteínas mitocondriais com grupamento sulfidril em sua estrutura são mais sensíveis a ação de EROs. As modificações na estrutura

dessas proteínas geralmente são acompanhadas da alteração de várias funções celulares, resultando na inibição do metabolismo de fosfolípidos, quebra da homeostase intracelular do cálcio e, conseqüentemente, perda do potencial transmembrânico mitocondrial e comprometimento do citoesqueleto (Oliver et al., 1990). Devido a este fato, as células possuem diferentes mecanismos antioxidantes envolvidos na proteção contra um eventual dano causado por quantidades excessivas dessas espécies altamente reativas (Blair, 2006). Em situação de estresse oxidativo as células apresentam dois importantes mecanismos de defesa: um sistema de defesa não enzimático, onde o tampão redutor tiol, constituído do tripeptídeo glutationa reduzida (GSH) e da proteína tioredoxina (TRX); e um sistema enzimático compreendendo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPX) (Curtin et al., 2002).

A principal função desses sistemas é a eliminação ou neutralização das EROs formadas no metabolismo celular normal ou em resposta a estímulos externos, prevenindo as reações em cadeia iniciadas por esses radicais (Yu, 1994). No sistema enzimático há participação da enzima SOD citosólica dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} e da isoforma mitocondrial (SOD mitocondrial) dependente de Mn^{2+} como cofator. Porém, ambas são responsáveis pela dismutação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 , que pode ser reduzido pela ação das enzimas CAT e GPX (Nordberg e Arner, 2001). A CAT é encontrada principalmente nos hepatócitos e eritrócitos, estando presente em altas concentrações nos peroxissomos e em baixas concentrações nas mitocôndrias (Halliwell e Gutteridge, 1990). Ela é responsável pela remoção do H_2O_2 , que é

enzimaticamente reduzido a H_2O e oxigênio molecular (Yu, 1994). A GPX é uma das formas mais eficientes de controle dos níveis de H_2O_2 e hidroperóxidos (Yu, 1994). Esta enzima é dependente de GSH e age conjuntamente com a glutathiona redutase (GR). A GR é responsável pela regeneração da GSH na presença de equivalentes redutores na forma de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo manter o ciclo metabólico da glutathiona e da GPX (Nordberg e Arner, 2001).

1.5. Sinalização celular e proteínas fosfatases

A transdução de sinal é um mecanismo fundamental no processo de adaptação das células aos diferentes estímulos e mudanças ambientais (Galan e Bliska, 1996). As respostas celulares são mediadas por cascatas de reações que envolvem proteínas quinases, as quais ativam substratos proteicos por fosforilação dependente de trifosfato de adenosina (ATP) em resíduos específicos, tais como serina/treonina ou tirosina em eucariotos, modulando de forma positiva ou negativa a atividade de diversas proteínas. A regulação reversa das quinases é realizada pela desfosforilação catalisada por proteínas fosfatases (Bach et al., 2006). As proteínas fosfatases participam nos mecanismos de transdução de sinal modulando uma grande variedade de eventos celulares, tais como metabolismo, transcrição gênica, controle do ciclo celular, resposta imune, sobrevivência e morte celular (Walton e Dixon, 1993).

O balanço entre fosforilação e desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares

como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores e substâncias ou metabólitos tóxicos (Ostman e Bohmer, 2001; Ferreira et al., 2006). As proteínas fosfatases são classificadas como hidrolases que utilizam como substratos resíduos de aminoácidos fosforilados. As fosfatases estão divididas em duas grandes superfamílias que diferem entre si estruturalmente e apresentam mecanismos de catálise distintos (Tonks, 2006). A superfamília das serina/treonina fosfatases é composta por enzimas dependentes de íons metálicos divalentes, que catalisam reações por um mecanismo em uma única etapa (Barford et al., 1998). Por outro lado, as proteínas tirosina fosfatases não necessitam de íons metálicos e desfosforilam os resíduos de tirosina em duas etapas com formação de um intermediário tiofosforilado (Pannifer et al., 1998).

A superfamília das proteínas tirosina fosfatases (PTPs) é responsável pela hidrólise da ligação éster de fosfato de tirosina das proteínas (Wiland et al., 1996; Burke e Zhang, 1998). Devido às diferenças estruturais, essas proteínas são divididas em quatro subfamílias: PTPs clássicas específicas, PTPs com dupla especificidade (DSPs), PTPs proteína fosfatase reguladora da divisão celular 25 (Cdc25) e PTPs de baixo peso molecular (LMW) (Zhang, 2005). Ainda que, essas enzimas apresentem poucas similaridades em sua sequência, são consideradas da mesma superfamília devido ao mecanismo catalítico comum e também pela conservação de características estruturais no sítio ativo. O domínio catalítico das PTPs consiste de estruturas secundárias a e b, sendo composto de um núcleo de folhas- β flanqueado por α -hélices (Zhang, 2002). Neste domínio é encontrada a cisteína catalítica, característica comum das PTPs, que é inibida por

p-cloromercuribenzoato, pervanadato, H₂O₂ e outros agentes oxidantes (Tonks 1996; Huyter et al., 1997; Tracey, 2000; Aoyama et al., 2003). Esta característica qualifica as PTPs como um importante sensor do estado redox celular, devido à oxidação da cisteína do sítio ativo, bloqueando assim a capacidade dessas enzimas de desfosforilar seus alvos (Caselli et al., 1998; Aoyama et al., 2003; Ferreira et al., 2006; Souza et al., 2009). Fisiologicamente, muitos estímulos, incluindo fatores de crescimento e citocinas, induzem a produção de EROs e conseqüentemente, a inibição das PTPs. Desta forma, a oxidação da cisteína no sítio catalítico de PTPs promove inibição da atividade dessas fosfatases, constituindo importante mecanismo regulatório da atividade catalítica dessas enzimas (Souza et al., 2009).

As PTPs de baixa massa molecular (LMWPTPs) constituem um grupo de proteínas tirosina fosfatases específicas de 18 kDa (pertencentes à classe II), amplamente expressas em diferentes tecidos, conhecidas como fosfatase ácida solúvel (ACP1). Em humanos são codificadas por uma única cópia do gene *ACP1*, localizado no cromossomo 2, cuja transcrição origina quatro diferentes RNAs mensageiros por um complexo sistema de *splicing* alternativo. Das quatro isoformas de LMWPTP apenas duas, isoforma 1 e isoforma 2, demonstraram ser cataliticamente ativas, exercendo funções até o momento consideradas idênticas (Modesti et al., 1998; Souza et al., 2009). A LMWPTP é reconhecida pela capacidade de interação com diferentes receptores tirosina quinase, receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor de insulina e seu substrato (IRS) e receptor ephrin do tipo A2 (EphA2R), com proteínas de ancoragem (β -catenina) e com proteínas do citoesqueleto (Berti et al., 1994;

Chiarugi et al., 2000). Desta forma, ela possui importante papel na regulação da proliferação celular uma vez que sua ativação pode estar relacionada à desfosforilação de receptores de fatores de crescimento e moléculas de sinalização, inibindo assim a proliferação celular. Sua atividade também está relacionada à desfosforilação do EphA2R, levando à desestabilização da adesão célula-célula, contribuindo no processo apoptótico ou no fenótipo de célula tumoral com maior potencial metastático (Souza et al., 2009).

Dentre as proteínas fosfatases, a proteína fosfatase 2A (PP2A) é a principal proteína serina/treonina fosfatase envolvida na regulação de vias celulares de transdução de sinal (Yu et al., 2004). A relação entre PP2A e a regulação do processo apoptótico envolve, entre outras ações, sua ativação por ceramida, a qual é implicada na desfosforilação do resíduo de Ser70 de Bcl-2, e consequente ativação da atividade anti-apoptótica desta proteína (Tamura et al., 2004). No entanto, a função pró-apoptótica da PP2A está relacionada ao seu papel na progressão do ciclo celular, crescimento e sobrevivência celular, inibindo direta ou indiretamente as quinases cdc2, MAPKs e Akt, regulando negativamente o crescimento celular pela desfosforilação e inativação de MEK e ERK e, desta forma, estimulando o processo apoptótico (Schontal, 2001; Chiang et al., 2003).

1.6. Metaloproteinases

Migração, proliferação, estratificação e diferenciação de queratinócitos são etapas envolvidas na formação do epitélio que ocorre durante toda a vida do indivíduo (O'Toole, 2001). Esses processos dependem de uma intensa relação

entre componentes da matriz extracelular (MEC), moléculas de adesão celular e citoesqueleto, que modulam a motilidade dos queratinócitos. A sinalização via integrinas e a secreção de colagenases são eventos desses processos, estando acoplados a mecanismos de transdução de sinal que modulam a transcrição gênica (O'Toole, 2001). Neste sentido, a adesão celular à MEC mediada por integrinas pode levar à ativação da quinase de adesão focal (FAK) e à subsequente ativação de MAPKs que possuem papel fundamental na transcrição de genes envolvidos no crescimento e diferenciação. Quando queratinócitos são cultivados sobre substratos pró-migratórios observa-se fosforilação da FAK e ERK1/2 durante a migração celular (O'Toole, 2001).

As metaloproteinases (MMPs) fazem parte de uma família de endopeptidases dependentes de Zn^{2+} e representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação ou reabsorção de componentes da MEC. Dentre as MMPs, as gelatinases A e B [MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa)] respectivamente estão envolvidas na proteólise e rompimento de membranas basais, degradação de colágenos tipo IV e V, colágenos desnaturados (gelatinas), fibronectina e elastina (Kahari e Saarialho-Kere, 1997).

As MMPs possuem um papel fundamental nos processos normais de remodelamento da estrutura da MEC na regeneração tecidual, envelhecimento cronológico e deletério da pele, além de inúmeras dermatoses e câncer, sendo expressas diferencialmente de acordo com a situação (Kahari e Saarialho-Kere, 1997; Johansson et al., 2000ab; Ravanti e Kahari, 2000; Rittié, 2002). As MMPs são reguladas por inúmeros mecanismos e diferentes vias de sinalização, sendo o processo dependente da atuação de citocinas e fatores de crescimento como EGF

e TNF- α . Em especial, os queratinócitos secretam essas proteases em condições normais e sua expressão é aumentada significativamente durante a migração e a diferenciação celular (O'Toole, 2001). Estudos demonstraram que as MAPKs possuem um importante papel na regulação da secreção da MMP-9 por queratinócitos em um mecanismo dependente da ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NF κ B (Zeigler et al., 1999; Holvoet et al., 2003). *In vitro*, a MMP-9 é secretada por queratinócitos normais e por células epiteliais tumorais, sendo sua regulação de particular interesse em doenças inflamatórias e na carcinogênese (Kahari e Saarialho-Kere, 1997; Kobayashi et al., 1998; Bachmeier et al., 2000; Johansson et al., 2000b; Vihinen et al., 2005).

1.7. Citoesqueleto

O citoesqueleto compreende uma rede complexa de filamentos de proteínas fibrosas que se estende por todo o citoplasma. Essa estrutura é altamente dinâmica e reorganizada continuamente sempre que a célula altera sua forma, se divide ou em resposta a estímulos endógenos e exógenos. O citoesqueleto desempenha um importante papel mecânico de suporte na manutenção da forma celular (Xu et al., 2009; Kim e Coulombe, 2010). Além disso, alterações no citoesqueleto celular são fundamentais para a transmissão de muitos sinais que levam a uma determinada resposta celular frente a um estímulo específico. A este respeito, interações entre proteínas de membrana e proteínas constituintes do citoesqueleto têm papel central nas respostas celulares

(Carraway, 2000). O efeito coordenado das várias proteínas associadas à actina, proporcionando uma resposta do citoesqueleto a um sinal extracelular, só é possível devido a complexos mecanismos cooperativos de interação entre essas proteínas, regulando assim a capacidade de polimerização da actina e a organização citoplasmática (Xu et al., 2009; Kim e Coulombe, 2010). Diferentes fatores, incluindo agentes externos, podem modificar o metabolismo das proteínas do citoesqueleto, sendo que a intensidade e a natureza desses fatores são determinantes na ativação de diferentes mecanismos capazes de alterar seu funcionamento normal e provocar danos reversíveis ou irreversíveis no metabolismo celular (Sivaguro et al., 2003; Toivola et al., 2010).

Além de modular e controlar importantes funções celulares, sua participação é indispensável durante o desenvolvimento do processo apoptótico, contribuindo na determinação das alterações morfológicas características do processo apoptótico (Cotter et al., 1992). O estudo dos mecanismos moleculares responsáveis pelas características morfológicas da apoptose revelou que a formação dos *blebs* e dos corpos apoptóticos é mediada, principalmente, pelas proteínas actina e GTPase A(RhoA) (Mills et al., 1998). Estudos recentes associaram diferentes componentes do citoesqueleto, principalmente os filamentos de actina, a outros eventos mitocondriais como, por exemplo, a modulação da produção de EROs e do potencial transmembrânico mitocondrial, podendo desta forma contribuir na ativação/regulação do processo apoptótico (Leadsham et al., 2010).

1.8. Microarranjos de peptídeos (PepChip)

A elucidação da função de proteínas no seu contexto celular constitui um dos desafios do proteoma. Sabe-se que a função de proteínas é regulada não só pela presença ou ausência de proteínas distintas, mas também pelas modificações pós-traducionais e processamento proteolítico que resultam em alterações na compartimentalização ou em interações e formação de complexos de proteínas específicas. Várias tecnologias têm sido propostas para analisar o conteúdo proteico altamente dinâmico e complexo dos sistemas biológicos e um desenvolvimento considerável é observado nos últimos anos (Versteeg et al., 2000; Parikh e Peppelenbosch, 2010). Da mesma forma, a importância da fosforilação e desfosforilação de proteínas na regulação do metabolismo celular tem atraído a atenção para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem o estudo desses eventos de forma mais eficiente (Krebs e Graves, 2000; Diks e Peppelenbosch, 2004; Parikh e Peppelenbosch, 2010). Classicamente, o estudo da atividade quinásica e da fosforilação de proteínas é realizado por *western blot*. No entanto, esta técnica não permite a análise de várias proteínas ao mesmo tempo e, portanto, é limitante em estudos clínicos ou em análises de alvos moleculares da ação de novos compostos. Neste sentido, a tecnologia de microarranjos de peptídeos apresenta um grande potencial para identificação, quantificação e estudo funcional de proteínas com uma perspectiva global. Recentemente, o grupo do Prof. Maikel Peppelenbosch (Erasmus Medical Center, Erasmus University, Holanda) desenvolveu uma técnica denominada Kinoma ou PepChip, que consiste basicamente em um microarranjo de peptídeos substratos

sólido para aplicação na pesquisa de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos.

1.9. Riboflavina

A riboflavina, 7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina (Fig. 4), é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B2, que apresenta coloração amarela alaranjada. Esta vitamina é de fundamental importância em organismos aeróbios, sendo precursora de importantes coenzimas da cadeia transportadora de elétrons como flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). Ela também origina flavinas que se encontram ligadas a diversas enzimas, as quais atuam na catálise de um grande número de importantes reações como, por exemplo, as relacionadas ao reparo do DNA (Souza et al., 2005).

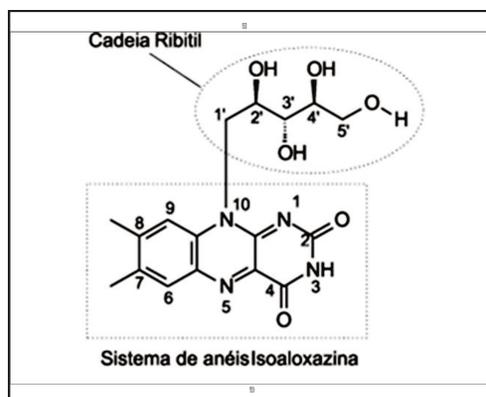


Figura 4: Estrutura química da riboflavina. Estrutura química da riboflavina com destaque para a cadeia ribitil e o sistema de anéis isoaloxazina. Fonte: Souza et al. (2005).

Outro aspecto importante da riboflavina como precursora das coenzimas FMN e FAD em células eucarióticas é o papel desempenhado pelas flavinas no dobramento de proteínas destinadas ao espaço extracelular, no metabolismo

intermediário. Este processo envolve a formação de ligações dissulfeto catalisada por oxidases dependentes de FAD no retículo endoplasmático antes da secreção. Evidências indicam que a deficiência de riboflavina em culturas de células humanas impede o dobramento e a subsequente secreção de proteínas, tais como interleucina-2 (IL-2), apolipoproteína B-100, plasminogênio e imunoglobulinas (Camporeale e Zemleni, 2003; Manthey et al., 2005, 2006). O acúmulo de proteínas inadequadamente dobradas no retículo endoplasmático desencadeia uma resposta de estresse que inclui fosforilação do fator de iniciação de eucariotos-2 α (eIF-2 α) e, conseqüentemente, inibição da tradução, expressão de chaperonas que assistem no dobramento de proteínas e ativação da degradação dependente de ubiquitina de proteínas dobradas erroneamente (Manthey et al., 2005). Além disso, esse acúmulo de proteínas parece estar associado ao aumento da expressão de genes envolvidos com a parada do ciclo celular e indução de apoptose, por exemplo, ativação do fator de transcrição GADD153 (*growth arrest and DNA damage inducible gene 153*), causando diminuição da proliferação celular (Manthey et al., 2005).

Estudos sugerem que os efeitos da deficiência de riboflavina na proliferação celular e apoptose também sejam causados pela interferência em outras vias dependentes de flavina (Manthey et al., 2006). Em particular, FAD atua como coenzima da glutathione redutase, uma enzima essencial para a regeneração da glutathione reduzida, a qual possui um importante papel no sequestro de espécies reativas de oxigênio, prevenindo o dano oxidativo a proteínas, DNA e outras biomoléculas (Grimble, 1997; Hustad et al., 1999). Curiosamente, a riboflavina

pode tanto contribuir quanto inibir o estresse oxidativo pela sua dupla capacidade de produzir ânion superóxido e, ao mesmo tempo, reduzir hidroperóxidos (Massey, 2000). O acúmulo de danos oxidativos em proteínas e no DNA pode desencadear respostas de estresse como a translocação nuclear do NF κ B, parada do ciclo celular e apoptose. Neste sentido, Manthey e colaboradores (2006) demonstraram que a deficiência em riboflavina está associada ao aumento da incidência de quebras de fita de DNA e oxidação de proteínas em células hepáticas, levando ao estresse celular e à parada do ciclo em G1.

Na literatura há relatos de que a riboflavina apresenta outras funções biológicas atuando como quimioprotetor (Webster, 1996), anti-inflamatório (Bertollo et al., 2006), modulador do estado redox (Massey, 2000) e agente citotóxico (Edwards et al., 1994, 1999; Souza et al., 2006a). Recentemente, resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa revelaram que a riboflavina em concentrações da ordem de nanomolar causou a diferenciação de células da linhagem pré-osteoblástica MC3T3-E1 (Neto et al., 2011). A riboflavina também atua como um fotossensibilizador endógeno, apresentando sensibilidade à radiação UV e visível. Ao absorver luz, ela atinge o estado triplete excitado que será desativado pela foto-oxidação de um substrato e formação de radicais intermediários e EROs, ou pela interação com o oxigênio molecular gerando oxigênio singlete (Souza et al., 2005). A capacidade fotossensibilizadora da riboflavina em sistemas biológicos está relacionada ao alto potencial redox de sua forma triplete ativada. Neste contexto, a riboflavina constitui um fotossensibilizador

eficiente que vem sendo estudado com propósitos de aplicação na terapia fotodinâmica do câncer.

A análise das reações de fotodegradação da riboflavina em soluções aquosas (aspectos fotoquímicos da riboflavina) evidenciou a formação de um conjunto de fotoprodutos que também relacionam-se aos efeitos citotóxicos da riboflavina irradiada (Ahmad et al., 2004ab; Holzer, et al., 2005; Ahmad et al., 2006). Os resultados obtidos mostraram que a riboflavina sofre várias reações de degradação, das quais fotólise (fotoredução intramolecular) e fotoadição intramolecular são as principais (Fig. 5) (Ahmad et al., 2006; Ahmad et al., 2004a; Ahmad et al., 2004b). Como resultado, a fotodegradação da riboflavina em soluções aquosas resulta na formação de uma série de produtos, tais como lumicromo, lumiflavina e 7,8-dimetil-10-(formilmetil)-isoaloxazina (Figs. 6A-C respectivamente). Recentemente, nosso grupo de pesquisa investigou o mecanismo molecular envolvido na citotoxicidade dos fotoprodutos gerados pela irradiação da riboflavina em células da linhagem de leucemia mielóide aguda HL60 e da linhagem humana de câncer prostático PC3 (Souza et al., 2006b; Queiroz et al., 2007). Seu potencial fototóxico também foi estudado em fibroblastos de embrião de camundongos (linhagem celular BALB/c 3T3) e em queratinócitos humanos da linhagem HaCaT (Machado et al., submetido).

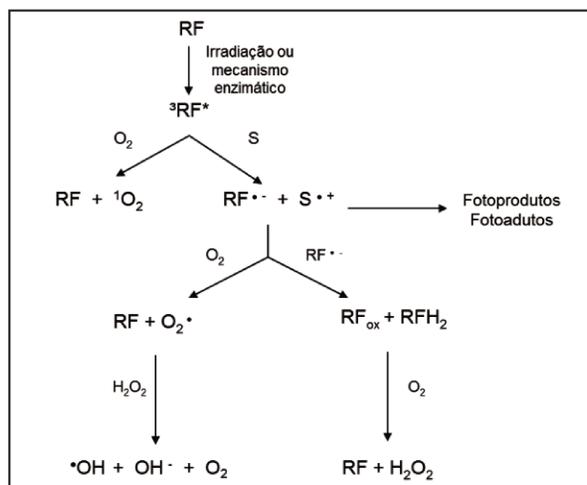


Figura 5: Mecanismos de fotodegradação da riboflavina. Mecanismos tipo I e tipo II em presença de oxigênio molecular (S representa o composto alvo da riboflavina irradiada). Fonte: Souza et al. (2005).

Em conjunto, as características físico-químicas e biológicas da riboflavina são interessantes para sugerir sua aplicação em ensaios de prevenção e tratamento de doenças dermatológicas com emprego de luz. Além disso, esta vitamina é aprovada para uso clínico e apresenta segurança bem estabelecida, pois são raras as reações adversas observadas em adultos e crianças (Boehnke et al., 2004). De fato, compostos que apresentam propriedades fotossensibilizadoras são alvos de estudos na área de tratamento e prevenção de doenças com emprego de luz, consistindo em uma das principais estratégias terapêuticas na dermatologia e influenciando expressivamente o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento do câncer (terapia fotodinâmica) (Garcia-Zuazaga et al., 2005; Ghaffar et al., 2005; Levine et al., 2005; Nayak, 2005; Weichenthal e Schwarz, 2005; Allison et al., 2006; Babilas et al., 2006; Nestor et al., 2006; Pasard et al., 2006). Assim, os possíveis efeitos citotóxicos e/ou citoprotetores da riboflavina e riboflavina irradiada nos modelos de estresse em

queratinócitos são de particular interesse, principalmente sua implicação na terapêutica dermatológica.

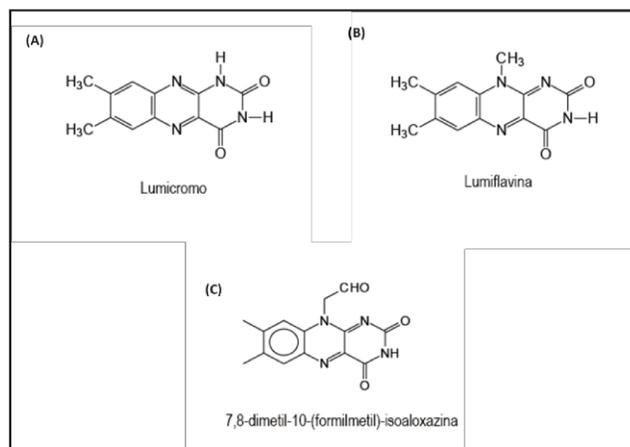


Figura 6: Estrutura química dos principais fotoprodutos da riboflavina. (A) lumicromo, (B) lumiflavina e (C) 7,8-dimetil-10-(formilmetil)-isoaloxazina. Adaptada de Souza et al. (2005).

Diante do exposto, é fundamental a realização de estudos mais amplos para elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta dos queratinócitos a agentes estressores. Assim, este trabalho baseia-se principalmente na convicção de que a compreensão de como as células normais respondem ao estímulo extracelular certamente auxiliará a decifrar os problemas envolvidos em inúmeras patologias, incluindo o câncer, além de contribuir no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Portanto, neste trabalho investigou-se a coreografia de proteínas envolvidas em vias de sinalização que determinam o balanço entre sobrevivência e morte de queratinócitos humanos expostos a diferentes tipos de estresse: 1) choque hiperosmótico, causado pela desidratação ou exposição a substâncias não iônicas e osmoticamente ativas, como os agentes estabilizantes e preservativos geralmente utilizados em formulações para aplicação tópica ou transdérmica, como o sorbitol, e 2) estresse oxidativo, que é desencadeado *in vivo*

por fatores externos e endógenos como, por exemplo, radiação UV e inflamação, ou *in vitro* pela exposição a agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio. Além de possibilitar o estabelecimento e caracterização bioquímica de um modelo experimental *in vitro* para o estudo de novos compostos com atividades distintas, capazes de modular as funções da pele num contexto preventivo ou terapêutico, este estudo teve caráter estratégico e promissor ao se considerar a possibilidade de parcerias futuras com o setor empresarial para o desenvolvimento de compostos de interesse econômico ou tecnologias para avaliação de risco dermatotxicológico, baseadas em novos conceitos sobre as funções da pele em nível molecular. Neste sentido, a riboflavina foi selecionada como parte de um esforço para se estender os conhecimentos acerca do potencial terapêutico desta vitamina também na área dermatológica.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta de queratinócitos da linhagem não tumorigênica humana HaCaT ao choque hiperosmótico, causado pelo sorbitol, e ao estresse oxidativo, causado pelo peróxido de hidrogênio. Além disso, os efeitos da riboflavina e da riboflavina irradiada sobre a viabilidade de queratinócitos submetidos aos dois tipos de estresse foram investigados.

Considerando-se os objetivos centrais propostos, os seguintes objetivos específicos realizados neste estudo:

1. Determinação das características morfológicas e bioquímicas da morte celular induzida pelo choque hiperosmótico e pelo estresse oxidativo;
2. Análise da geração de EROs e da expressão de proteínas do sistema antioxidante de queratinócitos submetidos aos agentes estressores;
3. Análise do perfil quinásico de células HaCaT expostas ao estresse empregando-se o PepChip e avaliação da expressão e/ou ativação de proteínas quinases e fosfatases associadas a vias de sinalização de sobrevivência e morte celular;
4. Avaliação de alterações na organização e na expressão e/ou ativação de proteínas envolvidas no remodelamento do citoesqueleto e da matriz extracelular;
5. Avaliação dos efeitos da riboflavina e seus fotoprodutos na viabilidade de células HaCaT submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), soro fetal bovino (SFB), sulfato de estreptomicina e penicilina foram obtidos da Nutricell (Campinas, SP, BR). Riboflavina, sorbitol, peróxido de hidrogênio, vermelho neutro, brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), geldanamicina (GA), albumina de soro bovino (BSA), cloreto de sódio (NaCl), Tween 20, desoxicolato de sódio, *o*-vanadato, fluoreto de sódio (NaF), aprotinina, leupeptina, ditioneitol (DTT), dodecilsulfato de sódio (SDS), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina ácido etanosulfônico (HEPES), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio (MgCl₂), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄), glicina, hidróxido de sódio (NaOH), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), cloreto de cálcio (CaCl₂), gelatina, acrilamida, bis-acrilamida, kit para dosagem de atividade fosfatásica (Protein Tyrosine Phosphatase Assay Kit - PTP 101) e ribonuclease (RNase) tipo I foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Coomassie Blue R-250, azul de bromofenol, Triton X-100, glicerol, metanol e etanol foram obtidos da Merck Sharp & Dohme (Whitehouse Station, NJ, USA). Kit colorimétrico para determinação de atividade de lactato desidrogenase (LDH) foi obtido da Bioclin (Santa Branca, MG, BR). Anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com aloficocianina (APC), iodeto de propídeo, anticorpos

anti-citocromo *c* e anti-fosfo-MAPK p38 conjugado com Alexa Fluor-488 (612594) foram obtidos da BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Anticorpo primário policlonal anti-catepsina B e os kits colorimétricos para determinação de atividade de caspase 8, caspase 3 e caspase 9 foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Os anticorpos primários anti- β -actina (sc-1616), anti-proteína oncogênica Myc (c-Myc) (sc-764), anti-Bax (sc-493), anti-Bcl-2 (sc-7382), anti-c-IAP1 (sc-1867), anti-fosfo-proteína fosfatase 2A (PP2A) (Ser 8) (sc-12615), anti-PKA α (sc-28315) e anti-PARP [poli(ADP-ribose) polimerase] (sc-365315) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anticorpos anti-superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) (C55069) e anti-catalase (C0979) foram obtidos da Sigma Chemical Co. Os anticorpos anti-JNK (9252), anti-MAPK p38 (9212), anti-ERK1/2 (4695), anti-fosfo-JNK1/2 (Thr183/Tyr185) (9251), anti-fosfo-MAPK p38 (Thr180/Tyr182) (9211), anti-fosfo-Bcl-2 (Ser70) (2827), anti fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (9101), anti-AIF (4642), anti-caspase 3 clivada (Asp175) conjugada com Alexa Fluor-488 (9669), anti-XIAP (2042), anti-fosfo- Janus quinase 1 (JAK1) (Tyr1022) (3331), anti-fosfo- Janus quinase 2 (JAK2) (Tyr1007/1008) (3771), anti-fosfo- proteína tirosina fosfatase com domínio SH2-2 (SHP2) (Tyr542) (3751), anti-Src total (2109), anti-fosfo-Src (Tyr527) (2105), anti-fosfo-Src (Tyr416) (2101), anti-proteína quinase Src carboxi-terminal (Csk) (4965), anti-paxilina (2542), anti-fosfo-paxilina (Tyr118) (2541), anti-FAK total (3285), anti-cofilina (3312), anti-fosfo-cofilina (Ser3) (3311), anti-fosfo-FAK (Tyr397) (3283), anti-fosfo-FAK (Tyr925) (3284), anti-RhoA (2117), anti-MMP-2 (4022), anti-Bcl-X_L (2762),

anti-Hsp90 (4875), anti-Hsp27 (2402) e anticorpo anti-fosfo-Akt (Thr308) conjugado com Alexa Fluor-488 (2918) foram obtidos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) conjugado com Alexa Fluor-488 (16-283), anti-fosfatidilinositol-3 quinase subunidade 85 (PI3K-p85) (06-496), anti- GTPase da subfamília Rac da família das Rho GTPases (Rac1) (05-389), anti-fosfo-FAK (Tyr577) (07-831) e anti-AIF foram obtidos da Upstate/Millipore (Temecula, CA, USA). Anti-glutationa peroxidase 1 (GPX1) (ab59546), anti-gama-glutamil transpeptidase (Gama-GT) (ab55138), anti-glutationa (GR) (ab84963) e anti-LMWPTP (ab26232) foram obtidos da Abcam (San Francisco, CA, USA). Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-coelho (7074) e anti-camundongo (7076) foram obtidos da Cell Signaling Technology, anti-cabra (sc-2020) da Santa Cruz Biotechnology e anti-ovelha (ab6895) da Abcam. Os anticorpos secundários anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor-488 e anti-coelho conjugados com Alexa Fluor-488, 594 e 647 foram obtidos da Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Fluoromount-G e paraformaldeído foram obtidos da Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA). Trihidrocloro de 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bis-1H-benzimidazol (Hoechst 33342), aglutinina de gérmen de trigo conjugada com Alexa Fluor-594 (WGA-594), MitoTracker Green, MitoTracker Deep Red, dihidrocloro de 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), perclorato de etil-éster-tetrametilrodamina (TMRE), Protein A-Sepharose, diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) e faloidina conjugada com Alexa Fluor-488 foram obtidos da Invitrogen/Molecular Probes. Os slides do PepChip foram provenientes da PepScan (Lelystad, Holanda).

3.2. Métodos

3.2.1. Manutenção de células HaCaT

A linhagem de queratinócitos humanos HaCaT foi gentilmente doada pela Dra. Liudmila Kodach (Amsterdam Medical Center, Amsterdam, Holanda). As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (antibióticos), em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Para manutenção, as células foram cultivadas em frascos de cultura celular com sub-cultivos periódicos a cada 48 h.

3.2.2. Curva de crescimento celular

Para determinação do tempo de duplicação e da fase de crescimento exponencial celular, 1 mL da suspensão celular foi plaqueado por poço em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos em placas de 24 poços em diferentes densidades celulares ($1,5 \times 10^4$, $2,3 \times 10^4$ e $4,3 \times 10^4$ células/mL). As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Após adesão celular (5 h após plaqueamento), as células correspondentes ao tempo 0 foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato contendo cálcio (PBS-Ca²⁺) e fixadas com solução gelada de ácido tricloroacético (TCA) 5%. As demais células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos por 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias. Após os tempos indicados, as

células foram lavadas, fixadas e lisadas em 1 mL de NaOH 0,5 mol/L. A proliferação celular nos diferentes períodos foi determinada pela diferença entre os valores de absorvância (260 nm) dos lisados celulares correspondentes ao final e início (tempo 0) do crescimento celular (Souza et al., 2006). O número de células foi determinado a partir da absorvância medida em 260 nm, a qual corresponde ao conteúdo total de ácidos nucleicos celular. A partir do gráfico em escala semilog dos valores de número de células (eixo y) em função do tempo (eixo x), determinou-se a fase linear (traço contínuo vermelho) da curva obtida, indicada apenas pelos símbolos (sem linha) (Fig. 7; Resultados) e, a seguir, calculou-se o tempo necessário para duplicação das células, ou seja, o tempo de duplicação celular, a partir da equação da reta (Freshney, 2005).

3.2.3. Exposição das células HaCaT ao choque hiperosmótico (sorbitol) e ao estresse oxidativo (H₂O₂)

As células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de $3,5 \times 10^4$ células/mL (200 μ L) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Ao atingirem a confluência (48 h após o plaqueamento), o meio de cultura foi substituído por meio DMEM sem soro, contendo 0,5 mg/mL de BSA. Após 24 h, o meio contendo BSA foi removido e as células foram incubadas com diferentes concentrações de sorbitol (0,2–2 mol/L) ou H₂O₂ (0,1–4 mmol/L), preparadas em meio DMEM sem soro, por 2 h e 4 h respectivamente, em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. A seguir, a viabilidade celular foi avaliada

pelos ensaios de captação do corante vermelho neutro, redução do MTT, quantificação de ácidos nucleicos e atividade da LDH (Ravid et al., 2002; Diker-Cohen et al., 2006).

3.2.4. Irradiação da riboflavina

Placas de Petri contendo soluções estoques de riboflavina na concentração de 175 $\mu\text{mol/L}$, dissolvida em meio DMEM sem soro, foram expostas à radiação UVC por 15 min, a uma distância de 40 cm da lâmpada. A irradiação foi realizada utilizando-se uma lâmpada UVC (4 W, UVC-11, $\lambda_{\text{máx}}=254,5$ nm - Ultraviolet Products), cuja irradiância a esta distância foi determinada utilizando-se um radiômetro (Cole Parmer Instruments Co., France; UVC-254 nm), obtendo-se o valor de 0,383 mW/cm^2 . A partir deste valor foi calculada a dose de irradiação utilizada, sendo igual a 0,345 J/cm^2 .

3.2.5. Avaliação dos efeitos da riboflavina e riboflavina irradiada sobre a viabilidade de células HaCaT

Para os testes de citotoxicidade, 200 μL de uma suspensão celular a uma densidade de $3,5 \times 10^4$ células/mL foram plaqueadas em microplacas de 96 poços. Após 24 h de incubação em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO_2 , as células foram tratadas com diferentes concentrações de riboflavina e riboflavina irradiada diluídas em meio de cultura (10–175 $\mu\text{mol/L}$). Para avaliação dos efeitos da

riboflavina e riboflavina irradiada sobre a viabilidade de queratinócitos expostos ao estresse, as células HaCaT foram pré-tratadas com diferentes concentrações de riboflavina e riboflavina irradiada (2,5, 5, 20 e 30 $\mu\text{mol/L}$) por 24 h e, posteriormente, expostas a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT.

3.2.6. Análise da viabilidade celular

Ensaio de incorporação do corante vermelho neutro - Após exposição aos diferentes tipos de estresse, as células foram lavadas com PBS, pH 7,4 e foram adicionados 100 μL de meio sem soro contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ do corante vermelho neutro. Após 3 h de incubação em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO_2 , as células foram lavadas com PBS e 100 μL de solução de extração (1:50 ácido acético glacial:etanol) foram adicionados em cada poço. As placas foram agitadas por 20 min e a absorbância correspondente a cada poço foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm em leitor de microplacas (ELx 800 BIO-TEK, Winooski, VT, USA). A viabilidade celular foi estimada comparando-se os valores de absorbância do controle com os valores de absorbância das células tratadas, sendo expressos em porcentagem em relação ao controle (100%). Os resultados representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em sextuplicata (Borenfreund e Puerner, 1985).

Ensaio de redução do MTT - Após exposição das células a riboflavina e riboflavina irradiada e/ou exposição aos diferentes agentes estressores, as células foram lavadas com PBS, pH 7,4 e foram adicionados 100 μ L de meio de cultura sem SFB contendo 0,5 mg/mL de sal de tetrazólio. Após 4 h de incubação em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂, o meio foi cuidadosamente retirado e os cristais de formazan produzidos foram solubilizados em etanol absoluto. As placas foram agitadas por 15 min e a absorbância correspondente a cada poço determinada espectrofotometricamente a 570 nm em leitor de microplacas (ELx 800 BIO-TEK). A viabilidade celular foi estimada comparando-se os valores de absorbância do controle com os valores de absorbância das células tratadas, sendo os valores expressos em porcentagem em relação ao controle (100%). Os resultados representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em sextuplicata (Mosmann, 1983).

Quantificação de ácidos nucleicos - Após exposição das células aos diferentes agentes estressores, o meio de cultura foi removido cuidadosamente, as células foram lavadas com PBS-Ca²⁺, fixadas com solução de TCA 5% gelada, lavadas 2 vezes com etanol gelado, secas ao ar e incubadas com 200 μ L/poço de NaOH 0,5 mol/L por 1 h, em estufa a 37°C, para lise celular. A absorbância correspondente a cada poço foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). A viabilidade celular foi calculada comparando-se os valores de absorbância do controle com os valores de absorbância das células

tratadas, sendo os valores expressos em porcentagem em relação ao controle (100%). Os resultados representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata (Souza et al., 2006b).

Determinação da atividade da LDH - Após exposição das células aos diferentes agentes estressores como descrito anteriormente, o meio de cultura foi coletado, centrifugado a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) por 15 min e o sobrenadante armazenado a -20°C . A atividade da LDH no sobrenadante celular foi determinada utilizando-se kit colorimétrico segundo as instruções do fabricante (Bioclin). A quantificação cinética da formação do produto lactato foi determinada a partir da velocidade de consumo do NADH, medida pela queda da absorbância a 340 nm. Para realização dos testes foram adicionados 100 μL de sobrenadante celular a 1 mL do reagente de trabalho, e a mistura foi homogeneizada e transferida para cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, termostaticada a 37°C . Após 1 min, foi realizada leitura inicial em espectrofotômetro com arranjo de diodos de Agilent, modelo 8453 com dispositivo de Peltier acoplado (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), disparando simultaneamente o cronômetro. As leituras foram repetidas após 1, 2 e 3 min. A média das diferenças dos valores de absorbância por min ($\Delta A/\text{min}$) foi calculada e utilizada para determinação da atividade da LDH em U/L segundo as instruções do fabricante. A atividade enzimática foi expressa em U/L sendo os valores expressos em média das absorbâncias. Os resultados representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quintuplicata.

3.2.7. Pré-tratamento das células HaCaT submetidas aos dois tipos de estresse com geldanamicina (GA)

Placas de 96 ou 6 poços contendo suspensão de células HaCaT ($3,5 \times 10^4$ células/mL) preparadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e antibióticos foram incubadas por 72 h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. A seguir, as células foram tratadas com diferentes concentrações de GA (1 e 3 µmol/L) por 3 h e, posteriormente, expostas a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H₂O₂ como descrito no item 3.2.2. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (item 3.2.6) e a atividade de caspase 9 foi determinada segundo descrito no item 3.2.8.

3.2.8. Determinação da atividade de caspases 3, 8 e 9

A atividade de caspases foi determinada utilizando-se kits colorimétricos específicos segundo as instruções do fabricante (R&D Systems). Após exposição das células a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H₂O₂ por 2 e 4 h respectivamente, 1×10^6 células (ou 2–4 mg/mL de proteínas) foram lavadas com solução fisiológica 2 vezes, lisadas com tampão de lise por 20 min e centrifugadas a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) a 4°C por 10 min. A atividade de caspases no lisado celular foi determinada pela quantificação espectrofotométrica do cromóforo *p*-nitroanilina (*p*NA), liberado após clivagem dos substratos X-*p*NA, sendo que X corresponde às sequências de aminoácidos IETD,

LEHD e DEVD reconhecidas pelas caspases 8, 9 e 3 respectivamente. A absorbância das amostras foi medida em 405 nm em leitor de microplacas (ELx 800 BIO-TEK) e a atividade enzimática foi calculada em pmol/min/mg de proteína, sendo o coeficiente de extinção do pNA igual a $10.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão em relação ao controle (100%) e os testes foram realizados em triplicata. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

3.2.9. Citometria de fluxo

Análise da morte celular pela dupla marcação das células com Anexina V/PI - Após exposição a 1 de mol/L sorbitol ou 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente, 1×10^6 células foram coletadas, lavadas com PBS gelado e ressuspendidas em 100 μL de *Binding buffer* 1X [0,1 mol/L HEPES (pH 7,4); 1,4 mol/L NaCl; 25 mmol/L CaCl_2] para avaliação da morte celular. As amostras foram transferidas para tubos de citometria e incubadas com 3 μL de anexina V-FITC e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI por 15 min a temperatura ambiente e ausência de luz. Após adição de 300 μL de *Binding buffer* 1X, as células foram analisadas (10.000 eventos por amostra) em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) usando-se o programa CellQuest 2.8 (BD). A análise da porcentagem das diferentes populações marcadas foi realizada usando-se o programa ModFit 3 (Verity Software House). As células controle

foram tratadas somente com meio de cultura. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 2 experimentos realizados em duplicata.

Análise da atividade de MAPKs, Akt, STATs e caspase 3 - Após exposição aos agentes estressores conforme descrito acima, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. A seguir, 5×10^5 células foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 2% em PBS, a 4°C por 30 min. A seguir, as células foram lavadas com 0,1 mol/L de glicina para redução da autofluorescência e permeabilizadas com 0,01% de saponina por 15 min, ambas diluídas em PBS. As células foram incubadas por 1 h com 10 μ L dos anticorpos específicos conjugados com Alexa Fluor-488 anti-fosfo-MAPK p38, anti-fosfo-ERK, anti-fosfo-Akt e anti-caspase 3 (forma clivada e ativa – Asp 175) a temperatura ambiente e ausência de luz, ou com anticorpo anti-fosfo-STAT 1, 3 ou 5 e anti-fosfo-JNK, diluídos segundo as instruções do fabricante, por 2 h. Estas células foram incubadas, a seguir, com anticorpos secundários específicos conjugados com Alexa Fluor-488 por 1 h a temperatura ambiente e ausência de luz. Após lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em 300 μ L de PBS e analisadas (10.000 eventos por amostra) em citômetro de fluxo FACSCalibur usando-se o programa CellQuest 2.8.

3.2.10. Microscopia confocal

Avaliação de alterações celulares por microscopia confocal - As células HaCaT foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 25 mm de diâmetro. Após 72 h, as células foram incubadas com 2 µg/mL de Hoechst, 10 µg/mL de WGA-Alexa Fluor-594 (WGA-594) e 2 µg/mL de MitoTracker Green por 30 min a temperatura ambiente e ausência de luz. Após este período, as células foram lavadas em meio DMEM sem soro, tratadas com 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H₂O₂ e as imagens capturadas após 2 e 4 h respectivamente. A exposição da fosfatidilserina no lado externo da membrana celular foi avaliada em células HaCaT tratadas com 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H₂O₂ em meio DMEM contendo 5 µL de anexina V-APC, por 2 e 4 h respectivamente, a temperatura ambiente e na ausência de luz. A captura das imagens foi realizada utilizando-se o microscópio confocal LSM 510 META (Zeiss, Jena, Alemanha). Para a excitação dos marcadores MitoTracker Green, WGA-594, anexina V-APC e Hoechst foram utilizados os lasers Ar 488 nm, HeNe 546, HeNe 633 nm e o laser multifóton TiSa 740 nm, que corresponde a excitação em aproximadamente 370 nm, sendo as emissões capturadas nos intervalos de 500–550 nm, 560–610 nm, 635–700 nm e 410–460 nm respectivamente. As imagens foram preparadas utilizando-se os programas Examiner 4.2 (Zeiss) e Adobe Photoshop 9.2.

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) - As células HaCaT foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 25 mm de diâmetro e após 48 h, as células foram incubadas com 2 $\mu\text{g/mL}$ de Hoechst, 10 $\mu\text{g/mL}$ de WGA-Alexa Fluor-594 e 10 nmol/L de TMRE por 30 min, a temperatura ambiente e ausência de luz. Após lavagem com meio DMEM sem soro, as imagens referentes ao tempo 0 foram adquiridas e as células submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo conforme descrito anteriormente. As imagens foram obtidas com intervalos de 20 s para o choque hiperosmótico e 2 min para o estresse oxidativo durante 20 min. Os marcadores WGA e Hoechst foram capturados como descrito previamente e o TMRE foi excitado com o laser Ar 488 nm e a emissão capturada no intervalo 500–550 nm. A captura das imagens foi realizada utilizando-se o microscópio confocal LSM 510 META sem utilizar o “pinhole”. As imagens foram preparadas utilizando-se os programas Examiner 4.2 e Adobe Photoshop 9.2.

Avaliação da permeabilização da membrana lisossomal - As células HaCaT foram cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 72 h, as células foram incubadas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de laranja de acridina (AO) por 30 min em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 . A seguir, o meio contendo AO foi removido e lavagens sucessivas com PBS foram realizadas para remoção do fluorocromo. Após exposição das células aos diferentes tipos de estresse como descrito anteriormente, a captura das imagens foi realizada no microscópio confocal LSM 510 META. O fluorocromo metacromático AO foi excitado com o

laser Ar 488 nm e a emissão capturada nos intervalos de 500–550 nm (verde) e 570–610 nm (vermelho). As imagens foram preparadas utilizando-se os programas Examiner 4.2 e Adobe Photoshop 9.2, sendo a análise da sobreposição das imagens realizada no mesmo plano focal.

Detecção de EROs - As células HaCaT foram cultivadas conforme descrito anteriormente e após 72 h, as células foram tratadas com 1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H₂O₂. A sonda DCFDA (1 μmol/L) foi adicionada à cultura celular 1 h antes do término do tratamento e, ao final, as células foram lavadas vigorosamente com PBS e os núcleos foram corados com 10 μg/mL de Hoechst. O DCFDA foi excitado com laser Ar 488 nm e a emissão capturada no intervalo 500–550 nm. Para o corante Hoechst foi utilizado o laser multifóton TiSa 740 nm, com excitação em 370 nm e emissão no intervalo de 410–460 nm. As células controles foram incubadas somente com a sonda DCFDA e meio de cultura. As imagens foram preparadas utilizando-se os programas Examiner 4.2 e Adobe Photoshop 9.2, sendo a análise da sobreposição das imagens realizada no mesmo plano focal.

Avaliação da localização intracelular de AIF e citocromo c - As células HaCaT foram cultivadas conforme descrito anteriormente e após exposição aos diferentes tipos de estresse, as células foram lavadas com PBS-Ca²⁺ e, a seguir, com PBS/glicina 0,01 mol/L. As células foram incubadas com 2 μg/mL de MitoTracker Deep Red por 30 min a temperatura ambiente e ausência de luz.

Após este período, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 2% em PBS gelado por 40 min e permeabilizadas com PBS contendo 0,01% de saponina por 30 min. Após lavagens sucessivas com PBS, as células foram incubadas por 2 h com os anticorpos primários específicos anti-AIF (1:1000) ou anti-citocromo *c* (1:1000), a temperatura ambiente e protegidas da luz. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 h com anticorpos secundários específicos conjugados com Alexa Fluor-488, na diluição de 1:500, a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após lavagem com PBS, os núcleos foram corados com 2 µg/mL de DAPI por 40 min. Para obtenção das imagens, as células foram lavadas com PBS e as lamínulas montadas com Fluoromount G. As células foram analisadas em microscópio confocal invertido de varredura a laser LSM 510 META. Os seguintes lasers e condições de excitação e emissão foram utilizados para os diferentes fluoróforos: Alexa Fluor-488: laser Ar 488 nm e emissão em 500–550 nm; MitoTracker Deep Red: laser HeNe 633 nm e emissão em 640–680 nm; DAPI: multifóton TiSa 740 nm, com emissão em 410–460 nm. As imagens foram preparadas utilizando-se os programas Examiner 4.2 e Adobe Photoshop 9.2, sendo a análise da sobreposição das imagens realizada no mesmo plano focal.

Marcação dos filamentos de actina, cofilina e catepsina B - Células HaCaT foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços e submetidas aos diferentes tipos de estresse conforme descrito anteriormente. As células foram lavadas com PBS-Ca²⁺, fixadas com paraformaldeído 2% em PBS gelado por

30 min e permeabilizadas com PBS contendo 0,1% de saponina e 1% de BSA por 15 min. As células foram, então, incubadas com 10 µg/mL de faloidina-Alexa Fluor-488 e, a seguir, incubadas por 1 h com anticorpo anti-cofilina (1:500) ou anti-catepsina B (1:50). Posteriormente, as células foram incubadas por 30 min, a temperatura ambiente e na ausência de luz, com os anticorpos secundários específicos conjugados com Alexa Fluor-594 (cofilina) e Alexa Fluor-647 (catepsina B) diluídos 1:500. Após lavagem com PBS, os núcleos foram corados com 20 µg/mL de DAPI por 40 min. As células foram lavadas com PBS e as lamínulas montadas com Fluoromount G. A análise das células foi realizada em microscópio confocal invertido de varredura a laser LSM 510 META, utilizando-se as seguintes condições: faloidina: laser Ar 488 nm e emissão em 500–550 nm; cofilina: laser HeNe 546 nm e emissão em 560–590 nm; catepsina B: laser CrAr 647 nm e emissão detectada com filtro de barreira a 665 nm; DAPI: multifóton TiSa 740 nm com excitação em aproximadamente 370 nm e emissão em 410–460 nm. As imagens foram preparadas utilizando-se os programas Examiner 4.2 e Adobe Photoshop 9.2, sendo a análise da sobreposição das imagens realizada no mesmo plano focal.

3.2.11. Análise do perfil quinásico de células HaCaT expostas ao estresse hiperosmótico e oxidativo empregando-se o PepChip

Os slides do PepChip com dimensões de 25x75 mm e subdivididos em 3 sets contendo 1.024 peptídeos sintetizados quimicamente, foram utilizados para

avaliação de quinases ativas presentes nos lisados celulares em estudo. Após exposição aos agentes estressores, 1×10^7 células foram lavadas com PBS gelado e lisadas com 200 μ L de tampão de lise [HEPES 20 mmol/L, pH 7,7; $MgCl_2$ 2,5 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; EGTA 1 mmol/L; *p*-nitrofenilfosfato 20 mmol/L; *o*-vanadato 1 mmol/L; DTT 1 mmol/L; PMSF 1 mmol/L; aprotinina 10 μ g/mL; leupeptina 10 μ g/mL]. O lisado foi centrifugado a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) a 4°C por 10 min e, em seguida, filtrado em membrana de 0,22 μ m. O filtrado (50 μ L) juntamente com 10 μ L do meio de reação para as proteínas quinases [ATP($^{33}P\gamma$) 2.000 μ Ci/mL, ATP 50 μ mol/L, glicerol 50%, Brij-35 3%, albumina 0,25 mg/mL, $MgSO_4$ 60 mmol/L] foram colocados sobre o slide. Após o tempo de reação de 90 min, os slides foram lavados com as seguintes soluções: NaCl 2 mol/L/Triton X-100 1%, PBS/Triton X-100 1% e água deionizada. Os slides foram secos ao ar e expostos em cassete específico (*phosphoscreen*) por 72 h. Após este período, o filme foi escaneado e a imagem analisada para obtenção da intensidade dos spots (radioatividade). A análise comparativa entre os grupos controle e estresse oxidativo ou choque hiperosmótico foi realizada com o auxílio do programa ScanAlyse disponibilizado pela PepScan.

Análise dos dados obtidos no PepChip - Os arquivos DAT gerados pelo aplicativo ScanAlyze, após alinhamento do grid e otimização da localização dos spots, foram submetidos à metodologia PepMatrix (Milani et al, 2010), desenvolvida para análise estatística qualitativa das replicatas de cada chip, pelo

grupo coordenado pelo Prof. Eduardo Galembeck (Departamento de Bioquímica/UNICAMP). A metodologia envolve três conceitos agrupados em dois índices: desvio padrão (SD), média (A) e mediana (M), sendo que um dos índices é composto pela razão SD/A e o outro pela razão A/M. Os parâmetros utilizados para os índices foram: $SD/A < 50\%$ e $80\% < A/M < 120\%$, buscando selecionar apenas os spots que apresentaram variações entre as replicatas dentro desses limites, para os dois chips. Após a seleção, foi calculado o *Fold-Change* (definido como a razão entre as médias ou medianas de intensidade de cada spot do tratamento em relação aos spots do controle); o Teste F, de modo a determinar se as variâncias entre as amostras eram comparáveis e o Teste t apropriado em relação às variâncias de cada amostra (homoscedástico para variâncias semelhantes e heteroscedástico para variâncias diferentes). A partir do Teste t foram selecionados os spots que apresentaram diferença significativa no valor da média ($p < 0,05$) e procedeu-se à análise dos substratos e quinases correspondentes.

3.2.12. Avaliação da atividade de LMWPTP

Após exposição aos diferentes tipos de estresse, as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão específico (50 mmol/L HEPES, pH 7,5, 150 mmol/L NaCl, 1,5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L EGTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 1 $\mu g/mL$ leupeptina e 1 $\mu g/mL$ aprotinina) por 2 h a 4°C. A seguir, o extrato foi clarificado por centrifugação a 14.000 rpm (centrífuga

Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) por 15 min e a concentração de proteína determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi incubado com anticorpo específico para LMWPTP e Protein A-Sepharose (proporção de 3 μ L de anticorpo e 50 μ L de *beads* para cada 1 mL de lisado) para imunoprecipitação. Após 1 h de incubação a 4°C sob agitação constante, os imunocomplexos foram centrifugados a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) por 5 min a 4°C e ressuspensos em tampão HNTG gelado (20 mmol/L HEPES, pH 7,5, 150 mmol/L NaCl, 10% glicerol e 0,1% Triton X-100). Os imunocomplexos foram lavados 2 vezes com tampão HNTG e 2 vezes com tampão acetato 0,1 mol/L. A seguir, a atividade de LMWPTP foi analisada empregando-se o kit *Protein Tyrosine Phosphatase Assay* PTP-101, segundo instruções do fabricante (Sigma Chemical Co.). A atividade fosfatásica foi determinada em meio de reação contendo 0,25 mmol/L de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) fosforilado como substrato. A liberação de fosfato inorgânico foi determinada colorimetricamente após 30 min de incubação pela leitura da absorbância em 620 nm, que corresponde ao complexo fosfato/molibdato de amônio-verde malaquita. Os resultados foram calculados em pmol de PO_4^{3-} /min/mg de proteína e expressos em relação ao controle (100%). As células controle foram tratadas somente com meio de cultura. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes conduzidos em duplicata.

3.2.13. *Western blotting*

Após os diferentes tratamentos, 3×10^7 células foram lisadas com tampão de lise [Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,4; Tween 20 1%; desoxicolato de sódio 0,25%; NaCl 150 mmol/L; EGTA 1 mmol/L; *o*-vanadato 1 mmol/L; NaF 1 mmol/L; aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; PMSF 1 mmol/L] em banho de gelo por 2 h. A seguir, o extrato foi clarificado por centrifugação a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) por 5 min e a concentração de proteína determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado tampão de amostra na proporção de 1:1 [Tris-HCl 100 mmol/L, pH 6,8; DTT 200 mmol/L; SDS 4%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 20%]. As amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida (10%) contendo SDS (SDS-PAGE). A seguir, as amostras foram transferidas para membranas de *polyvinylidene difluoride* (PVDF), as quais foram bloqueadas com leite desnatado 2,5%, preparado em tampão Tris salino (TBS) contendo 0,05% de Tween 20 (TBST), por 2 h. As membranas foram, então, incubadas *overnight* com os anticorpos primários diluídos 1:1000 em TBST contendo BSA 2,5% (TBST/BSA). As membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários 1:2500 em TBST/BSA por 2 h. As membranas foram lavadas com TBS e analisadas por quimioluminescência (ECL). As bandas obtidas em três experimentos independentes foram quantificadas por densitometria empregando-se o programa *Scion Image* e os

resultados foram representados relativos ao controle (atribuído valor 1) como média \pm desvio padrão.

3.2.14. Zimografia

Após exposição das células ao estresse hiperosmótico e oxidativo, o meio de cultura foi coletado, centrifugado a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) por 15 min e o sobrenadante concentrado em tubos Centricon Plus-20 (membrana Ultracel-PL, 10.000 kDa; Millipore). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) e as amostras armazenadas a -20°C . A atividade gelatinolítica foi avaliada pelo fracionamento das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) em gel de poliacrilamida 12% contendo 4% de gelatina. Após o fracionamento, os géis foram lavados em solução aquosa de Triton X-100 (2% m/v) para renaturação das enzimas e incubados por 18 h em tampão de proteólise (Tris- CaCl_2) a 37°C . Os géis foram corados com solução contendo corante *Coomassie Blue* R-250 por 3 h. A seguir, os géis foram descorados e fixados com solução contendo 50% de metanol e 5% de glicerol (Shapiro et al., 2001). As bandas obtidas em três experimentos independentes foram quantificadas por densitometria empregando-se o programa *Scion Image* e os resultados foram representados relativos ao controle (atribuído valor 1) como média \pm desvio padrão.

3.2.15. Análise estatística

A ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi verificada empregando-se análise de variância (ANOVA). Nos casos em que a diferença estatística foi significativa, o teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças mínimas existentes entre todos os grupos. Diferenças estatísticas entre 2 grupos foram avaliadas pelo teste *t*-Student. Em todas as medidas o α foi de 5% bicaudal, ou seja, significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Curva de crescimento celular

O tempo de duplicação de células da linhagem de queratinócitos humanos HaCaT foi determinado a partir da curva de crescimento celular. Os resultados apresentados na Figura 7 demonstraram que o tempo de duplicação das células HaCaT é de aproximadamente 22 h nas condições experimentais utilizadas, mantendo crescimento exponencial durante as primeiras 96 h de cultura.

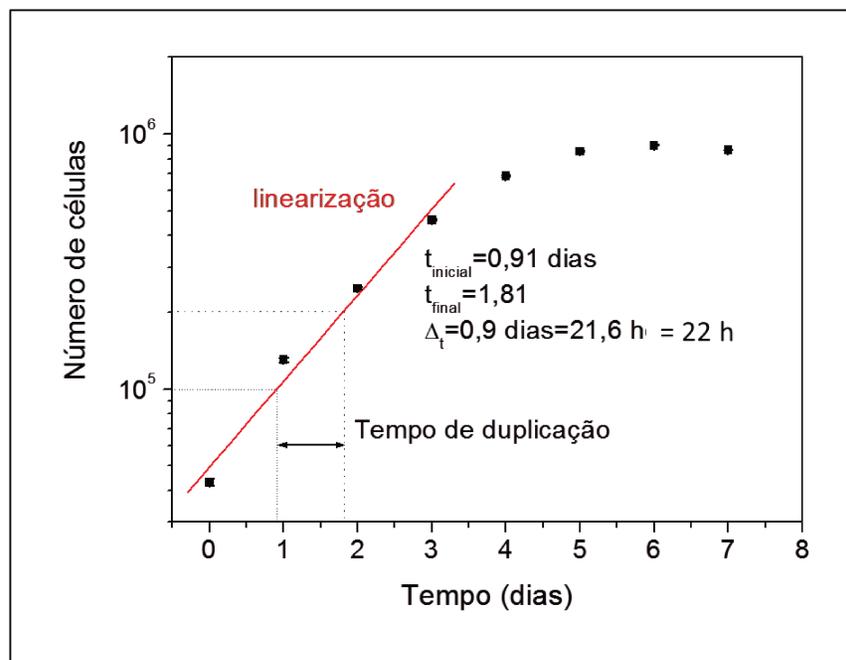


Figura 7: Curva de crescimento de queratinócitos humanos da linhagem HaCaT. Células HaCaT ($4,3 \times 10^4$ por poço) foram plaqueadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos e incubadas por 7 dias em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO_2 . A fixação do ponto zero foi realizada 5 h após o plaqueamento e a proliferação celular foi determinada pela quantificação de ácidos nucleicos em intervalos de 24 h. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

4.2. Exposição das células HaCaT ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo

Para avaliação dos efeitos do choque hiperosmótico e estresse oxidativo sobre a viabilidade celular, células HaCaT foram expostas a diferentes concentrações de sorbitol (0,2–2 mol/L) e H₂O₂ (0,1–4 mmol/L) por diferentes tempos de incubação (1, 2 e 4 h). Os resultados demonstraram que em ambos os modelos experimentais ocorreu significativa redução da viabilidade celular de maneira tempo e dose-dependente (Figs. 8A e B).

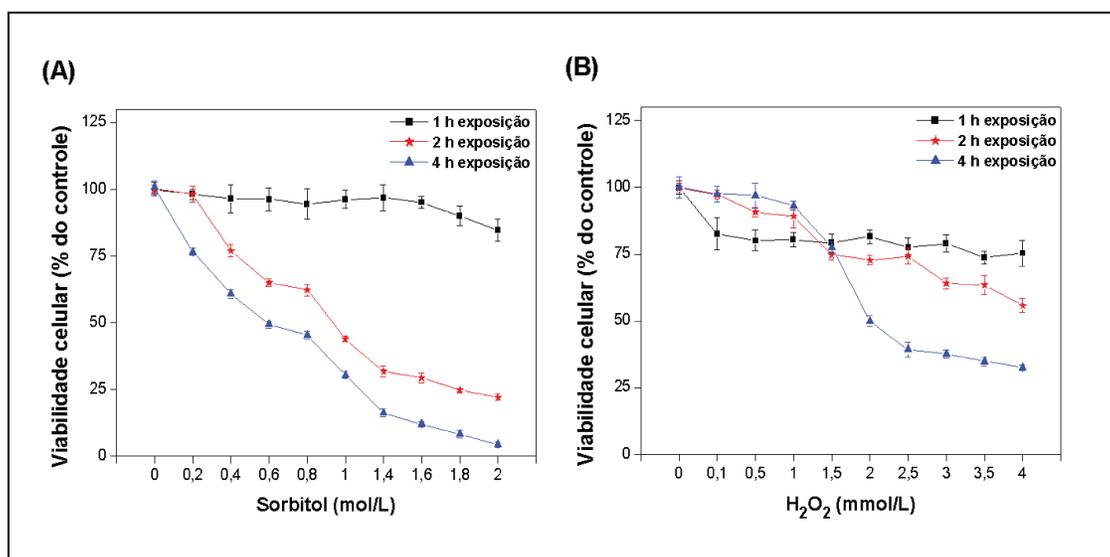


Figura 8: Efeitos do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo sobre a viabilidade de células HaCaT. Células HaCaT ($3,5 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 72 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações de sorbitol (A) e de H₂O₂ (B) por 1, 2 e 4 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Resultados representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata.

A partir das curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de redução do MTT, incorporação do corante vermelho neutro (NRU) e quantificação de ácidos nucleicos (NAC), os valores aproximados de IC₅₀ calculados foram de 1 mol/L para

o sorbitol e 2 mmol/L para o tratamento com H_2O_2 nos períodos correspondentes a 2 e 4 h de exposição respectivamente (Figs. 9A e B).

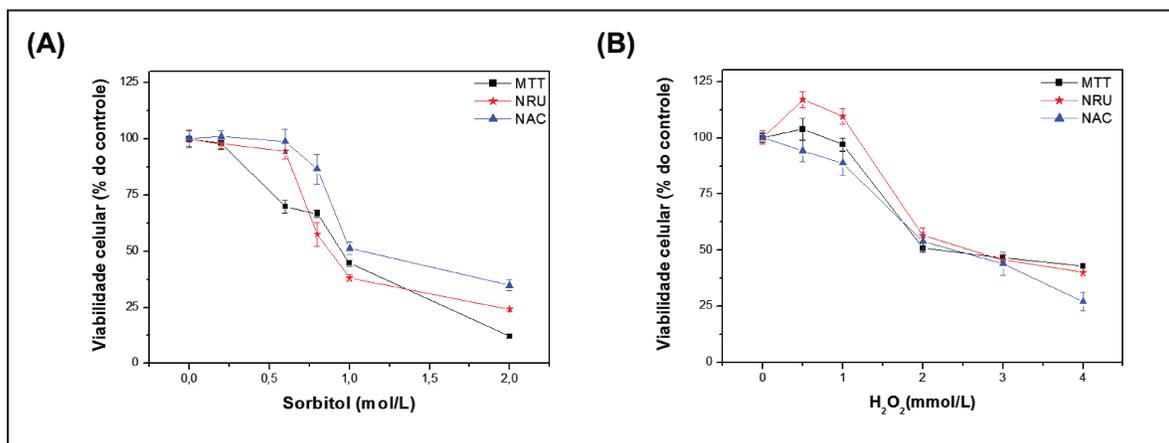


Figura 9: Análise da viabilidade de células HaCaT submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo por 2 e 4 h respectivamente. Células HaCaT ($3,5 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 72 h a $37^\circ C$ e 5% de CO_2 . As células foram tratadas com diferentes concentrações de sorbitol (A) e de H_2O_2 (B) por 2 e 4 h respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT, captação do vermelho neutro (NRU) e quantificação de ácidos nucleicos (NAC). Resultados representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata.

4.3. Avaliação da capacidade de recuperação das células HaCaT após exposição ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo

A fim de avaliar a capacidade de recuperação dos queratinócitos após exposição aos estresses, as células HaCaT foram tratadas com diferentes concentrações de sorbitol ou H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente, e a viabilidade celular foi analisada imediatamente após o estresse e após 3 e 24 h de recuperação. Os resultados apresentados nas Figuras 10A e B demonstraram que não houve recuperação das células submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo nos períodos avaliados, indicando que os danos causados pelos agentes estressores são irreversíveis.

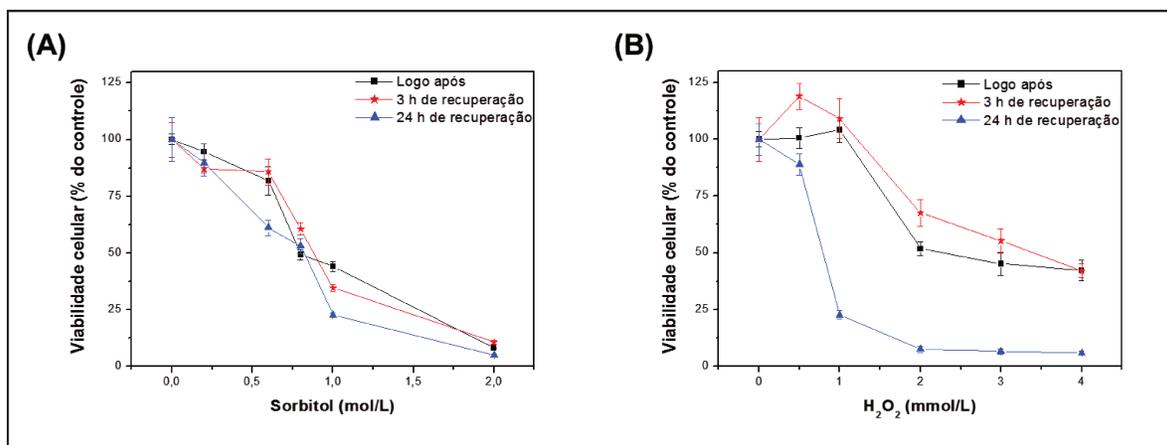


Figura 10: Viabilidade de queratinócitos humanos expostos ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo após diferentes tempos de recuperação. Células HaCaT ($3,5 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 72 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram expostas a diferentes concentrações de sorbitol (A) e de H₂O₂ (B) por 2 e 4 h respectivamente. Após o estresse, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 3 e 24 h em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Resultados representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata.

Diante dos resultados apresentados no experimento anterior, o efeito da exposição aos diferentes tipos de estresse na cinética do crescimento celular foi avaliado. As concentrações utilizadas foram referentes aos valores de IC₅₀ determinados nas curvas dose-resposta, sendo 1 mol/L para o sorbitol e 2 mmol/L para o H₂O₂. Os resultados representados nas Figuras 11A e B corroboram com os dados analisados anteriormente para o período de 24 h de recuperação. Adicionalmente, os resultados obtidos revelaram expressiva redução na proliferação das células expostas aos diferentes tipos de estresse em períodos de recuperação superiores a 24 h, comprovando que os danos causados pela exposição aos agentes estressores são irreversíveis (Figs. 11A e B).

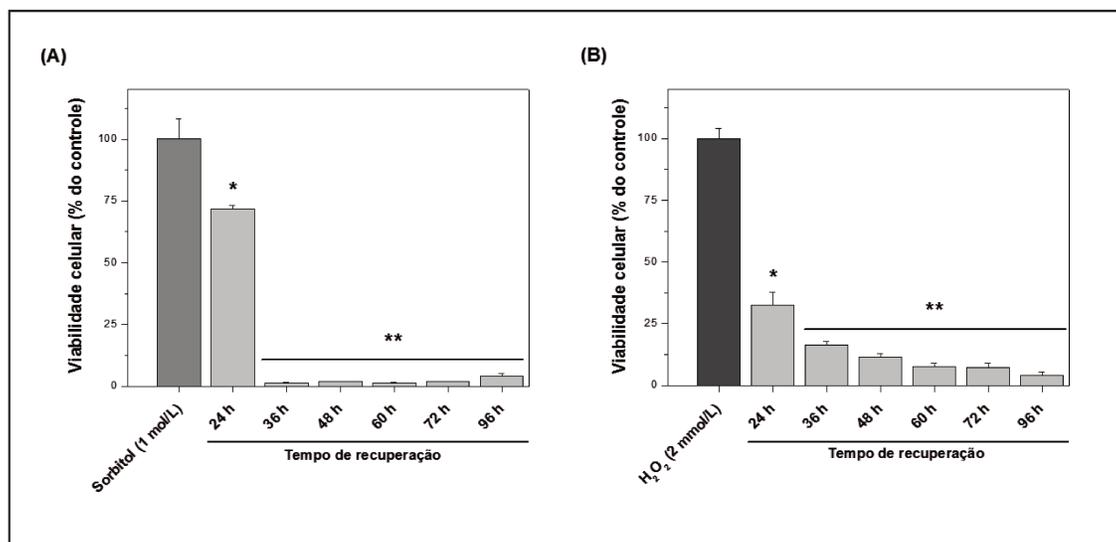


Figura 11: Curva de crescimento de células HaCaT após exposição ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo. Células HaCaT ($4,3 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 72 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com 1 mol/L de sorbitol (A) e 2 mmol/L de H₂O₂ (B) por 2 e 4 h respectivamente e os ácidos nucleicos foram quantificados espectrofotometricamente logo após o estresse (ponto zero), e nas 24, 36, 48, 60, 72 e 96 h de recuperação em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos. A proliferação relativa foi calculada como percentual da variação da absorbância em 260 nm em relação ao ponto zero (100%). Resultados representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *p < 0,005 em relação ao ponto zero; **p < 0,001 em relação ao ponto zero e 24 h de recuperação (ANOVA, teste de Tukey).

4.4. Avaliação da morte celular

Para determinação dos mecanismos moleculares envolvidos na morte de células HaCaT submetidas aos dois tipos de estresse foram realizados diferentes ensaios morfológicos e bioquímicos.

4.4.1. Alterações morfológicas induzidas pelo estresse em células HaCaT

As células HaCaT foram incubadas com sondas específicas para avaliação de alterações na membrana plasmática (WGA), núcleo (Hoechst) e mitocôndrias (MitoTracker Green), submetidas ao tratamento com 1 mol/L de sorbitol e

2 mmol/L de H₂O₂ por 2 e 4 h respectivamente e analisadas por microscopia confocal.

Conforme esperado, a morfologia das células imediatamente antes do tratamento (controle) apresenta características normais, com adesão intercelular e distribuição das mitocôndrias na região perinuclear (Fig. 12A). Após 4 h de tratamento com H₂O₂, foi possível observar discretas alterações na distribuição mitocondrial e na membrana plasmática. Contudo, a análise da imagem das células expostas ao choque hiperosmótico revelou uma diminuição na intensidade de fluorescência mitocondrial (Fig.12A). Além disso, foi possível observar na aquisição das imagens em diferentes tempos durante a exposição ao estresse (não mostrado), uma tendência ao aparecimento de fluorescência difusa para esta organela, indicando reorganização da rede mitocondrial. Adicionalmente, pode-se observar na Figura 12A, a perda do contato célula-célula, tanto após a exposição ao choque hiperosmótico como ao estresse oxidativo.

Classicamente a morte apoptótica é considerada a principal forma de eliminação celular, embora, atualmente, o papel de outros tipos de morte celular programada em diferentes condições fisiológicas ou induzidas por agentes externos tem recebido destaque (Golstein e Kroemer, 2007). Além da redução no volume celular e perda do contato com as células vizinhas, outras características morfológicas apresentadas pelas células apoptóticas são alterações na forma, disposição e composição da membrana plasmática. Células em apoptose, na maioria das vezes, perdem a assimetria da membrana plasmática, expondo o fosfolípido fosfatidilserina em sua face externa (Taylor et al., 2008). Portanto, a

externalização da fosfatidilserina nas células HaCaT expostas aos agentes estressores foi avaliada empregando-se anexina V-APC e WGA-594.

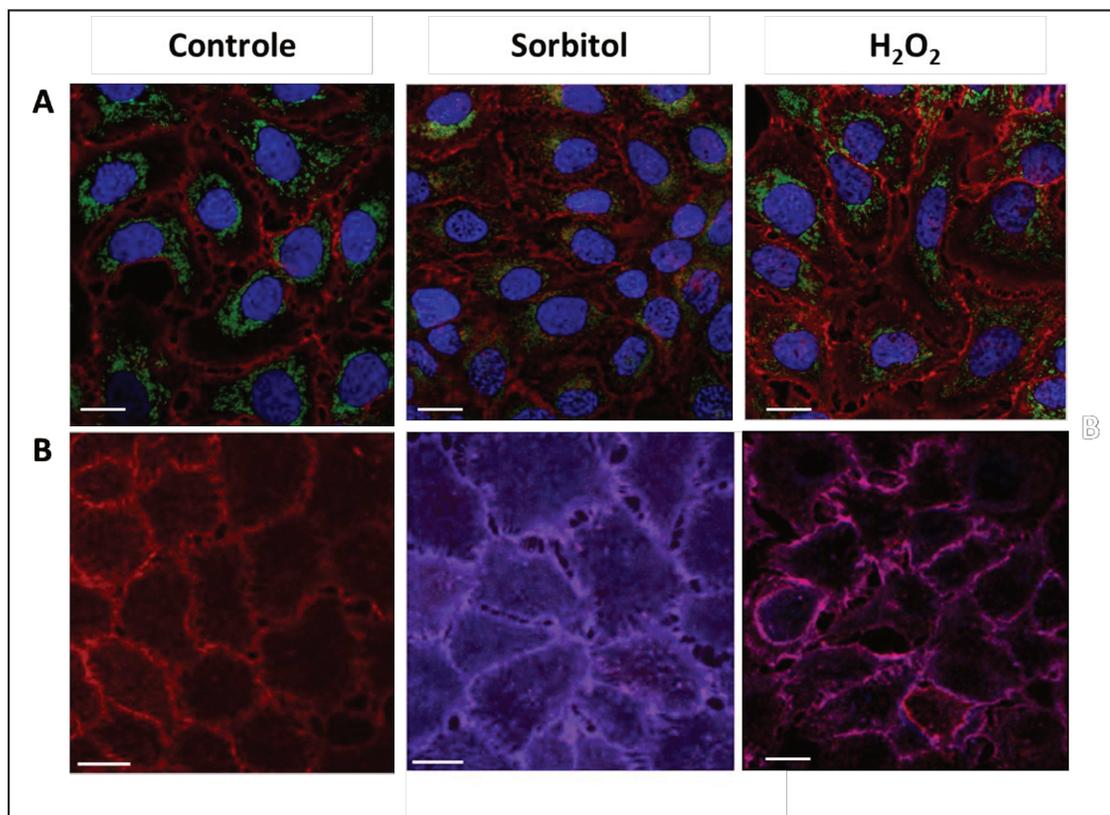


Figura 12: Alterações morfológicas induzidas pelo choque hiperosmótico e estresse oxidativo em células HaCaT. Células HaCaT foram tratadas com 1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H₂O₂ por 2 e 4 h respectivamente. **(A)** Alterações na membrana celular (vermelho), na mitocôndria (verde) e no núcleo (azul) foram analisadas por microscopia confocal como descrito em detalhes em “Material e Métodos”. **(B)** Para se avaliar a translocação da fosfatidilserina, as células foram incubadas com WGA-Alexa Fluor-594 (vermelho) e tratadas com os agentes estressores (1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H₂O₂) na presença de anexina V-APC (azul) por 2 e 4 h respectivamente. Barra = 20 μm. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

Os resultados apresentados na Figura 12B apontam um aumento significativo na intensidade de fluorescência da anexina V-APC, indicando exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática e sugerindo a indução de apoptose pelos dois tipos de estresse.

4.4.2. Análise de morte celular por citometria de fluxo após marcação das células com Anexina V-FITC/PI

Diante dos resultados obtidos no experimento anterior, o tipo de morte celular foi estudado por citometria de fluxo após dupla marcação com anexina V-FITC (An) e iodeto de propídeo (PI). Para isso, células HaCaT foram expostas a diferentes concentrações de sorbitol por 1,5 e 2 h e H_2O_2 por 2 e 4 h. As células viáveis (An^-Pi^-), em apoptose (An^+Pi^-), apoptose tardia (An^+Pi^+) e necrose (An^-Pi^+) foram determinadas por citometria de fluxo (Figs. 13 e 14).

Os resultados para o tratamento das células com sorbitol por 1,5 h demonstraram que não houve diferenças significativas entre as porcentagens de células viáveis, em necrose, apoptose e apoptose tardia, quando são comparadas as concentrações de 0,4 e 1 mol/L de sorbitol (Fig. 13A). Neste período, ambas as concentrações de sorbitol causaram aumento estatisticamente significativo nas populações de células em apoptose e apoptose tardia em relação ao controle, sendo proporcional à diminuição da população de células viáveis. Adicionalmente, não houve aumento do número de células necróticas em relação às células controle (Fig. 13A). Em contraste, a exposição das células HaCaT a 1 mol/L de sorbitol por um maior período de tempo (2 h) apresentou diferenças significativas nas proporções de células viáveis e em necrose (Fig. 13B). Além disso, significativa elevação na porcentagem de células em necrose e diminuição das células viáveis também foram obtidas em relação ao tratamento com 0,4 mol/L pelo mesmo período de tempo (Fig. 13B). No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre os tempos de tratamento com 0,4 mol/L de sorbitol

(Figs. 13A e B). Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a morte celular provocada pelo estresse hiperosmótico é tempo e dose-dependente, progredindo para a necrose com o aumento da concentração de sorbitol e do tempo de tratamento.

Diferentemente da exposição das células HaCaT ao sorbitol, o efeito dose-dependente resultante da exposição das células HaCaT ao H_2O_2 foi observado logo no menor tempo de tratamento das células (Fig. 14). Uma redução significativa na população de células viáveis simultaneamente a um aumento na proporção de células em apoptose tardia e em necrose foram observados após 2 h de tratamento com 2 mmol/L de H_2O_2 em relação ao controle e à concentração de 1,2 mmol/L (Fig. 14A).

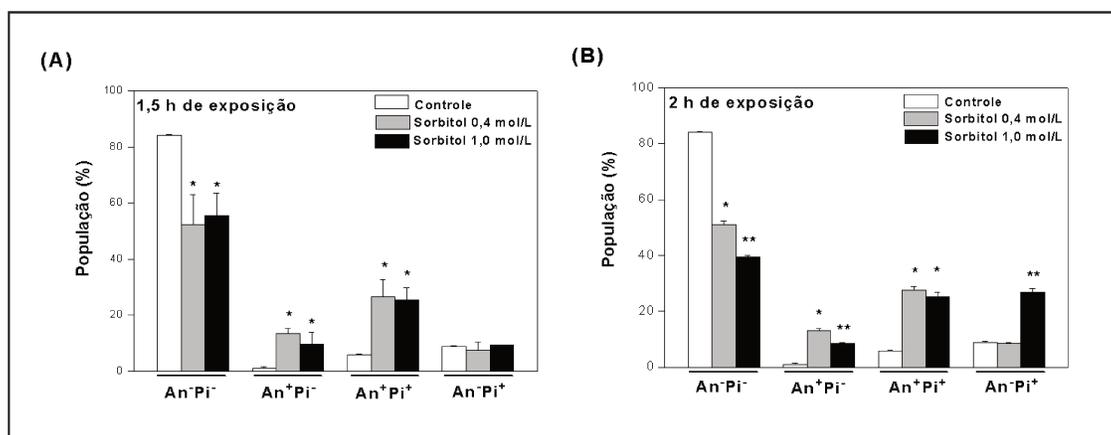


Figura 13: Indução de apoptose e necrose em células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico. Após tratamento das células HaCaT com 0,4 ou 1 mol/L de sorbitol por 1,5 e 2 h, as populações de células viáveis (An⁻Pi⁻) e com marcação positiva para anexina V-FITC (An⁺) (células em apoptose), iodeto de propídeo (Pi⁺) (células em necrose) e dupla marcação (An⁺Pi⁺) (células em apoptose tardia) foram analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. *p < 0,05 em relação ao controle; **p < 0,05 em relação ao controle e a 0,4 mol/L de sorbitol (ANOVA, teste de Tukey).

Os resultados obtidos para a exposição dos queratinócitos ao H_2O_2 por 4 h demonstraram uma redução de aproximadamente 90% na viabilidade das células expostas a ambas as concentrações (Fig. 14B). Este efeito foi acompanhado de um aumento proporcional nas populações de células em apoptose e apoptose tardia, as quais passam a constituir a condição celular predominante neste período. É interessante notar que as diferenças entre os efeitos das duas concentrações de H_2O_2 utilizadas no tratamento de 4 h se restringem aos compartimentos de células em apoptose e em apoptose tardia, ou seja, há uma redução na proporção de células em apoptose concomitante a um aumento na proporção de células em apoptose tardia após tratamento com 2 mmol/L comparado à 1,2 mmol/L de H_2O_2 (Fig. 14B). Portanto, apesar dos efeitos do estresse oxidativo e choque hiperosmótico serem tempo e concentração-dependente, ao longo do tempo prevalecem tipos de morte celular diferentes entre eles. A exposição das células ao estresse hiperosmótico produz um acentuado número de células em apoptose e apoptose tardia após 1,5 h de tratamento, as quais progridem para necrose com o aumento do tempo de exposição a 1 mol/L de sorbitol. Por outro lado, os resultados sugerem que o estresse oxidativo é capaz de induzir necrose celular no início do tratamento, havendo elevação do número de células em apoptose e apoptose tardia com o aumento do tempo de exposição.

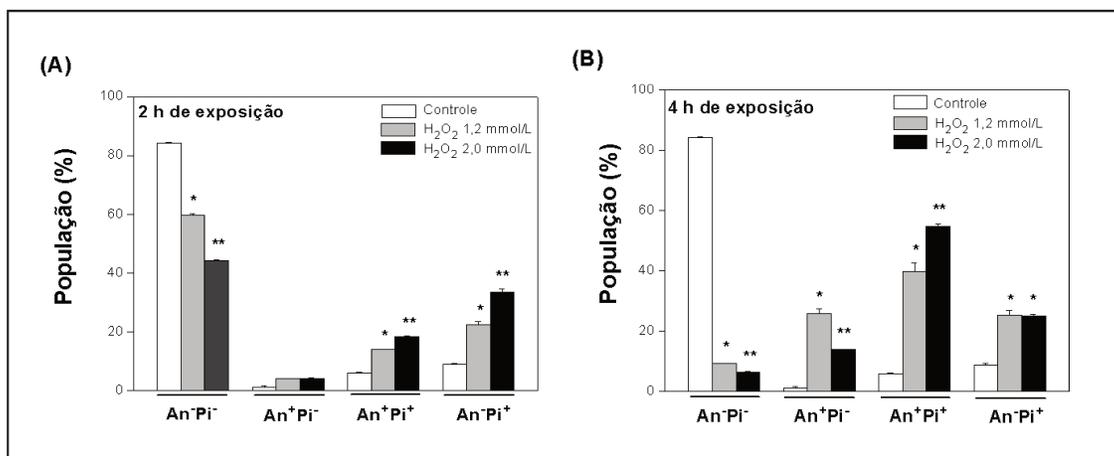


Figura 14: Indução de apoptose e necrose em células HaCaT expostas ao estresse oxidativo. Após tratamento das células HaCaT com 1,2 ou 2 mmol/L de H₂O₂ por 2 e 4 h, as populações de células viáveis (An⁻Pi⁻) e com marcação positiva para anexina V-FITC (An⁺) (células em apoptose), iodeto de propídeo (Pi⁺) (células em necrose) e dupla marcação (An⁺Pi⁺) (células em apoptose tardia) foram analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram representados como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. *p < 0,05 em relação ao controle; **p < 0,05 em relação ao controle e a 1,2 mmol/L de H₂O₂ (ANOVA, teste de Tukey).

4.4.3. Avaliação da integridade da membrana plasmática pela atividade da LDH

A integridade da membrana plasmática das células HaCaT foi avaliada pela quantificação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), após exposição dos queratinócitos aos diferentes tipos de estresse. Os resultados obtidos demonstraram o aumento de aproximadamente sete vezes na atividade da LDH presente no sobrenadante de culturas de células expostas ao sorbitol, enquanto nenhuma alteração significativa foi detectada na atividade da LDH no sobrenadante de células expostas ao H₂O₂ (Fig. 15). Estes resultados são consistentes com aqueles obtidos na análise por citometria de fluxo, sugerindo perda significativa da integridade da membrana plasmática após exposição dos

queratinócitos ao sorbitol, enquanto que a membrana plasmática das células expostas ao H_2O_2 tende a permanecer íntegra após o estresse.

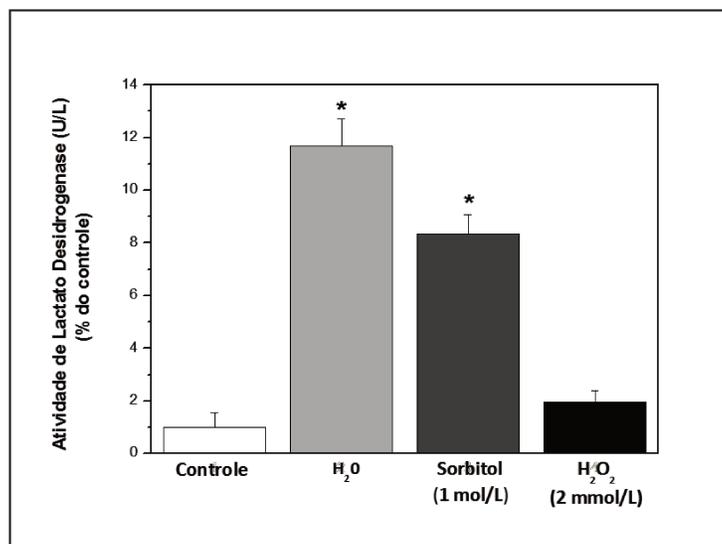


Figura 15: Integridade da membrana plasmática de queratinócitos expostos ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo. A atividade da LDH presente no sobrenadante das culturas de células foi determinada após tratamento dos queratinócitos com 1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 h e 4 h respectivamente. A atividade da LDH foi determinada colorimetricamente como descrito em “Material e Métodos”. Água deionizada foi utilizada como controle positivo do experimento. Os resultados foram expressos em relação ao controle (atribuído valor 1) e representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em quintuplicata. * $p < 0,001$ em relação ao controle (ANOVA, teste de Tukey).

4.4.4. Ativação de caspases em células HaCaT submetidas ao estresse

Para avaliação dos efeitos dos agentes estressores sobre a atividade das caspases 8, 3 e 9, as células HaCaT foram expostas ao sorbitol (0,4 e 1 mol/L) por 2 h e ao H_2O_2 (1,2 e 2 mmol/L) por 4 h. Posteriormente, a atividade das caspases iniciadoras 8 e 9 e da caspase executora 3 foram quantificadas colorimetricamente. Aumentos de aproximadamente 4, 7 e 2 vezes nos níveis de atividade das caspase 8, 3 e 9 respectivamente, foram observados em células expostas ao sorbitol quando comparadas ao controle (Fig. 16A). Além disso, a atividade da caspase 3 foi confirmada pela citometria de fluxo (Fig. 16B).

Os efeitos da exposição das células ao H_2O_2 sobre a atividade das caspases 8, 3 e 9 estão representados na Figura 17A. Os resultados demonstraram ativação das caspases 8 e 3 e nenhuma alteração na atividade da caspase 9. Da mesma forma que observado para o sorbitol, os resultados obtidos na citometria de fluxo confirmaram a participação da caspase 3 no processo de morte celular (Fig. 17B).

4.4.5. Avaliação da expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas em células HaCaT expostas ao estresse

Devido ao fato das células possuírem diferentes mecanismos de defesa capazes de proteger a integridade da membrana mitocondrial e inibir caspases, mesmo após seu processamento e ativação, a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas foi estudada em células HaCaT submetidas aos tratamentos com 1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente. Os resultados obtidos para a expressão de proteínas da família Bcl-2, incluindo Bax, Bcl- X_L e Bcl-2, demonstraram uma discreta diminuição na razão Bax/Bcl-2 nas células expostas ao sorbitol e aumento significativo ($p < 0,05$) nas células tratadas com H_2O_2 (Fig. 18A). Além disso, os níveis de Bcl- X_L , membro anti-apoptótico da família Bcl-2, também seguiu o mesmo perfil, aumentando nas células submetidas ao estresse hiperosmótico e diminuindo significativamente ($p < 0,001$) após tratamento com H_2O_2 (Fig. 18A).

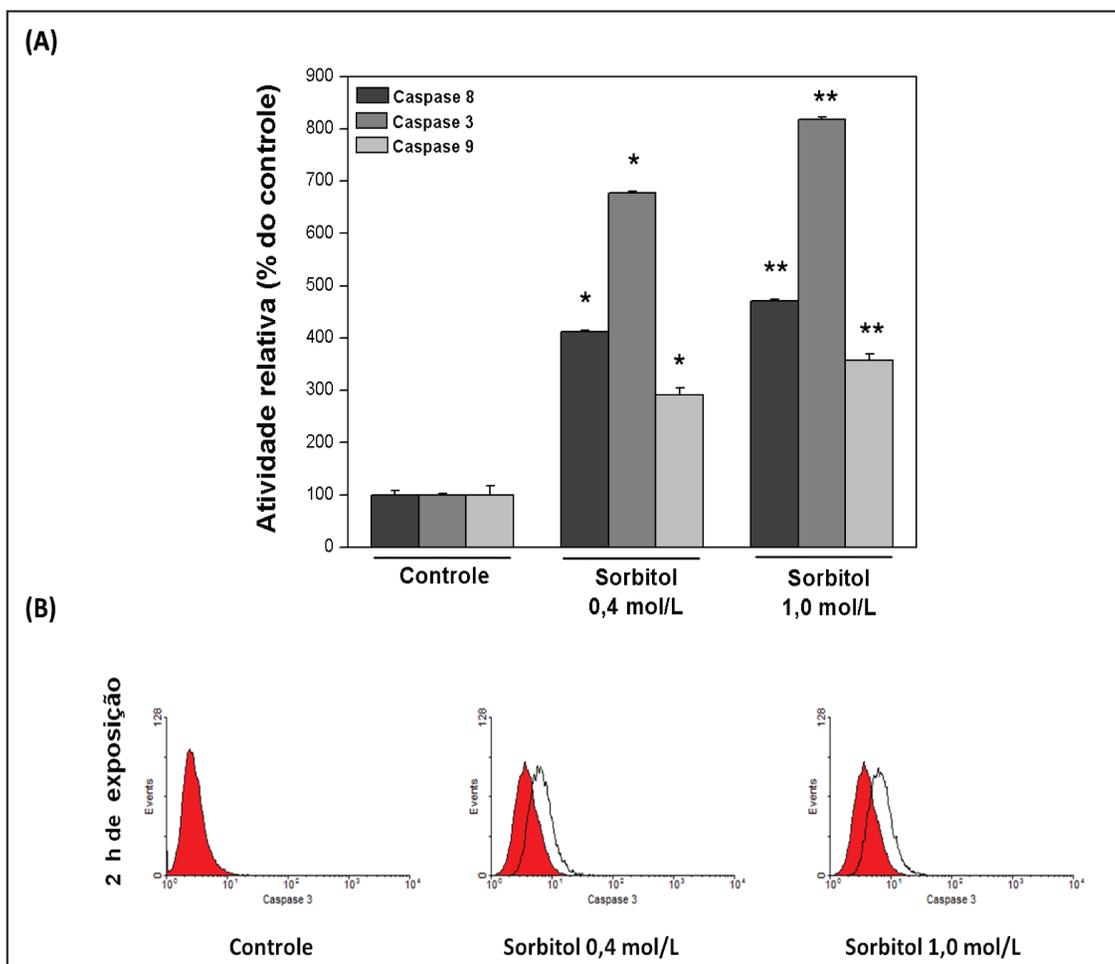


Figura 16: Alterações na atividade das caspases 8, 3 e 9 em células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico. Após exposição das células ao sorbitol (0,4 ou 1,0 mol/L) por 2 h, as células foram lavadas e a atividade proteolítica foi determinada colorimetricamente **(A)** e por citometria de fluxo **(B)**. Os histogramas preenchidos em vermelho representam as células controle e os histogramas sem preenchimento correspondem às células expostas ao sorbitol. Resultados de citometria representativos de 2 experimentos independentes. Os resultados em (A) foram expressos em relação ao controle (100%) e representam média \pm desvio padrão da triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle; ** $p < 0,01$ em relação ao controle e a 0,4 mol/L de sorbitol (ANOVA, teste de Tukey).

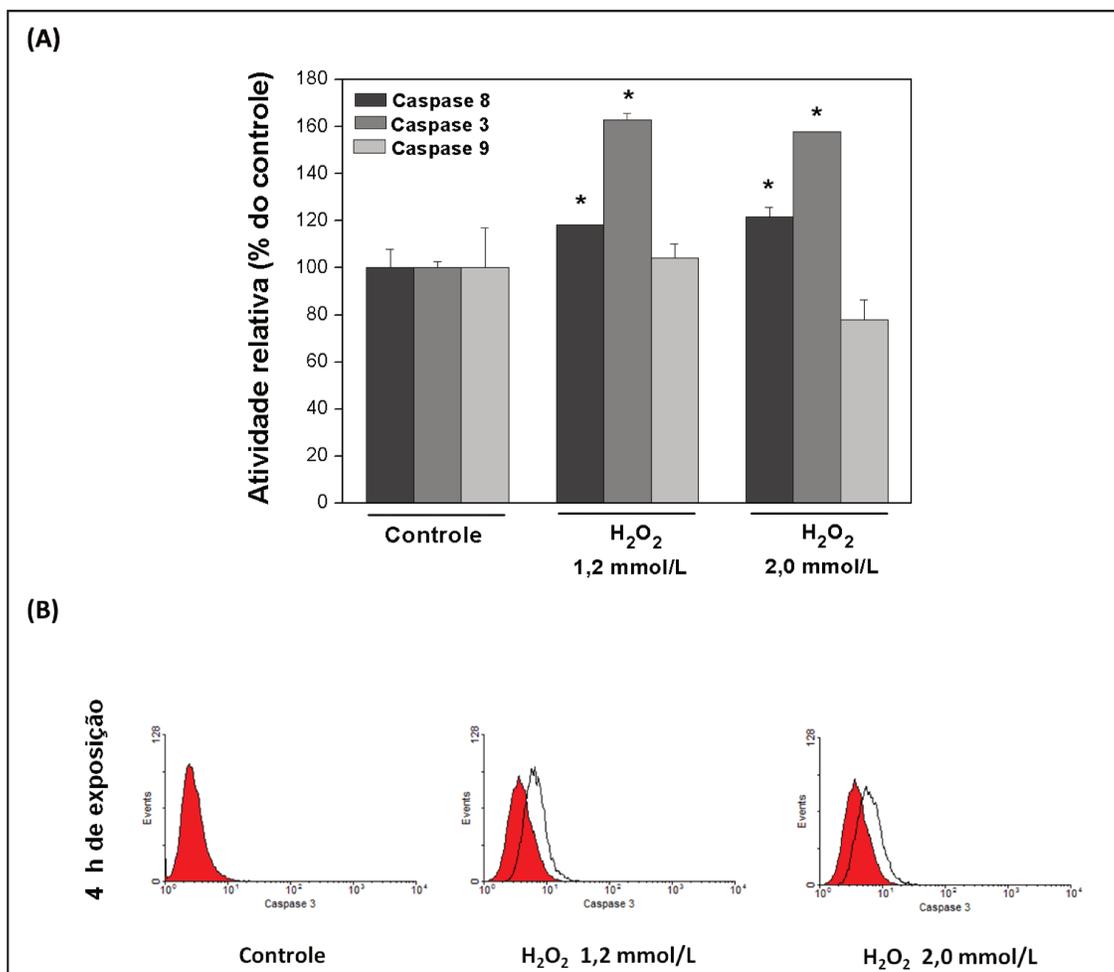


Figura 17: Alterações na atividade das caspases 8, 3 e 9 em células HaCaT expostas ao estresse oxidativo. Após exposição das células ao H₂O₂ (1,2 ou 2 mmol/L) por 4 h, as células foram lavadas e a atividade proteolítica foi determinada colorimetricamente **(A)** e por citometria de fluxo **(B)**. Os histogramas preenchidos em vermelho representam as células controle e os histogramas sem preenchimento correspondem às células expostas ao H₂O₂. Resultados de citometria representativos de 2 experimentos independentes. Os resultados em **(A)** foram expressos em relação ao controle (100%) e representam média ± desvio padrão da triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA, teste de Tukey).

A avaliação da expressão de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) total (Fig. 18A) revelou que apenas o tratamento com H₂O₂ reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis desta enzima, sugerindo sua possível clivagem e consequente inibição de sua atividade de reparo do DNA (Méglin-Chane et al., 2010).

As proteínas da família das IAPs, como XIAP e c-IAP, também contribuem para inibir a apoptose uma vez que impedem a ativação de caspases 3, 8 e 9,

unindo-se diretamente a estas enzimas (Sun et al., 2009). Enquanto houve um aumento na expressão de XIAP após ambos os tratamentos ($p < 0,05$), nenhuma alteração foi observada em proteína inibidora de apoptose (c-IAP) (Fig. 18B). Em contraste, a expressão do fator indutor de apoptose independente de caspases, AIF, foi regulada positivamente ($p < 0,05$) pelo choque hiperosmótico e pelo estresse oxidativo (Fig. 18B).

A resposta celular a diferentes agentes estressores pode ser caracterizada por um rápido aumento na expressão de um seletivo grupo de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (Hsp), as quais, além da função de chaperona molecular, podem inibir a ativação de pró-caspases como ocorre, por exemplo, após interação entre Hsp90 e caspase 9 (Garrido et al., 2006a). Para verificar esta hipótese, a expressão da Hsp90 foi determinada nos modelos de estresse em estudo. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 18B, demonstraram aumento significativo ($p < 0,05$) da sua expressão em células expostas ao estresse oxidativo, enquanto que o tratamento com sorbitol não causou alterações significativas na expressão desta proteína.

Para averiguar se o aumento na expressão de Hsp90 foi responsável pela ausência de ativação de caspase 9 em células tratadas com H_2O_2 , as células foram pré-tratadas com o inibidor de Hsp90, geldanamicina (GA), por 3 h. Após a incubação com H_2O_2 , a viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT.

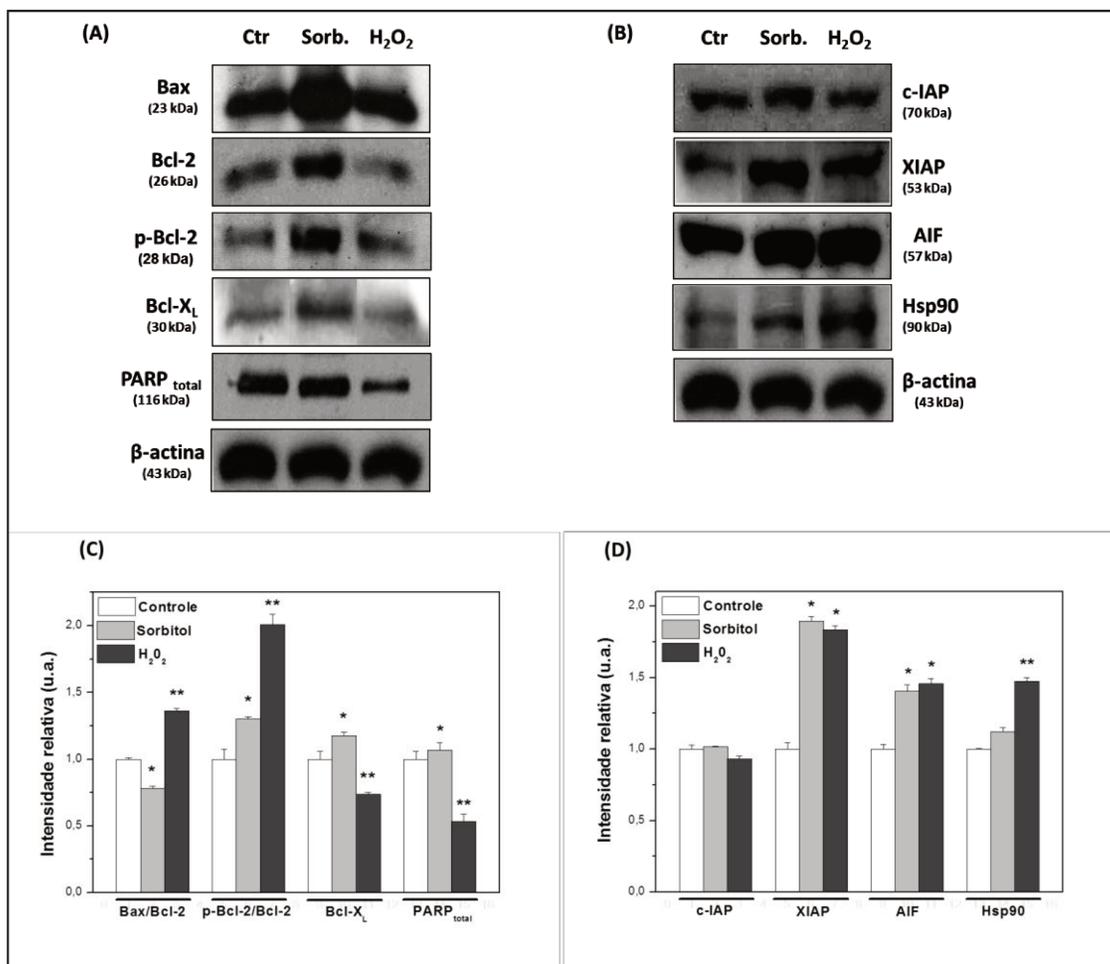


Figura 18: Efeitos da exposição de células HaCaT ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo sobre a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas. Após exposição das células a 1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H₂O₂ por 2 e 4 h respectivamente, os extratos celulares foram preparados e 50 µg de proteínas foram aplicados em gel de eletroforese SDS-PAGE. A análise das proteínas foi realizada por *imunoblotting*, utilizando anticorpos primários específicos para Bax, Bcl-2, p-Bcl-2, Bcl-X_L e PARP_{total} (**A**) e para c-IAP, XIAP, AIF e Hsp90 (**B**). Os valores obtidos na análise densitométrica das bandas das proteínas de interesse foram normalizados em função da β-actina e a intensidade relativa da razão proteína/β-actina ou Bcl-2 foi expressa em relação ao controle (atribuído valor 1) (**C** e **D**). Os resultados representam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. u.a. = unidade arbitrária. *p < 0,05 em relação ao controle; **p < 0,01 em relação ao controle e ao sorbitol (ANOVA, teste de Tukey).

Os resultados na Figura 19 demonstraram que, embora o pré-tratamento com 3 µmol/L de GA tenha aumentado (p < 0,05) em torno de 20%, os efeitos deletérios do estresse oxidativo nas células HaCaT, sua contribuição neste evento não parece primordial para a sobrevivência celular.

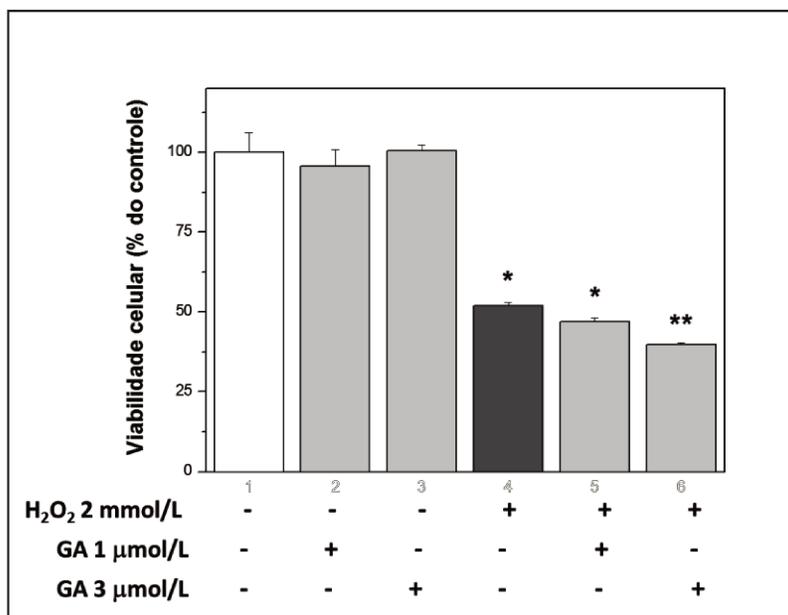


Figura 19: Viabilidade de células HaCaT pré-tratadas com geldanamicina (GA) e expostas ao estresse oxidativo. Células HaCaT ($3,5 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 72 h, as células foram incubadas com 1 ou 3 μmol/L de GA por 3 h e, a seguir, tratadas com 2 mmol/L de H₂O₂ por 4 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Os resultados foram expressos em relação ao controle (100%) e representam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *p < 0,05 em relação ao controle; **p < 0,05 em relação ao controle e ao H₂O₂ 2 mmol/L (ANOVA, teste de Tukey).

Os resultados obtidos na dosagem da atividade de caspase 9 em células pré-tratadas com 3 μmol/L de GA corroboram com esta hipótese, não sendo observadas alterações significativas na atividade desta enzima (Fig. 20). Estes resultados sugerem o envolvimento de outros mecanismos na regulação da ativação da caspase 9 em células submetidas ao estresse oxidativo.

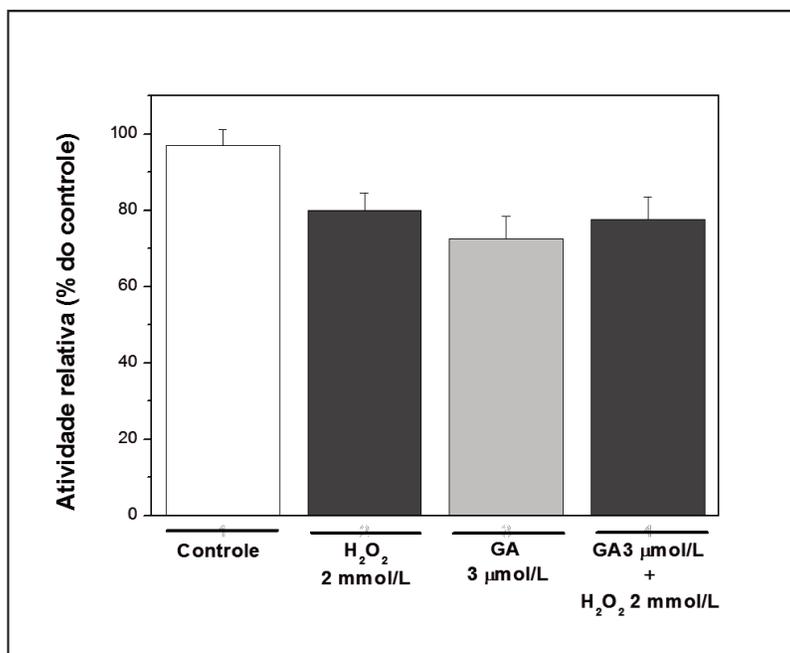


Figura 20: Efeito do pré-tratamento com geldanamicina (GA) sobre a ativação de caspase 9 em células HaCaT expostas ao estresse oxidativo. Células HaCaT ($2,1 \times 10^5$ células/mL) foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . Após 72 h, as células foram pré-tratadas com $3 \mu\text{mol/L}$ de GA por 3 h e, a seguir, tratadas com 2 mmol/L de H_2O_2 por 4 h. A atividade da caspase 9 foi determinada colorimetricamente. Os resultados foram expressos em relação ao controle (100%) e representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata (ANOVA).

4.4.6. Potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e distribuição celular de fatores apoptogênicos em células HaCaT submetidas ao estresse

A avaliação do $\Delta\psi_m$ foi realizada pela marcação das mitocôndrias com a sonda TMRE e análise por microscopia confocal. O TMRE é um corante catiônico e permeável à membrana mitocondrial. Sua concentração é rapidamente equilibrada no interior da mitocôndria de maneira tensão-dependente, sendo, desta maneira, sequestrado pela mitocôndria. Os resultados (Figs. 21A e B) demonstraram drástica diminuição do $\Delta\psi_m$ nas células expostas ao sorbitol, enquanto que após exposição ao H_2O_2 a diminuição do $\Delta\psi_m$ foi gradativa ao longo

do tempo e lenta quando comparada ao choque hiperosmótico (Figs. 21A e B). Desta maneira, tanto a exposição das células ao choque hiperosmótico como ao estresse oxidativo provocam a perda do $\Delta\psi_m$, sendo consistente com a permeabilização da membrana mitocondrial.

A permeabilização da membrana mitocondrial é um dos eventos principais associados à ativação da via intrínseca da apoptose, resultando na liberação de proteínas do espaço intermembranoso para o citosol, entre elas o citocromo *c* e o AIF. Para avaliar esta possibilidade, ensaios de imunofluorescência foram realizados, sendo possível a determinação da distribuição subcelular dessas proteínas. Após exposição aos dois tipos de estresse, as células foram incubadas com anticorpos específicos anti-AIF e anti-citocromo *c*, MitoTracker e DAPI para análise por microscopia confocal (Figs. 22 e 23).

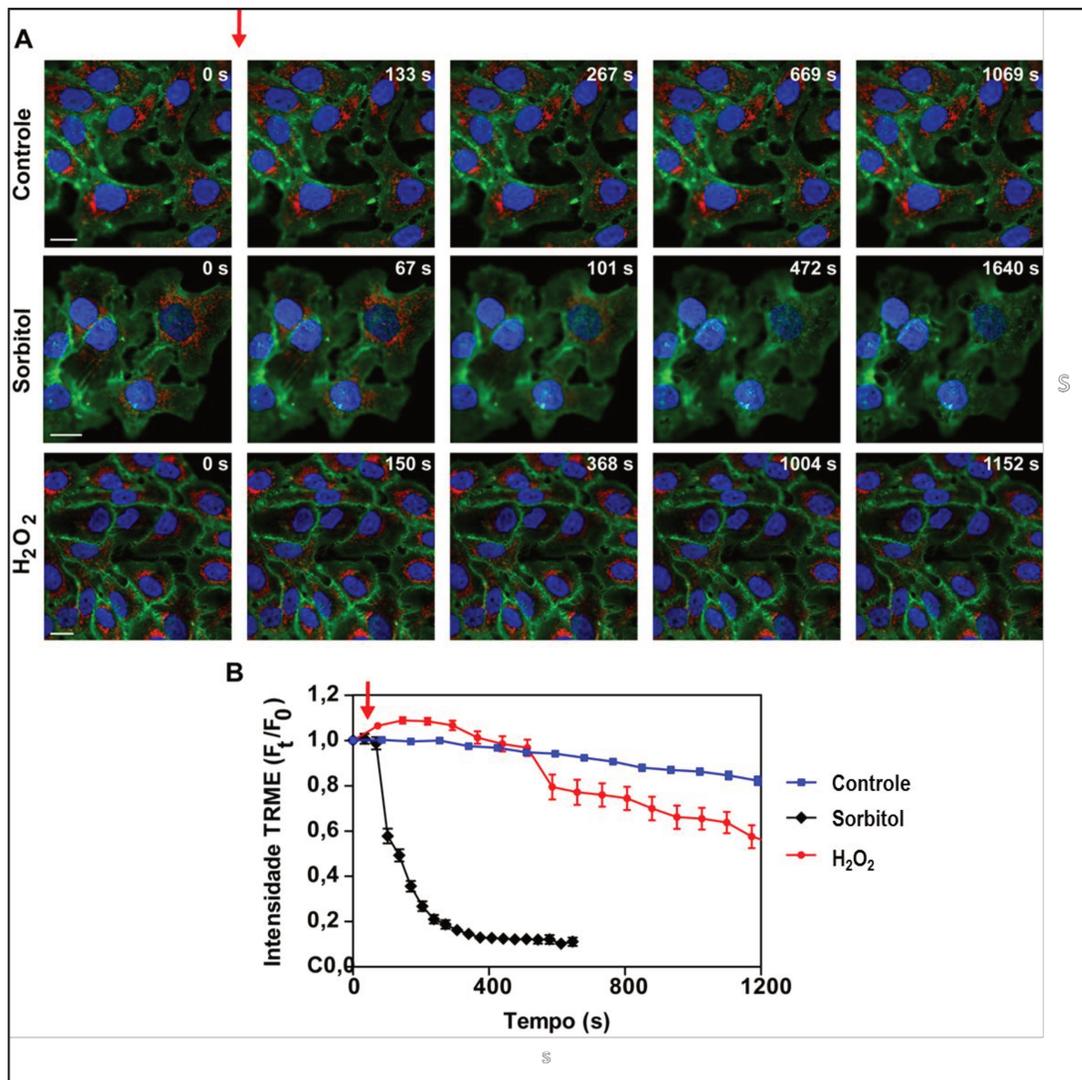


Figura 21: Efeitos do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo sobre o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de células HaCaT. As células foram incubadas com Hoechst para visualização do núcleo (vermelho) e com WGA-Alexa Fluor-594 para visualização da membrana plasmática (verde). Para a avaliação do potencial mitocondrial foi utilizado o fluoróforo TMRE (amarelo), como descrito em “Material e Métodos”. A intensidade de fluorescência (F_t) foi acompanhada nos tempos indicados. **(A)** Imagens sequenciais do controle sem tratamento e das células na presença de 1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H₂O₂. **(B)** A intensidade de fluorescência foi normalizada pela intensidade basal (F_0) e os dados foram representados como média \pm desvio padrão de 6 células. A seta vermelha indica a adição dos agentes estressores. Barra = 20 μ m. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

Os resultados referentes ao controle revelaram co-localização tanto do citocromo *c* como do AIF com a sonda mitocondrial MitoTracker (Figs. 22C e 23C respectivamente).

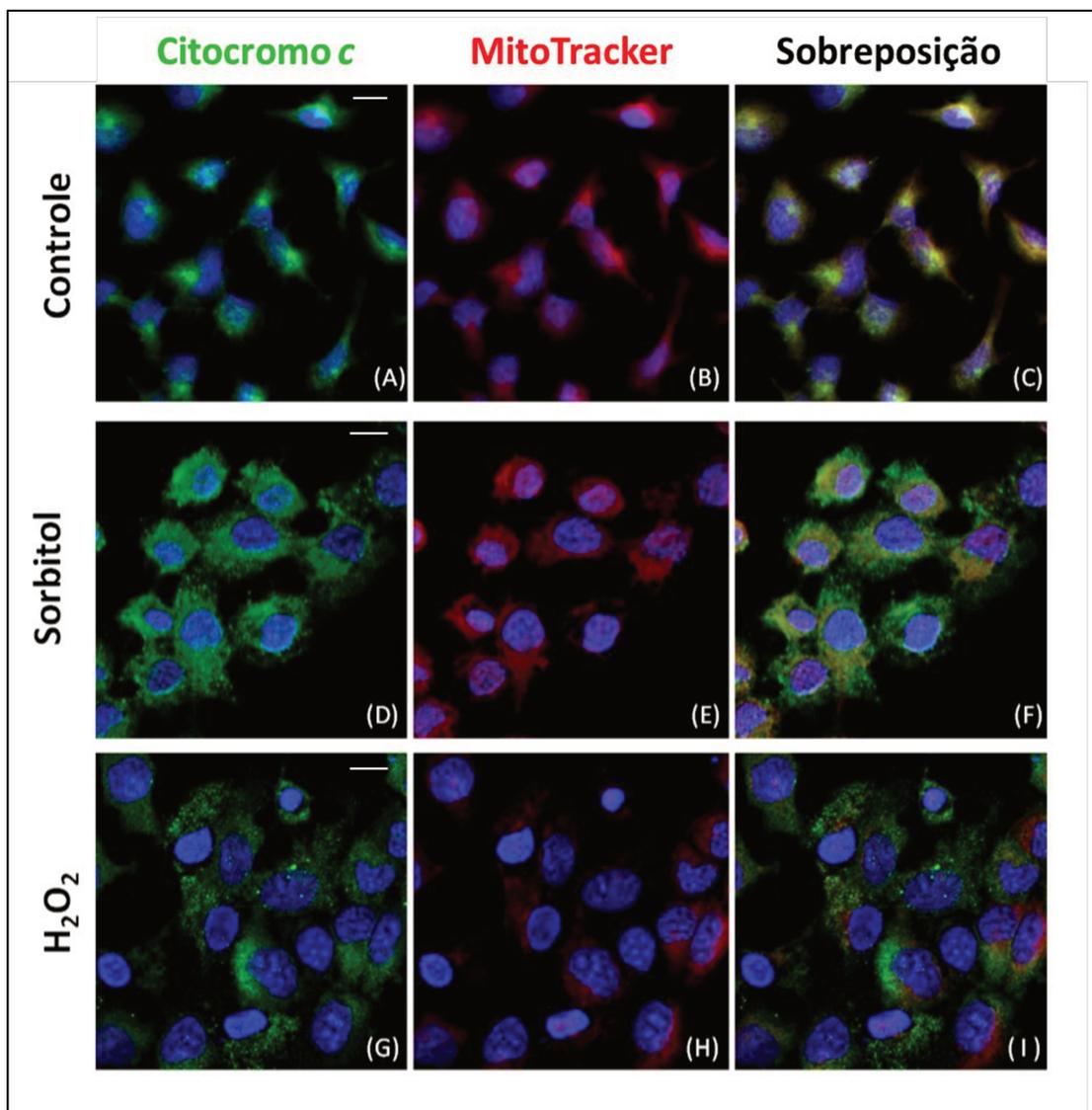


Figura 22: Liberação de citocromo c em células HaCaT submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo. Células HaCaT ($4,3 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 72 h a 37°C e 5% de CO_2 . Após exposição a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente, como descrito em "Material e Métodos", a distribuição subcelular do citocromo c foi avaliada por microscopia confocal, utilizando anticorpo anti-citocromo c-Alexa Fluor-488 (verde), MitoTracker Deep Red (vermelho) e DAPI (azul). Barra = 20 μm . Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

A análise dos resultados das células tratadas com 1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H_2O_2 demonstrou uma fluorescência difusa no citoplasma para citocromo c (Figs. 22D e G) e AIF (Figs. 23D e G), além de redução da co-localização com MitoTracker, conforme observado nas imagens sobrepostas no

mesmo plano focal (Figs. 22F e I; 23F e I), indicando a liberação desses fatores pró-apoptóticos para o citoplasma.

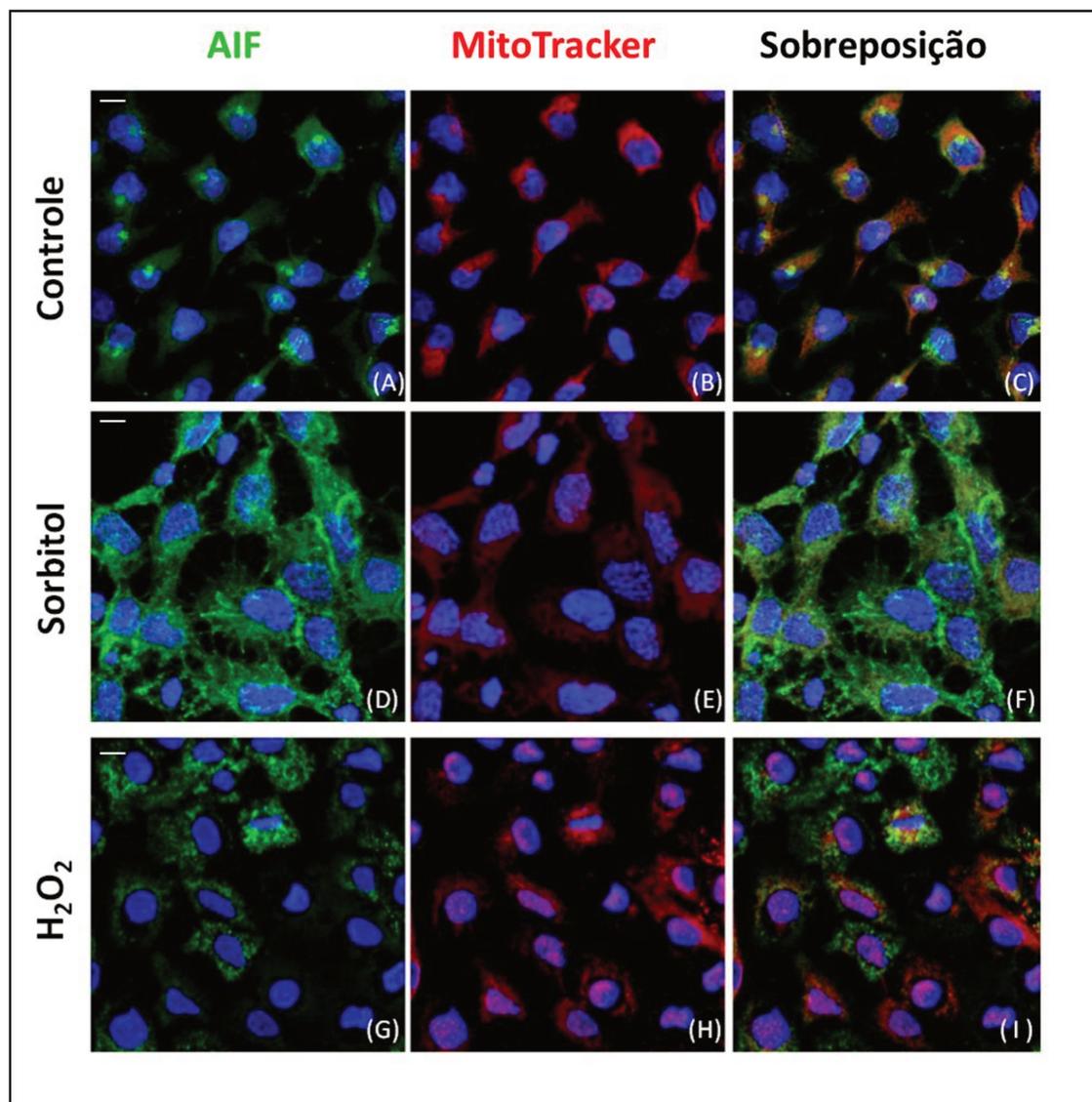


Figura 23: Liberação de AIF em células HaCaT submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo. Células HaCaT ($4,3 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 72 h a 37°C e 5% de CO_2 . Após exposição a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente, como descrito em "Material e Métodos", a distribuição subcelular do AIF foi avaliada por microscopia confocal, utilizando anticorpo anti-AIF-Alexa Fluor-488 (verde), MitoTracker Deep Red (vermelho) e DAPI (azul). Barra = 20 μm . Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

4.4.7. Permeabilização da membrana lisossomal e participação de catepsina B na morte celular induzida pelos agentes estressores

Os lisossomos caracterizam-se por possuírem inúmeras enzimas hidrolíticas e membrana envoltória com características únicas, capazes de manter as enzimas digestivas isoladas do citosol. A perda parcial da permeabilidade da membrana lisossomal acarreta na liberação do seu conteúdo proteico e ativação de apoptose devido à degradação indiscriminada dos componentes celulares (Boya e Kroemer, 2008). Para avaliar os efeitos da exposição das células ao sorbitol e H₂O₂ sobre os lisossomos, células HaCaT foram previamente incubadas com o fluorocromo acridina laranja (AO) e, posteriormente, expostas aos estímulos estressores *in vivo*. A AO é uma base fraca com capacidade de penetrar através das membranas celulares, sendo protonada em ambientes ácidos, particularmente no interior dos lisossomos, onde é aprisionada (Lovelace e Cahill, 2007). Adicionalmente, devido ao fato da AO ser um fluoróforo lisossomotrópico metacromático concentração-dependente, quando excitado pela luz azul, ele emite fluorescência na região vermelha do espectro da luz visível nesta organela, enquanto que sua menor concentração no núcleo e citoplasma é responsável pela emissão no verde (Boya e Kroemer, 2008).

Os resultados obtidos demonstraram que tanto o choque hiperosmótico quanto o estresse oxidativo induzem a ruptura da membrana lisossomal de células HaCaT (Figs. 24 e 25). A integridade da membrana lisossomal é comprovada pela observação de estruturas bem definidas, apresentando intensa fluorescência vermelha e o sequestro do fluoróforo

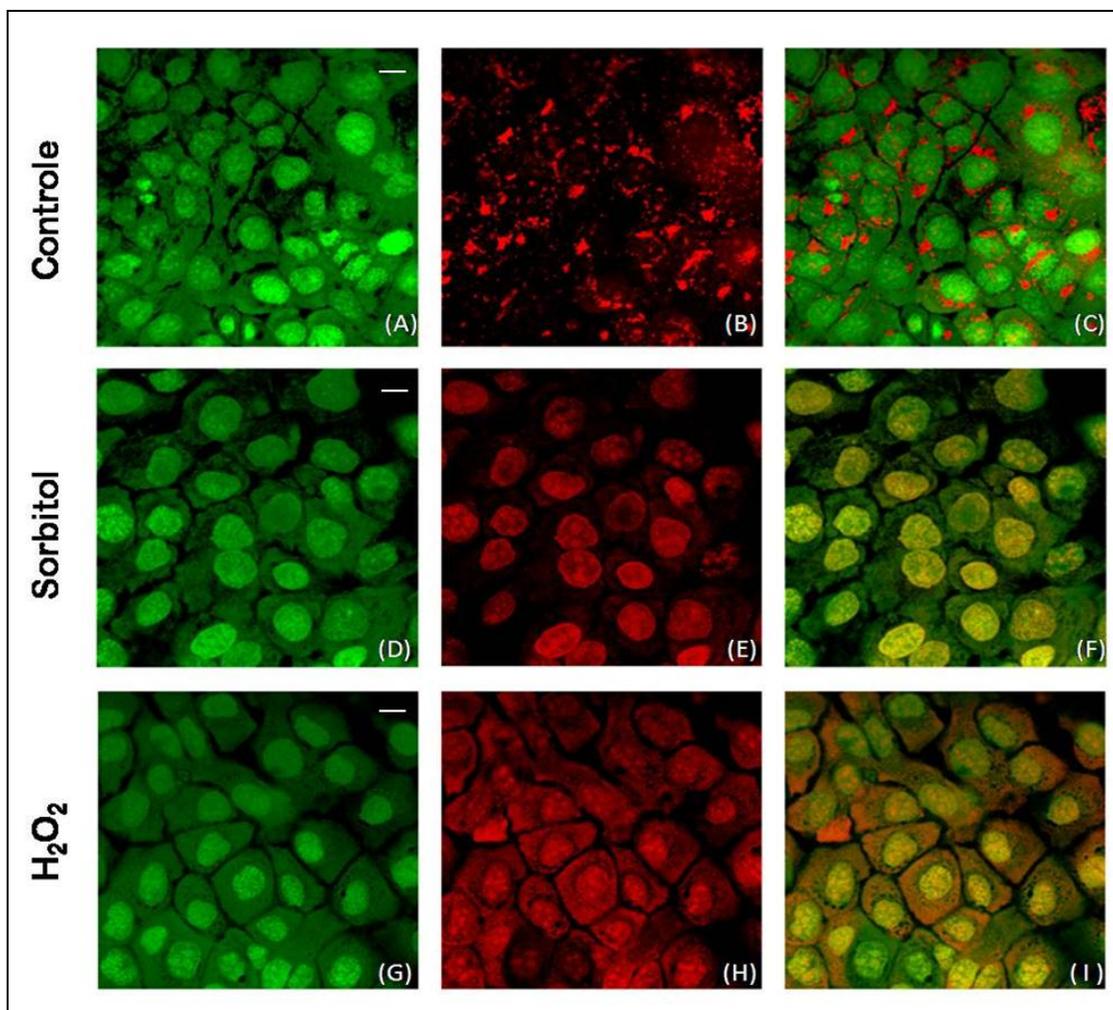


Figura 24: Avaliação da integridade da membrana lisossomal em células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo. Células HaCaT ($2,1 \times 10^5$ células/mL) foram plaqueadas em microplacas de 6 poços e incubadas por 72 h a 37°C e 5% de CO_2 . As células foram incubadas previamente com $5 \mu\text{g/mL}$ de AO por 30 min e posteriormente tratadas com 1 mol/L de sorbitol (**D, E e F**) ou 2 mmol/L de H_2O_2 (**G, H e I**) por 2 e 4 h respectivamente. A seguir, a emissão de fluorescência nas regiões verde (**A, D e G**) e vermelha (**B, E e H**) foram capturadas em microscópio confocal. (**C, F e I**) sobreposições das imagens relativas às fluorescências verde e vermelha. Barra = $20 \mu\text{m}$. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

AO em vesículas lisossomais intactas, indicadas pelo aspecto granular da fluorescência vermelha (Fig. 24B) e ausência de sobreposição (Fig. 24C).

Em contraste, nas células expostas ao sorbitol e H_2O_2 observou-se ausência de lisossomos intactos, evidenciada pela fluorescência vermelha difusa

(Figs. 24E e H), especialmente nas células submetidas ao estresse oxidativo. Além disso, a coloração laranja-amarelada difusa das células tratadas com os agentes estressores (Figs. 24F e I) indica uma redistribuição da AO dos lisossomos para o citoplasma e núcleo. Estes resultados sugerem que ambas as condições de estresse causaram ruptura da membrana lisossomal, que é acompanhada do extravasamento do seu conteúdo para outros compartimentos celulares.

O dano às membranas lisossomais é apontado como um evento capaz de induzir morte celular devido à liberação de enzimas hidrolíticas como as catepsinas. Em particular, estudos na literatura demonstram que a liberação da catepsina B dos lisossomos para o citoplasma pode contribuir na ativação de mecanismos de morte celular programada com participação ou não de caspases (Foghsgaard et al., 2001; Barbosa et al., 2006; Queiroz et al., 2009). Assim, a localização da catepsina B foi investigada por microscopia confocal em células submetidas aos diferentes tipos de estresse. Os resultados apresentados na Figura 25 demonstraram que as células controle apresentam marcações pontuais e definidas, indicando compartimentalização da catepsina B nos lisossomos e integridade da membrana lisossomal (Fig. 25A). No entanto, nas células expostas aos agentes estressores, a catepsina B apresentou uma distribuição mais difusa no citoplasma celular, sugerindo extravasamento do conteúdo lisossomal (Figs. 25B e C). Ainda, esses resultados reforçam a necessidade de estudos futuros para avaliar o envolvimento da catepsina B na morte celular induzida pelo choque hiperosmótico e estresse oxidativo.

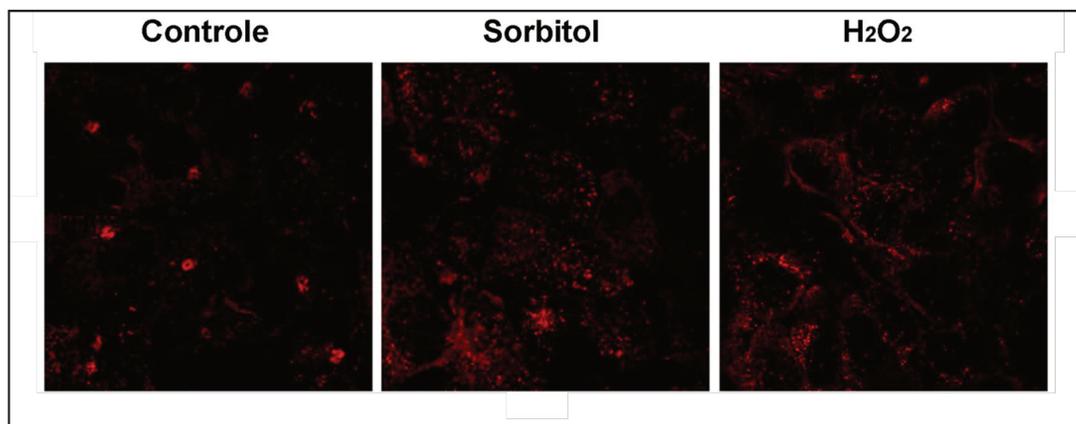


Figura 25: Localização celular da catepsina B após exposição de células HaCaT ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo. Células HaCaT ($4,3 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 72 h a 37°C e 5% de CO_2 . Após exposição a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-catepsina B e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor-647 para análise por microscopia confocal. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

4.5. Avaliação do estado redox celular

A geração de EROs foi avaliada empregando-se a sonda DCFH-DA. O DCFH-DA é um composto não fluorescente e lipofílico que atravessa facilmente a membrana celular. No interior da célula, esterases desacetilam o DCFH-DA, formando DCFH que, devido a sua polaridade, permanece confinado no citoplasma. Em presença de EROs, DCFH é oxidado (DCFoxi) e emite fluorescência na região entre 510 e 530 nm. Devido a esta característica, a fluorescência verde, produzida pela formação de DCFoxi pode ser diretamente relacionada à geração de EROs intracelular. Assim, a intensidade de fluorescência intracelular é proporcional à formação de EROs nas células, em particular o H_2O_2 (Bass et al., 1983).

Os resultados representados na Figura 26 indicaram que ambos os agentes estressores aumentam significativamente a produção de EROs nas células

HaCaT, sugerindo envolvimento de estresse oxidativo no mecanismo de morte celular disparado pelos tratamentos com sorbitol e H_2O_2 .

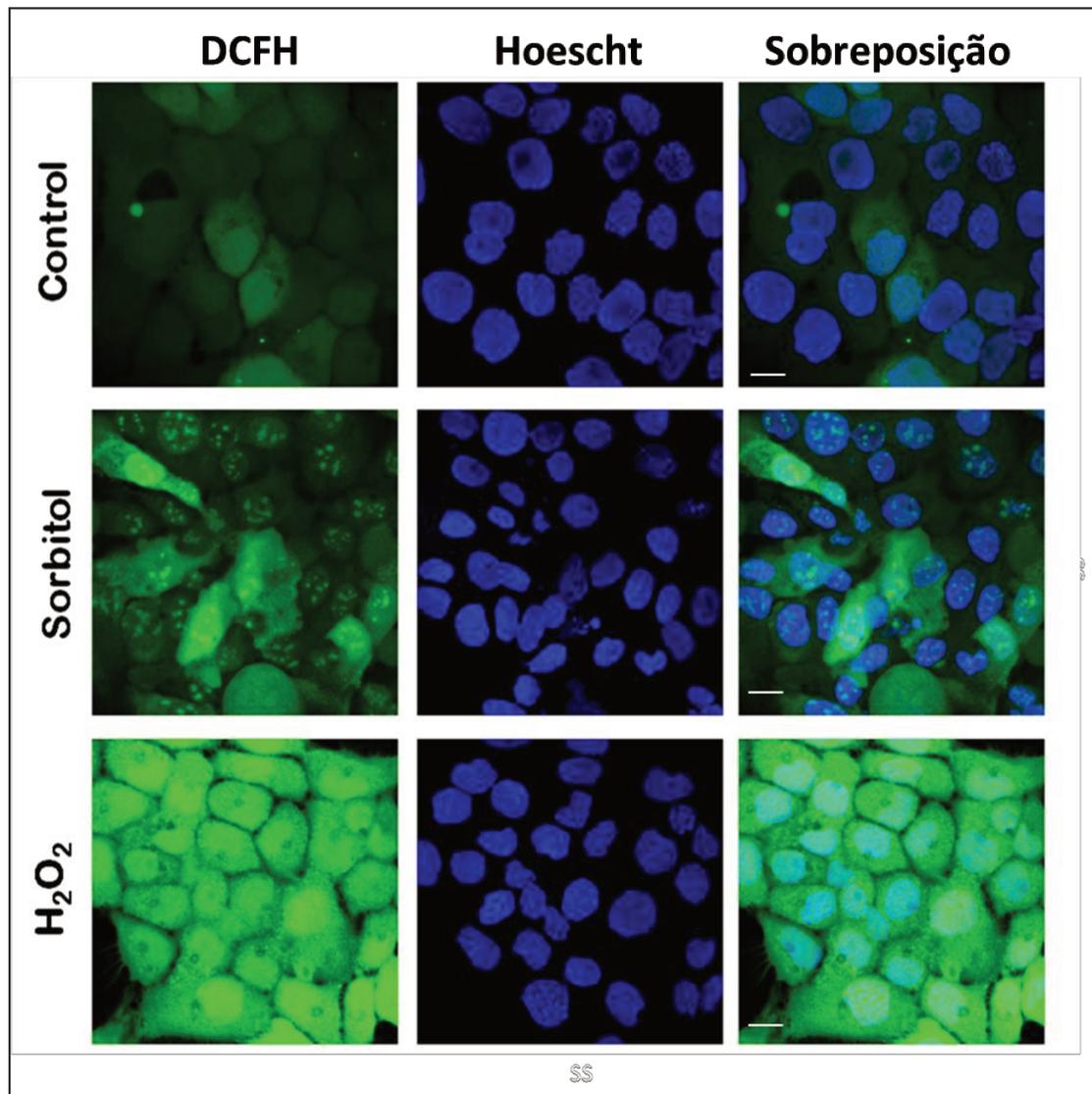


Figura 26: Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células HaCaT submetidas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo. Células HaCaT foram plaqueadas ($2,1 \times 10^5$ células/mL) em microplacas de 6 poços e incubadas por 72 h a 37°C e 5% de CO_2 . As células foram incubadas com $1 \mu\text{mol/L}$ de DCFH-DA 1 h antes do término do tratamento com os agentes estressores (1 mol/L de sorbitol e 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente). A seguir, as células foram lavadas com PBS e, posteriormente, analisadas por microscopia confocal. O aumento da intensidade da fluorescência verde (DCFoxi) corresponde ao aumento na produção de EROs intracelular. Em azul, núcleos marcados com Hoechst. Barra = $20 \mu\text{m}$. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

Os resultados obtidos na análise por *western blotting* do extrato proteico de células expostas a 2 mmol/L de H₂O₂ demonstraram aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão de GR, GPX e CAT, enquanto que houve redução na expressão das enzimas MnSOD para ambos os agentes e redução da Gama-GT somente nas células expostas ao estresse oxidativo ($p < 0,05$) (Fig. 27).

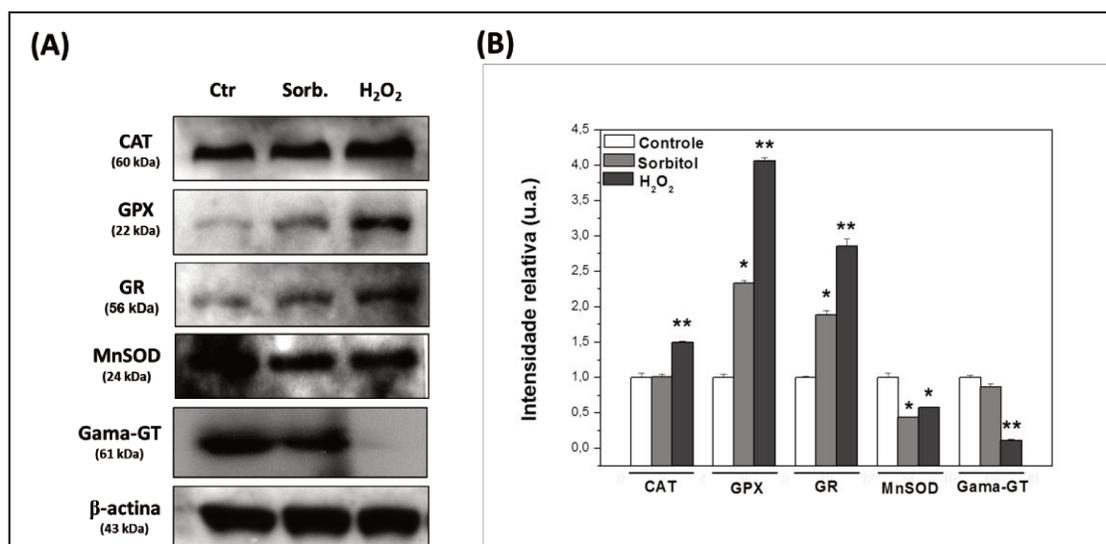


Figura 27: Efeitos do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo sobre a expressão de enzimas do sistema antioxidante celular. Após exposição das células a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H₂O₂ por 2 e 4 h respectivamente, os extratos celulares foram preparados e 50 μ g de proteínas foram aplicados em gel de eletroforese SDS-PAGE. A análise da expressão de catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR), superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) e gama-glutamil transpeptidase (Gama-GT) foi realizada por *immunoblotting*, utilizando anticorpos primários específicos e β -actina (controle interno de aplicação). **(A)** Resultados representativos de um experimento. **(B)** Os valores obtidos na análise densitométrica das bandas das proteínas de interesse foram normalizados em função da β -actina e a intensidade relativa da razão proteína/ β -actina foi expressa em relação ao controle (atribuído valor 1). Os resultados representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. u.a. = unidade arbitrária. * $p < 0,05$ em relação ao controle; ** $p < 0,01$ em relação ao controle e ao sorbitol (ANOVA, teste de Tukey).

4.6. Expressão e atividade de proteínas quinases da família das MAPKs

A expressão e atividade de MAPKs foram analisadas nas células HaCaT expostas ao sorbitol e H_2O_2 visto a importância do papel exercido por membros desta família de proteínas quinases na regulação da sobrevivência, proliferação e morte celular. Os resultados apresentados na Figura 28A demonstraram que células expostas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo não apresentam alterações na expressão de ERK1/2, enquanto que uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na expressão de MAPK p38 foi observada (Figs. 28A e C). Contudo, o padrão de expressão da JNK diferiu entre os dois tratamentos, sendo observada uma pequena redução na expressão desta quinase em células expostas ao sorbitol e o oposto nas células tratadas com H_2O_2 (Figs. 28A e C).

A análise da fosforilação dos membros desta família por *western blotting* (Fig. 28B) revelou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na forma fosforilada de MAPK p38, enquanto que a fosforilação de JNK1/2 e ERK1/2 aumentou, sendo este efeito mais pronunciado no estresse oxidativo do que no choque hiperosmótico ($p < 0,05$). Em conjunto, estes resultados sugerem que a ativação da quinase JNK induzida pelo choque hiperosmótico e pelo estresse oxidativo nos queratinócitos medeia a sinalização que culmina com a morte dessas células. Os resultados obtidos pela citometria de fluxo corroboram com esta proposta, sendo observada uma maior intensidade de fluorescência e consequentemente, ativação da JNK nas células tratadas (Fig. 28E). Por outro lado, não foram observadas alterações nos níveis de fosforilação de Akt em células expostas tanto ao choque hiperosmótico como ao estresse oxidativo (Fig. 28F).

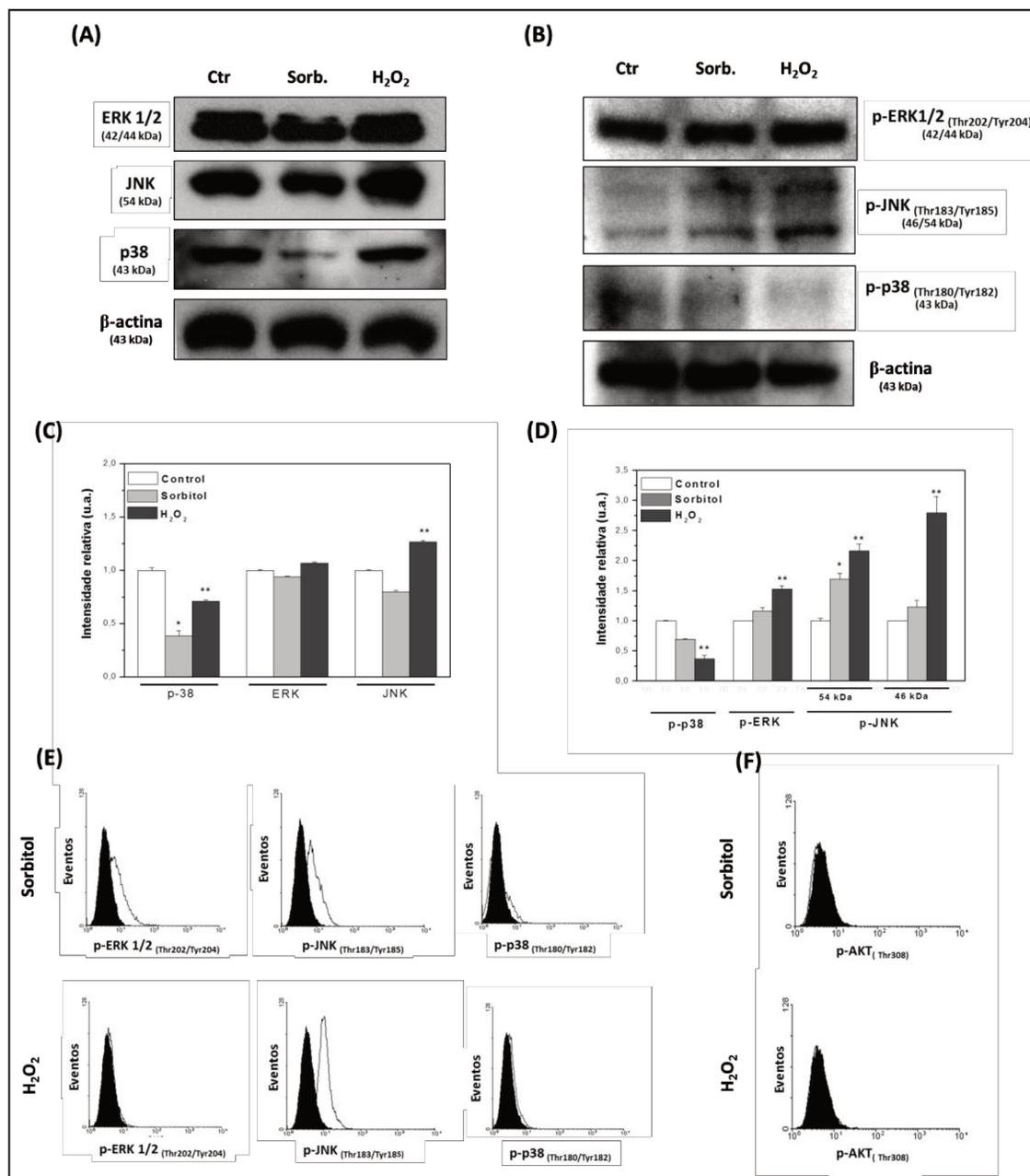


Figura 28: Níveis de expressão e fosforilação de MAPKs. Após exposição das células a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente, os extratos celulares foram preparados e 50 μ g de proteínas foram aplicados em gel de eletroforese SDS-PAGE. A análise das proteínas foi realizada por *immunoblotting*, utilizando anticorpos específicos para quinases (A) e suas formas fosforiladas (B). β -actina foi utilizada como controle de aplicação. (C) e (D) Análise densitométrica das bandas mostradas em (A) e (B) respectivamente, normalizadas em função da β -actina e expressas em relação ao controle (atribuído valor 1). Os resultados representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. u.a. = unidade arbitrária. * $p < 0,005$ em relação ao controle; ** $p < 0,001$ em relação ao controle e ao sorbitol (ANOVA, teste de Tukey). (E) Avaliação da fosforilação da ERK1/2, JNK e p38 por citometria de fluxo. (F) Avaliação da fosforilação da Akt por citometria de fluxo. Os histogramas preenchidos em preto representam as células controle e os histogramas sem preenchimento correspondem às células expostas ao sorbitol ou H_2O_2 .

4.7. Avaliação do envolvimento da via JAK/STAT na resposta de células HaCaT aos diferentes tipos de estresse

Os resultados apresentados nas Figuras 29A e B indicaram que tanto o choque hiperosmótico como o estresse oxidativo inibem a sinalização JAK/STAT, uma vez que houve redução nos níveis de fosforilação de JAK1 e JAK2 em células HaCaT tratadas com sorbitol e H₂O₂ respectivamente (Fig. 29A). Além disso, não foram observadas diferenças significativas na intensidade de fluorescência e, portanto, na ativação dos membros da família das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição (STATs) (STATs 1, 3 e 5) (Fig. 29B).

Ainda, os resultados apresentados na Figura 29A mostraram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de fosforilação da fosfatase SHP2 para ambos os tipos de estresse. Estes resultados corroboram com seu papel no controle de ativação da via JAK/STAT (Xu e Qu, 2008, You et al., 1998).

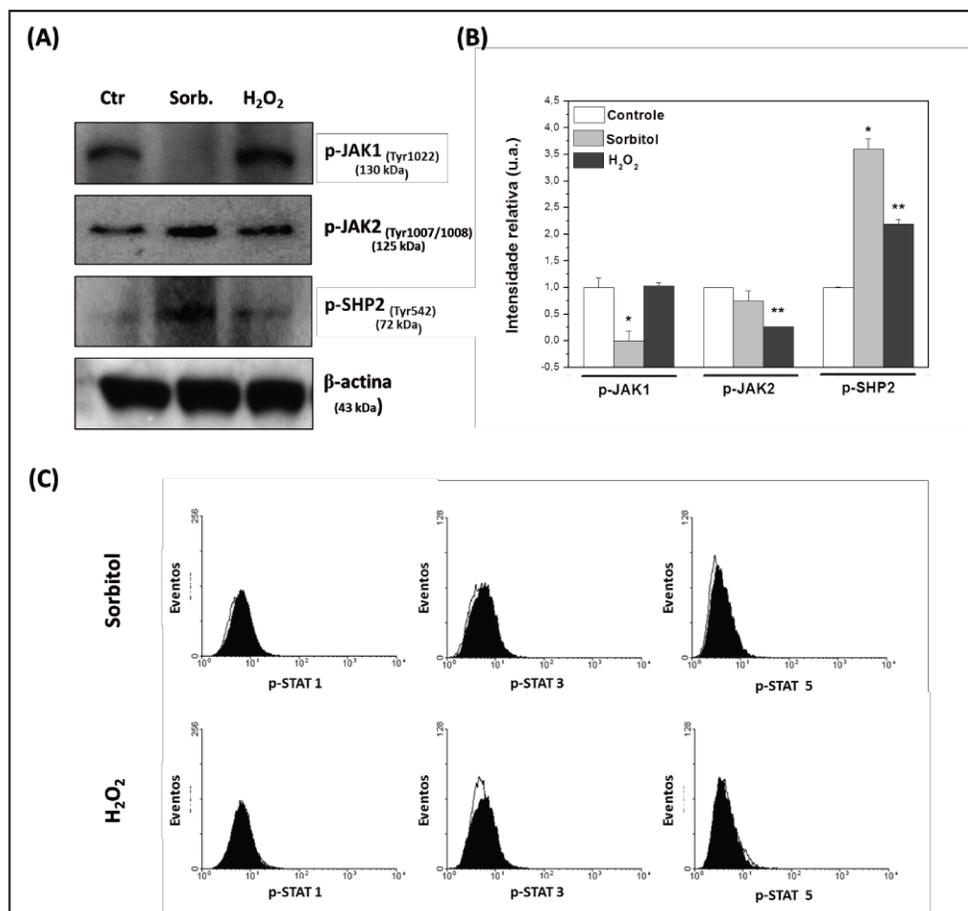


Figura 29: Efeitos do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo sobre a fosforilação das proteínas JAKs, STATs e fosfatase SHP2 em células HaCaT. Após exposição das células a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H₂O₂ por 2 e 4 h respectivamente, os extratos celulares foram preparados e 50 µg de proteínas foram aplicados em gel de eletroforese SDS-PAGE. A análise das proteínas foi realizada por *immunoblotting*, utilizando anticorpos específicos para p-JAK1, p-JAK2 e p-SHP2 **(A)**. β-actina foi utilizada como controle de aplicação. **(B)** Análise densitométrica das bandas mostradas em **(A)** normalizadas em função da β-actina e expressas em relação ao controle (atribuído valor 1). Os resultados representam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. u.a. = unidade arbitrária. *p < 0,005 em relação ao controle; **p < 0,001 em relação ao controle e ao sorbitol (ANOVA, teste de Tukey). **(C)** Avaliação da fosforilação das STATs por citometria de fluxo. Os histogramas preenchidos em preto representam as células controle e os histogramas sem preenchimento correspondem às células expostas ao sorbitol ou H₂O₂.

4.8. Expressão e atividade da LMWPTP após exposição de células HaCaT aos diferentes tipos de estresse

Os resultados apresentados nas Figuras 30A e B revelaram que as células expostas ao estresse oxidativo apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão de LMWPTPs, sendo aproximadamente 2,5 vezes maior do que o controle, enquanto que nenhuma diferença foi observada nas células expostas ao choque hiperosmótico. No entanto, a atividade de LMWPTPs em células expostas ao sorbitol aumentou significativamente ($p < 0,05$), cerca de 3 vezes em relação ao controle (Fig. 30C). Da mesma forma, o estresse oxidativo induziu a atividade enzimática de LMWPTPs em células expostas ao H_2O_2 ($p < 0,05$), sendo aproximadamente 8 vezes maior do que em células do grupo controle (Fig. 30C).

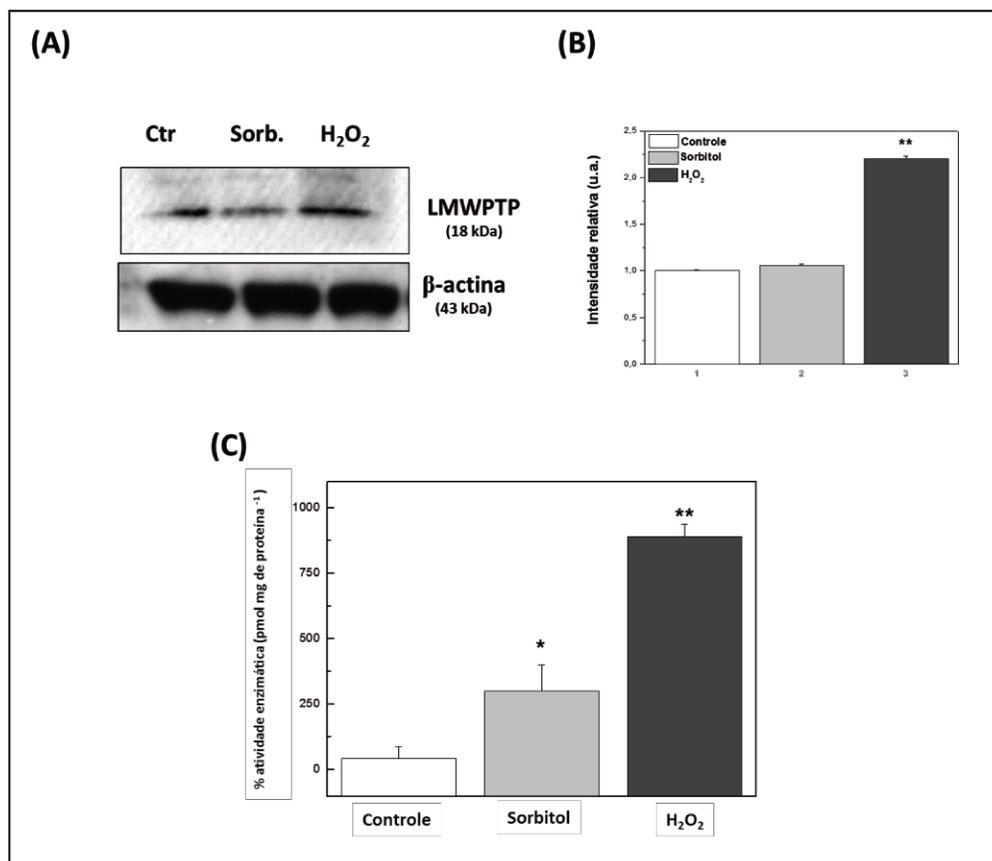


Figura 30: Alterações na expressão e atividade da LMWPTP em células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo. Após exposição das células a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H₂O₂ por 2 e 4 h respectivamente, os extratos celulares foram preparados e submetidos à análise por *immunoblotting*, utilizando anticorpo específico para LMWPTP **(A)**. β -actina foi utilizada como controle de aplicação. Análise densitométrica das bandas mostradas em **(A)** normalizadas em função da β -actina e expressas em relação ao controle (atribuído valor 1). **(B)**. A atividade fosfatásica foi determinada colorimetricamente como descrito em “Material e Métodos” **(C)**. Resultados de *immunoblotting* representativos de 3 experimentos independentes. Os experimentos para determinação da atividade da LMWPTP foram realizados em duplicata. u.a. = unidade arbitrária. * $p < 0,005$ em relação ao controle; ** $p < 0,001$ em relação ao controle e a 1 mol/L de sorbitol (ANOVA, teste de Tukey).

4.9. Organização estrutural dos filamentos de actina e avaliação de proteínas relacionadas ao rearranjo do citoesqueleto

A re-estruturação da arquitetura celular está intimamente ligada ao mecanismo de rearranjo do citoesqueleto. A actina é um dos principais constituintes do citoesqueleto, desempenhando papel fundamental nos processos

de migração, divisão e adesão celular. O controle da reorganização dos filamentos de actina é realizado por um conjunto de proteínas, destacando-se entre elas a cofilina, que apresenta importante papel na regulação da polimerização e despolimerização dos filamentos de actina. A fim de avaliar alterações no citoesqueleto induzidas pela exposição dos queratinócitos ao estresse oxidativo, a distribuição celular da cofilina e o grau de organização dos filamentos de actina foram analisados por microscopia confocal.

Os resultados demonstraram que nas células expostas ao estresse oxidativo houve uma redução discreta na intensidade de fluorescência em relação ao controle, embora ambas apresentassem um perfil de distribuição normal (Figs. 31B e F). Nas células controle, os filamentos de actina apresentaram uma distribuição homogênea, indicando conexão estável entre célula-célula e célula-substrato (Figs. 31C e D). Em contraste, as células expostas ao H₂O₂ apresentaram alterações significativas na organização dos filamentos de actina, com redução da intensidade de fluorescência na região central e imagem compatível com projeções filamentosas, sugerindo desorganização dos filamentos de actina (Figs. 31G e H). Os dados obtidos apontam o citoesqueleto como importante alvo do agente estressor, com alterações na arquitetura e distribuição dos filamentos de actina, as quais podem estar associadas à estabilidade estrutural e mecânica das células.

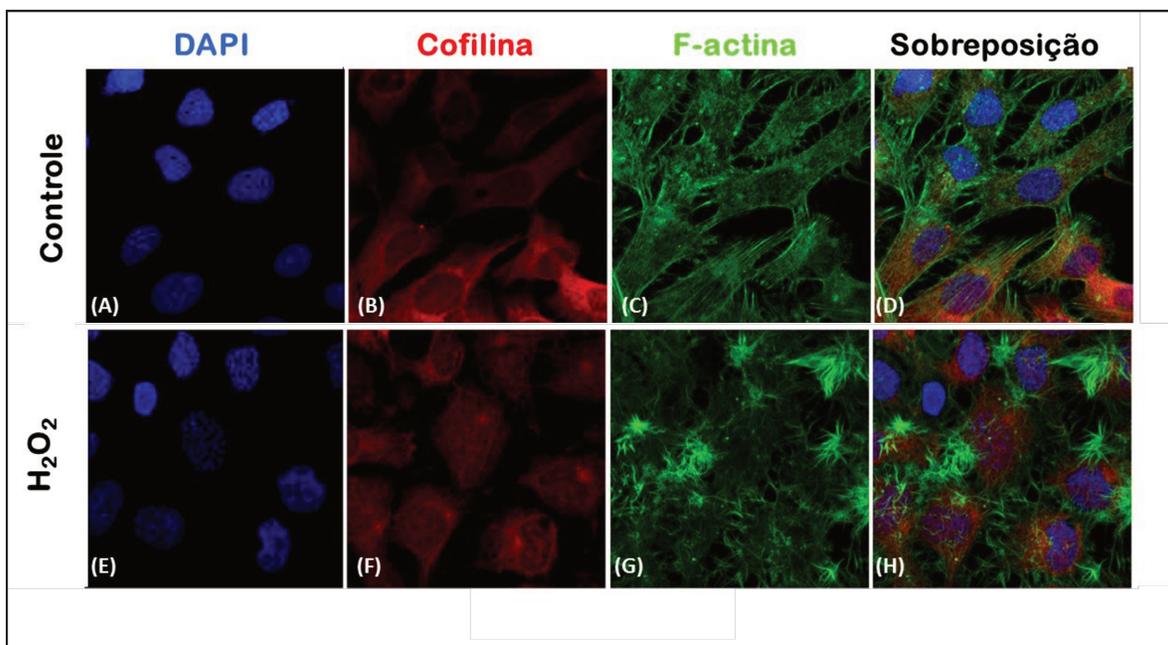


Figura 31: Análise da distribuição da cofilina e da organização dos filamentos de F-actina após exposição de células HaCaT ao estresse oxidativo. As células foram submetidas ao tratamento com H_2O_2 como descrito em “Material e Métodos”. A distribuição da cofilina e a organização dos filamentos de actina filamentososa (F-actina) foram avaliadas por microscopia confocal após incubação das células com anticorpo primário específico para cofilina, seguida do anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor-594 (vermelho) e incubação com faloidina conjugada com Alexa Fluor-488 (verde). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). Barra = 20 μm . Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

Diante dos resultados obtidos na microscopia confocal, a expressão e atividade de proteínas relacionadas ao remodelamento do citoesqueleto foram analisadas. Os resultados foram apresentados na Figura 32 e Tabela 1. Células expostas ao H_2O_2 não apresentaram diferenças significativas na expressão da quinase Src e na fosforilação do resíduo inibitório desta quinase (Tyr527). No entanto, uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na fosforilação do resíduo de ativação (Tyr416) foi observada após tratamento com H_2O_2 (Fig. 32A e Tabela 1), indicando diminuição da atividade da Src. Não houve alterações na expressão da quinase Src carboxi-terminal (Csk) após exposição das células ao H_2O_2 (Fig. 32A e Tabela 1). Da mesma forma, o estresse não

alterou a expressão de FAK e paxilina (Figs. 32B e C e Tabela 1). Apesar do aumento significativo ($p < 0,05$) na autofosforilação da FAK (Tyr397), houve diminuição significativa ($p < 0,05$) na fosforilação nos resíduos de ativação desta quinase (Tyr925 e 577) (Fig. 32B e Tabela 1), indicando sua inibição pelo estresse. Os resultados indicando redução ($p < 0,05$) da fosforilação da paxilina em Tyr118 (Fig. 32C e Tabela 1) concordam com a inibição de Src e FAK após o estresse.

Considerando o importante papel de proteínas pertencentes à família Rho de proteínas ligantes de GTP (Rho GTPases) nos mecanismos de remodelamento do citoesqueleto, a expressão de Rho e Rac1 foi investigada. Os resultados demonstraram aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão destas proteínas após exposição ao H_2O_2 (Fig. 32B e Tabela 1). Não houve alteração na expressão da $PKA\alpha$ e da subunidade p85 da PI3K (PI3K-p85) após o estresse (Fig. 32B e Tabela 1). Além disso, a análise da forma ativa da cofilina (não-fosforilada) e da sua forma inibida (fosforilada) demonstrou que a exposição das células ao agente estressor reduz sua atividade, pois houve diminuição significativa ($p < 0,05$) da forma ativa e aumento ($p < 0,05$) da forma fosforilada (Fig. 32E e Tabela 1). O balanço entre as formas ativa e fosforilada da cofilina é regulado principalmente pela fosfatase PP2A. Curiosamente, os resultados apresentados na Figura 32E e Tabela 1 demonstraram aumento significativo ($p < 0,05$) na fosforilação do resíduo inibitório (Ser307) desta fosfatase. No entanto, estudo recente associou a Hsp27 ao controle da dinâmica da polimerização dos filamentos de actina pela modulação dos níveis de fosforilação

de FAK e pela modulação da expressão e atividade da MMP-2 (Lee et al., 2008). Portanto, a expressão da Hsp27 foi avaliada em células HaCaT expostas ao estresse oxidativo. Os resultados apresentados na Figura 32F e Tabela 1 revelaram aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão da Hsp27 e redução significativa ($p < 0,05$) na expressão da MMP-2 após o tratamento.

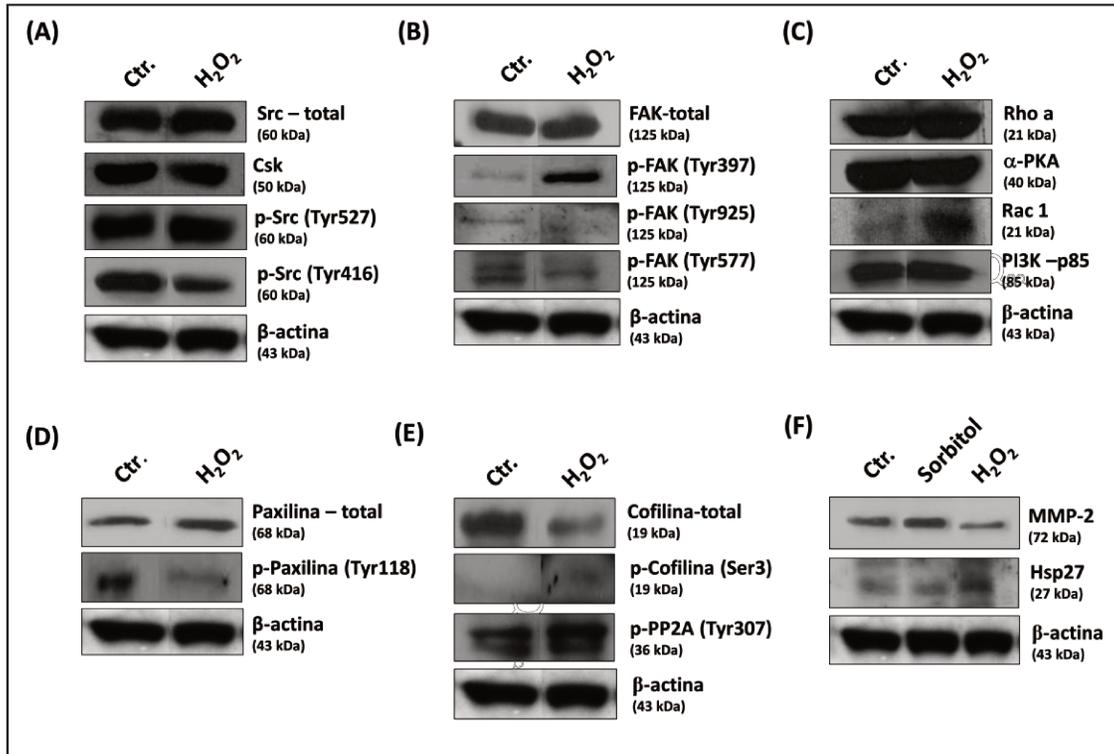


Figura 32: Expressão e níveis de fosforilação de proteínas envolvidas no remodelamento do citoesqueleto em células HaCaT expostas ao estresse oxidativo. Após exposição das células a 2 mmol/L de H₂O₂ por 4 h, os extratos celulares foram preparados e submetidos à análise por *immunoblotting*, utilizando anticorpo específico para formas fosforiladas e não fosforiladas das proteínas. β-actina foi utilizada como controle de aplicação. Resultados de *immunoblotting* representativo de 3 experimentos independentes.

Tabela 1: Análise densitométrica dos resultados de *western blot* das proteínas associadas ao citoesqueleto de células HaCaT expostas ao H₂O₂.¹

Proteína	expressão		atividade	
	Aumento	Redução	Aumento	Redução
Src- total	0,1 ± 0,004	—	—	—
Csk	0,2 ± 0,012	—	—	—
p-Src (Tyr527)	—	—	—	0,3 ± 0,001*
p-Src (Tyr416)	—	—	—	0,3 ± 0,002*
FAK – total	0,2 ± 0,002	—	—	—
p-FAK (Tyr397)	—	—	4,3 ± 0,007*	—
p-FAK (Tyr925)	0	0	0	0
p-FAK (Tyr577)	—	—	—	0,4 ± 0,001*
Paxilina – total	—	0,3 ± 0,008	—	—
p-Paxilina (Tyr118)	—	—	—	0,4 ± 0,004*
RhoA	0,3 ± 0,008*	—	—	—
α-PKA	0	0	0	0
Rac 1	2,0 ± 0,008*	—	—	—
PI3K – p85	0,2 ± 0,014	—	—	—
Cofilina	—	—	—	0,5 ± 0,002*
p-Cofilina (Ser3)	—	—	—	0,7 ± 0,06*
p-PP2A (Tyr307)	—	—	—	0,5 ± 0,006*
Hsp27	1,0 ± 0,004*	—	—	—
MMP-2	—	0,4 ± 0,004*	—	—

¹Os valores obtidos na análise densitométrica das bandas das proteínas de interesse foram normalizados em função da β-actina e a intensidade relativa da razão proteína/β-actina foi expressa em relação ao controle (atribuído valor 1). *p < 0,05 em relação ao controle (teste *t*-Student).

4.10. Avaliação da atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9

A determinação da atividade de MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa) foi realizada por zimografia e os resultados demonstraram inibição enzimática concentração-dependente após ambos os tratamentos (Figs. 33B e C).

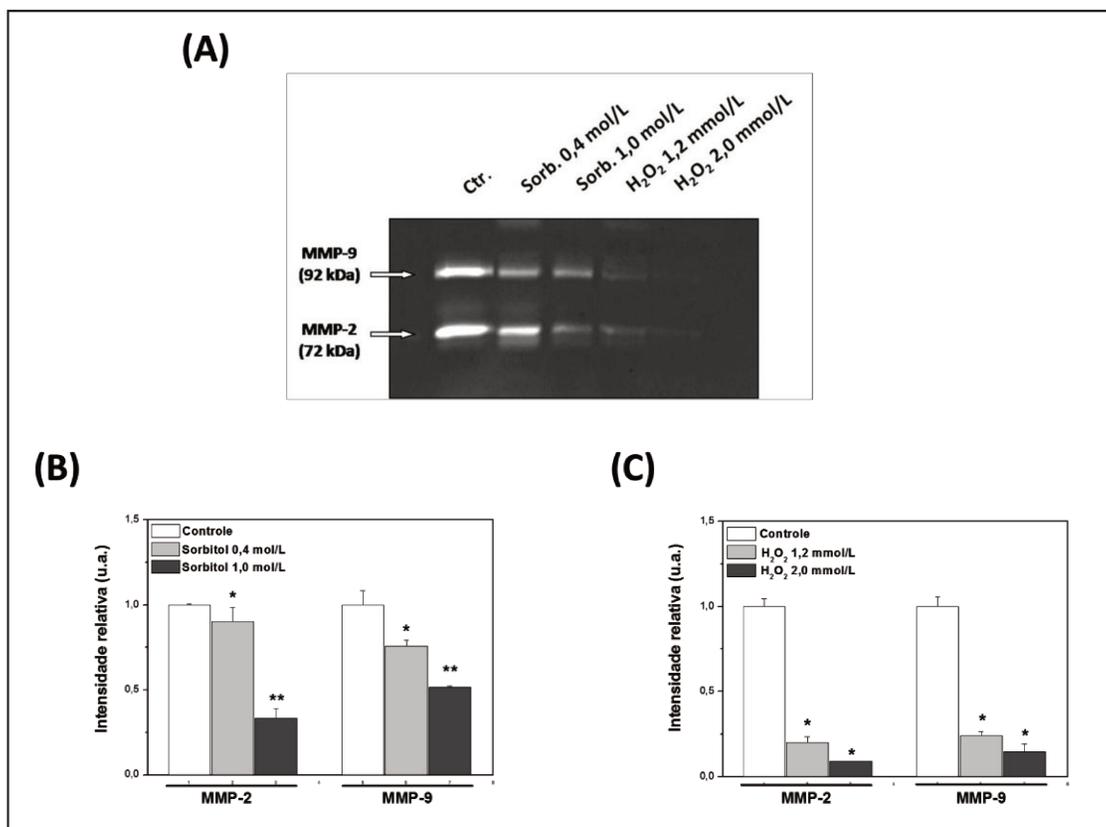


Figura 33: Atividade de metaloproteinases após exposição de células HaCaT ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo. Após exposição das células a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H₂O₂ por 2 e 4 h respectivamente, o meio condicionado foi coletado, concentrado e 150 µg de proteínas foram fracionados em gel de eletroforese SDS-PAGE contendo 4% de gelatina **(A)**. Zimograma representativo de 3 experimentos independentes. Após densitometria, a atividade gelatinolítica foi expressa em relação ao controle (atribuído valor 1) e representada como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. **(B)** sorbitol. **(C)** H₂O₂. *p < 0,05 em relação ao controle, **p < 0,005 em relação ao controle e a 0,4 mol/L de sorbitol ou H₂O₂ 1,2 mmol/L (ANOVA, teste de Tukey).

4.11. Análise do perfil quinásico de células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo empregando-se o PepChip

O PepChip representa uma nova ferramenta baseada em microarranjos de peptídeos para estabelecer o perfil quinômico celular e tecidual (Diks e Peppelenbosch, 2004; Diks et al., 2004; Parikh e Peppelenbosch, 2010). O estudo de vias de sinalização normalmente se dá pela análise do *status* de

fosforilação/desfosforilação de proteínas. Neste trabalho, a utilização do PepChip teve como objetivo mapear de forma rápida e abrangente alterações na atividade de quinases em resposta às diferentes condições estressoras. Os resultados obtidos na comparação das imagens dos chips correspondentes aos extratos de células submetidas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo com o extrato controle foram representados graficamente nas Figuras 34 e 35 respectivamente. Nesses gráficos, as quinases localizadas nos quadrantes superiores correspondem àquelas que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) pela metodologia PepMatrix. Quinases moduladas negativamente (atividade diminuída) pelo estresse apresentaram *fold-change* < 1 e estão localizadas no quadrante superior esquerdo do gráfico e quinases moduladas positivamente (atividade aumentada) pelo estresse apresentaram *fold-change* > 1 , estando localizadas no quadrante superior direito. O valor do *fold-change* prediz quantas vezes a atividade da quinase aumentou ou diminuiu em relação ao grupo controle. Nos quadrantes inferiores direito e esquerdo encontram-se as proteínas que apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) somente pela análise do test-t, mas que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando analisadas pela metodologia PepMatrix.

Os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 resumem os resultados significativos obtidos pela metodologia PepMatrix para os modelos de choque hiperosmótico e estresse oxidativo respectivamente. A exposição das células HaCaT ao sorbitol modulou significativamente 6 quinases (Tabela 2), enquanto que 11 quinases foram alteradas significativamente pelo H_2O_2 (Tabela 3).

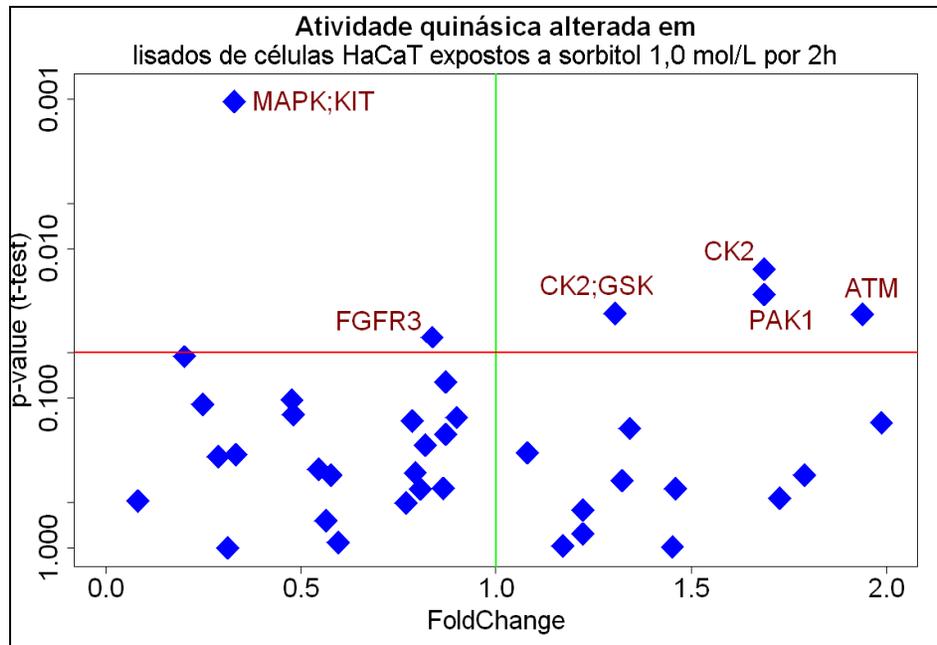


Figura 34: Perfil quinásico de células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise do PepChip pela metodologia PepMatrix. No gráfico foram representados os valores de p (teste-t) em função do *fold-change* para quinases diferencialmente moduladas pelo tratamento com 1 mol/L de sorbitol por 2 h em relação ao grupo controle. Resultados confiáveis quando $p < 0,05$.

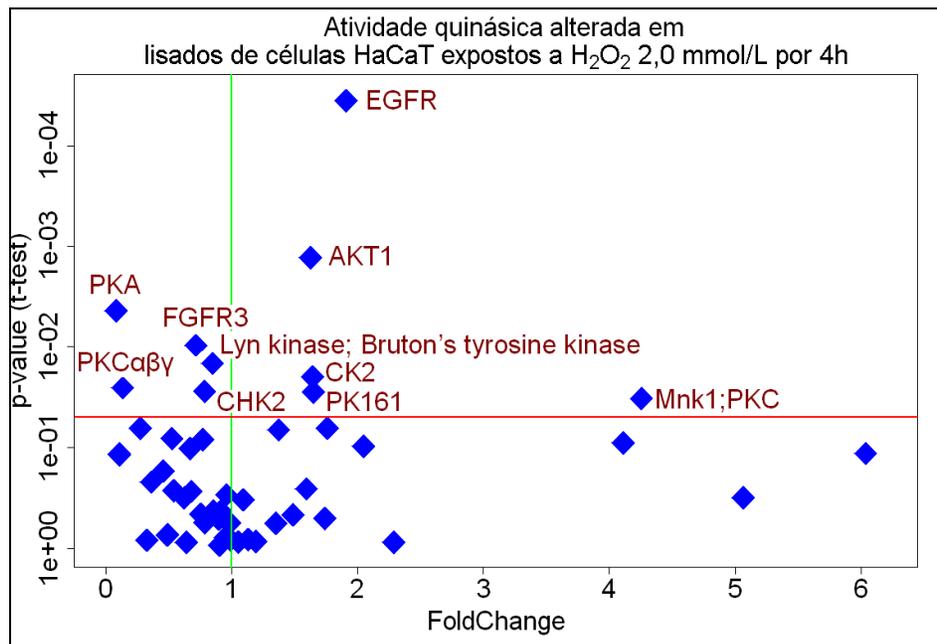


Figura 35: Perfil quinásico de células HaCaT expostas ao estresse oxidativo. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise do PepChip pela metodologia PepMatrix. No gráfico foram representados os valores de p (teste-t) em função do *fold-change* para quinases diferencialmente moduladas pelo tratamento com 2 mmol/L de H₂O₂ em relação ao grupo controle. Resultados confiáveis quando $p < 0,05$.

Conforme pode ser observado na Figura 34 e Tabela 2, a exposição ao choque hiperosmótico causou redução na atividade de MAPK e do receptor de fator de crescimento fibroblástico 3 (FGFR3), enquanto que a atividade de caseína quinase 2 (CK2), glicogênio sintase (GSK), proteína quinase ativada pela p21 (PAK 1) e proteína quinase ATM (“*ataxia telangiectasia mutated*”) aumentaram nesta condição.

Tabela 2: Principais proteínas quinases moduladas diferencialmente pelo choque hiperosmótico em lisado de células HaCaT.

Mediana (Fold change)	Teste-T	Provável Quinase	Substrato	Sequência do Peptídeo	Sítio de Fosforilação
0.3300	0.0010	MAPK	STAT1	NLLPMSPEEFD	S727
1.6870	0.0136	CK2	Caveolina 1	VGKIFSNVRIN	S168
1.6880	0.0201	PAK1	PAK1	SQKYMSFTDKS	S144
1.3060	0.0269	CK2;GSK	c-Myc	PTPPLSPSRRS	T58
1.9390	0.0273	ATM	SMC1	QEEGSSQGEDS	S957
0.8360	0.0389	FGFR3	FGFR3	CTHDLYMIMRE	Y724

A análise comparativa dos resultados dos grupos controle e estresse oxidativo forneceu as seguintes quinases com atividade modulada negativamente: proteína quinase A (PKA), quinase de ponto de checagem de danos no DNA 2 (Chk2), Lyn quinase, FGFR3 e as isoformas α , β e γ da PKC (Fig. 35 e Tabela 3). Adicionalmente, houve aumento significativo na atividade de CK2, Cdc2 (PK161), Akt1, EGFR, quinase de interação com MAPK 1 (Mnk1) e PKC (Fig. 35 e Tabela 3).

Tabela 3: Principais proteínas quinases moduladas diferencialmente pelo estresse oxidativo em lisado de células HaCaT.

Mediana (Fold change)	Teste-T	Provável Quinase	Substrato	Sequência do Peptídeo	Sítio de Fosforilação
1.9100	0.000	EGFR	Mucina 1	TDRSPYEKVSA	Y1229
1.6250	0.001	AKT1	Ras	RLRPLSYPQTV	Y72
-0.1930	0.002	CK2	TCFL1	GFTEESGDDEY	S41
0.0860	0.004	PKA	PCTAIRE	IKRQLSMTLRG	S12
0.7170	0.010	FGFR3	FGFR3	CTHDLYMIMRE	Y724
0.8500	0.015	Lyn Quinase,Src	CD19	LGSQSYEDMRG	Y500
1.6440	0.020	CHK2	Caveolina 1	VGKIFSNVRIN	S168
0.1380	0.026	PKC α,β,γ	Conexina 43	PSSRASSRASS	S368
0.7860	0.028	CHK2	CHK2	LETVSTQELYS	T68
1.6500	0.028	PK161	CDC2	IGEGTYGVVYK	T15
4.2580	0.033	Mnk1;PKC	eIF4E	ATKSGSTTKNR	S209

4.12. Avaliação dos efeitos da riboflavina e riboflavina irradiada sobre a viabilidade de células HaCaT expostas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo

Inicialmente, células HaCaT foram expostas por 24 h a uma faixa de concentrações (10-175 $\mu\text{mol/L}$) de riboflavina e riboflavina irradiada para avaliação da citotoxicidade. Conforme demonstrado nas Figuras 36A e B, os tratamentos não causaram alterações significativas na viabilidade celular, determinada pelo teste de redução do MTT, indicando ausência de citotoxicidade nas condições experimentais utilizadas.

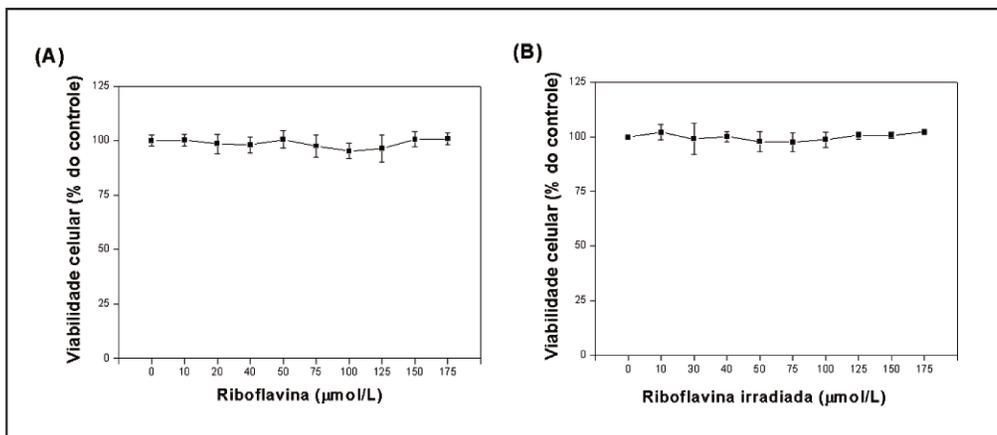


Figura 36: Citotoxicidade da riboflavina e da riboflavina irradiada em células HaCaT. As células ($3,5 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e tratadas, 24 h após o plaqueamento, com diferentes concentrações de riboflavina **(A)** ou riboflavina irradiada **(B)**. A viabilidade celular foi determinada após 24 h de tratamento pelo teste de redução do MTT. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata.

Para avaliar o potencial citoprotetor da riboflavina e da riboflavina irradiada contra o choque hiperosmótico e estresse oxidativo as células HaCaT foram pré-tratadas por 24 h com 2,5; 5,0; 2,0 e 30 µmol/L de riboflavina, previamente irradiada ou não, e, a seguir, foram submetidas aos dois modelos de estresse padronizados neste trabalho. Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstraram que não houve proteção estatisticamente significativa contra os efeitos deletérios de ambos os tipos de estresse quando as células HaCaT foram pré-tratadas com riboflavina irradiada ou não.

Tabela 4: Avaliação do potencial citoprotetor da riboflavina, previamente irradiada ou não, contra o choque hiperosmótico e o estresse oxidativo.

Concentração ($\mu\text{mol/L}$)	Viabilidade celular* (% de citoproteção**)			
	2,5	5,0	20	30
	Choque Hiperosmótico			
Riboflavina	51,6 \pm 1,9 (0)	59,3 \pm 2,1 (7,7)	59,5 \pm 2,3 (7,9)	61,2 \pm 2,9 (9,6)
Riboflavina Irradiada	52,7 \pm 5,0 (2,5)	50,2 \pm 4,6 (1,3)	62,6 \pm 2,3 (13,7)	54,8 \pm 3,7 (5,9)
	Estresse Oxidativo			
Riboflavina	52,7 \pm 3,2 (1,5)	55,7 \pm 4,3 (4,6)	65,0 \pm 9,4 (13,8)	65,3 \pm 4,8 (14,0)
Riboflavina Irradiada	57,4 \pm 3,2 (1,2)	58,7 \pm 3,3 (1,3)	69,9 \pm 8,2 (12,5)	62,1 \pm 3,9 (3,7)

*Células HaCaT ($3,5 \times 10^4$ células/mL) foram pré-tratadas em microplacas de 96 poços por 24 h com diferentes concentrações de riboflavina ou riboflavina irradiada e, a seguir, foram expostas a 1 mol/L de sorbitol ou 2 mmol/L de H_2O_2 por 2 e 4 h respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT.

**Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (100%) e representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata. Os valores entre parênteses representam as porcentagens de citoproteção que foram calculadas em função do IC_{50} .

5. DISCUSSÃO

A epiderme exerce uma importante função protetora sendo uma barreira efetiva entre o meio ambiente e o organismo. Ela é constantemente exposta a diferentes tipos de estresse. O queratinócito é o tipo celular predominante em sua constituição (Ravid et al., 2002), tornando-se o principal alvo das alterações mediadas pelos diferentes agentes estressores (Denning, 2004; Raj et al., 2006). Nestas células, eventos tão distintos como morte e diferenciação celular podem apresentar um alto grau de compartilhamento de vias de transdução de sinal e moléculas sinalizadoras/efetoras, tornando a caracterização desses processos ao nível molecular uma tarefa difícil. Assim, considerável atenção é dada a elucidação das vias de transdução de sinal envolvidas na resposta dos queratinócitos aos diversos tipos de estímulos nocivos (Ravid et al., 2002; Warkskulat et al., 2004; Chen et al., 2008). Além disso, o melhor entendimento desses mecanismos e a identificação de moléculas associadas à determinação do destino celular, somados a possibilidade de modulá-las, contribuem no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas na área dermatológica. Em particular, diversos estudos são conduzidos com o objetivo de compreender como a pele responde às alterações de umidade e à radiação UV (Warkskulat et al., 2004; Chen et al., 2008). Porém, o atual conhecimento da biologia celular dos queratinócitos e dos mecanismos moleculares que determinam sua resposta aos insultos representa uma barreira que limita a compreensão dos efeitos nesse órgão. Assim, o principal objetivo desta tese foi avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta de queratinócitos humanos a diferentes tipos

de estresse: choque hiperosmótico e estresse oxidativo. Para isso, células da linhagem não tumorigênica HaCaT foram expostas a diferentes concentrações de sorbitol e H₂O₂, a fim de se mimetizar os efeitos causados pela desidratação ou exposição a substâncias não iônicas e osmoticamente ativas, como o sorbitol, e estresse oxidativo, o qual pode ser desencadeado por fatores endógenos e exógenos, como radiação UV, inflamação e substâncias pró-oxidantes.

A linhagem de queratinócitos humanos imortalizada espontaneamente, HaCaT, possui a capacidade de se proliferar em cultura na ausência de fatores de crescimento exógenos, mantendo sua proliferação pela secreção de fatores de crescimento autócrinos da família do EGF da mesma forma que ocorre com queratinócitos *in vivo*, além de possuir a capacidade de atingir o estágio terminal de diferenciação dos queratinócitos quando estimulada (Garach-Jehoshua et al., 1999; Piepkorn et al., 1998). Desta forma, esta linhagem celular consiste em um modelo experimental apropriado e bem definido para explorar a resposta celular em uma variedade de contextos (Boukamp et al., 1988; Garach-Jehoshua et al., 1999). Além disso, essas características justificam seu amplo emprego em estudos *in vitro*, para a investigação das vias de sinalização intracelulares envolvidas na resposta a diferentes tipos de estresse, sem interferência de fatores exógenos (Boukamp et al., 1988; Ravid et al., 2002).

Para padronização dos modelos experimentais foram realizados ensaios de crescimento e viabilidade celular na presença de sorbitol e H₂O₂. A análise das curvas de citotoxicidade demonstrou que os efeitos do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo em queratinócitos humanos dependem da intensidade e do tempo de exposição das células aos agentes estressores. Quando células

HaCaT foram tratadas com diferentes concentrações de sorbitol e H_2O_2 por diferentes períodos de tempo, a intensidade dos efeitos citotóxicos observados mostrou-se tempo e concentração-dependente, corroborando com estudos da literatura (Cui et al., 2004; Svobodová et al., 2006; Diker-Cohen et al., 2006). Os valores aproximados de IC_{50} obtidos foram de 1 mol/L e 2 mmol/L após 2 e 4 h de exposição das células ao sorbitol e H_2O_2 respectivamente, empregando-se três diferentes marcadores de viabilidade (redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e quantificação de ácidos nucleicos). Adicionalmente, demonstrou-se que os efeitos citotóxicos induzidos pelo sorbitol e H_2O_2 são irreversíveis, havendo expressiva redução na proliferação celular.

A fim de se determinar o tipo de morte celular e os diferentes mecanismos moleculares disparados pelo choque hiperosmótico e estresse oxidativo, células HaCaT foram tratadas com sorbitol e H_2O_2 e, posteriormente, analisadas quanto a morfologia celular, exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática, integridade da membrana plasmática, ativação de proteases da família das caspases e expressão de moléculas pró- e anti-apoptóticas. Dados obtidos por microscopia confocal indicaram que tanto as células submetidas ao choque hiperosmótico como aquelas expostas ao estresse oxidativo apresentaram alterações na morfologia celular. No entanto, o grau das alterações foi mais proeminente nas células submetidas ao choque hiperosmótico, com visível alteração do volume celular e perda de contato célula-célula. Adicionalmente, a análise por microscopia confocal indicou que ambos agentes estressores induzem a exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática, sugerindo a ativação da maquinaria apoptótica de morte celular nos dois modelos

estudados (Guimarães e Linden, 2004; Taylor et al., 2008). Este achado corrobora com os dados obtidos no ensaio de citometria de fluxo após incubação das células com anexina V/PI, os quais evidenciaram a presença de células em apoptose e apoptose tardia em ambos os modelos, ainda que proporções diferentes para as populações celulares representativas dos vários estágios do processo de morte celular foram encontradas quando comparados os diferentes tipos de estresse. Neste sentido, os resultados obtidos para a atividade de LDH determinada no sobrenadante das células tratadas com sorbitol e H_2O_2 corroboraram com os resultados obtidos por citometria de fluxo, comprovando que a exposição das células ao sorbitol leva ao comprometimento da integridade da membrana plasmática, enquanto que a exposição ao H_2O_2 não causou alterações neste parâmetro. Em conjunto, estes resultados indicam o envolvimento de diferentes mecanismos moleculares na ativação da morte celular induzida pelo estresse oxidativo e pelo choque hiperosmótico.

Dados prévios na literatura relataram que o tipo de morte predominante em queratinócitos humanos, em particular nas células HaCaT, induzido pela exposição ao sorbitol e ao H_2O_2 é a apoptose (Assefa et al., 2000; Takahashi et al., 2001; Ravid et al., 2002; Diker-Cohen et al., 2006). Para melhor caracterizar os mecanismos moleculares associados à morte celular de células HaCaT induzidas pelo choque hiperosmótico e estresse oxidativo, a expressão/ativação de proteínas chaves relacionadas à indução e execução da maquinaria apoptótica foram analisadas. Os resultados demonstraram que o tratamento das células HaCaT com 2 mmol/L de H_2O_2 causou significativo aumento na razão Bax/Bcl-2, redução significativa da expressão de Bcl-X_L e inibição de Bcl-2, comprovada pelo

aumento significativo da fosforilação desta proteína e, conseqüentemente, alteração na relação p-Bcl-2/Bcl-2. Este aumento na fosforilação de Bcl-2 deve-se provavelmente ao aumento da atividade de JNK, quinase responsável pela fosforilação do resíduo estudado (Liu e Lin, 2005; Lorin et al., 2010). Contrariamente a estes resultados, a exposição das células a 1 mol/L de sorbitol não alterou significativamente a relação Bax/Bcl-2 e causou apenas uma discreta inibição de Bcl-2. As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, Bcl-X_L e Bcl-2, são importantes mediadores da integridade da membrana mitocondrial, atuando por meio do sequestro dos membros pró-apoptóticos desta família, os quais tendem a oligomerizar-se, formando poros na membrana mitocondrial externa. A diminuição da expressão de Bcl-X_L e o aumento da fosforilação de Bcl-2 são eventos associados à liberação de proteínas apoptogênicas mitocondriais para o citosol (Brutus et al., 2009). Desta forma, os resultados da exposição das células ao estresse oxidativo são indicativos da ação de proteínas pró-apoptóticas nesta resposta, possibilitando a formação de poros Bax/Bax ou Bax/Bak na membrana mitocondrial, enquanto que outros mecanismos medeiam a morte celular induzida pelo sorbitol. Embora o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 esteja associado à proteção celular contra a permeabilização da membrana mitocondrial e indução de morte, a ativação da via mitocondrial intrínseca é dependente da somatória de fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, característicos do contexto celular (Kroemer et al., 2007).

Os principais eventos responsáveis pela liberação das proteínas apoptogênicas mitocondriais no citosol são a despolarização da membrana mitocondrial, mediada pelos poros de transição de permeabilidade, e/ou a

formação de poros na membrana mitocondrial externa, resultantes da oligomerização de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax/Bax ou Bax/Bak) (Lei e Davis, 2003, Kroemer et al., 2007). Vários trabalhos demonstram que a indução de apoptose em queratinócitos pela radiação UV, estresse oxidativo e agentes citotóxicos é precedida pela despolarização da membrana mitocondrial, liberação do citocromo *c* e oligomerização de (fator 1 de ativação de proteases pró-apoptóticas) Apaf-1 que recruta e ativa a pró-caspase 9, sendo, portanto, dependente da ativação da via intrínseca (Assefa et al., 2000; Takahashi et al., 2001). Além disso, a participação da via extrínseca mediada pela ativação da caspase 8 foi considerada evento secundário, associado à amplificação da resposta apoptótica (Assefa et al., 2000; Takahashi et al., 2001). A liberação do citocromo *c*, normalmente presente apenas no espaço intermembranas mitocondrial, é limitante para a geração do apoptossomo. Portanto, a permeabilização da membrana externa da mitocôndria é o evento crítico responsável pela ativação de caspases na via intrínseca. Além disso, este evento, que representa o ponto de “não retorno” da morte celular, pode comprometer a célula com a morte na ausência de ativação de caspases. Esta morte celular independente de caspases ocorre devido à perda da função mitocondrial, com liberação de efetores de morte independentes de caspases, como o fator indutor de apoptose (AIF) e a endonuclease G (Green e Kroemer, 2005).

Alterações na função e distribuição intracelular das mitocôndrias foram detectadas em células submetidas ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo por microscopia confocal, indicando a participação da via mitocondrial na execução do mecanismo de morte. Os resultados obtidos demonstraram uma

rápida diminuição do $\Delta\psi_m$ após exposição ao sorbitol, juntamente com uma redução na intensidade de fluorescência da sonda MitoTracker Green. Além disso, foi possível observar, durante a captura das imagens em diferentes intervalos de tempo (dados não apresentados), tendência à redistribuição difusa das mitocôndrias no citosol, alterando o perfil de distribuição perinuclear observado imediatamente antes da exposição ao estresse. Curiosamente, as alterações no $\Delta\psi_m$ de células expostas ao estresse oxidativo foram significativamente menores em comparação ao choque hiperosmótico no período de tempo avaliado. Entretanto, conforme discutido anteriormente, um dos eventos associados à ativação da via intrínseca apoptótica é a permeabilização da membrana mitocondrial externa em decorrência da ação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Lei e Davis, 2003; Kroemer et al., 2007; Arnoul, 2010). Em particular, os multímeros de Bax induzem a liberação do citocromo *c* da mitocôndria (Arnoul, 2010). Além disso, outros eventos têm sido associados à indução de permeabilidade da membrana mitocondrial. Na injúria isquêmica e outras condições clínicas, a permeabilização da membrana mitocondrial externa ocorre como consequência da formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Canais na membrana mitocondrial interna se abrem permitindo o movimento de solutos e íons, resultando na perda de função da membrana interna e no *swelling* da matriz. Isto pode levar ao remodelamento da matriz, liberando proteínas do espaço intermembranas e provocando a ruptura da membrana externa. O poro de transição de permeabilidade mitocondrial é formado basicamente pelo canal aniônico dependente de voltagem (VDAC) e pela adenina

nucleotídeo translocase (ANT), além de diversas outras proteínas sensoras para os diversos processos que disparam a abertura do poro em momentos de estresse. O $\Delta\psi_m$ é determinado pelo gradiente de prótons da cadeia respiratória. A abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial explicaria a despolarização mitocondrial verificada de forma precoce em modelos de indução de apoptose. A despolarização é acompanhada pelo vazamento de proteínas na fase de indução, tanto do espaço intermembranas, tais como citocromo *c*, AIF, pró-caspases 3 e 9, como da matriz mitocondrial, a endonuclease G (Green e Reed, 1998; Kroemer et al., 1998; Green e Kroemer, 2005). Cabe ressaltar que a lesão à mitocôndria tem como consequência o poro de transição de permeabilidade mitocondrial que impede a manutenção da diferença de potencial entre as membranas interna e externa e também da manutenção do gradiente de pH nesta organela. Assim, a mitocôndria decide se a célula morrerá por apoptose ou necrose, sendo que estes dois processos muitas vezes surgem de forma paralela ou concorrente. Nos casos em que a lesão celular é muito extensa, a depleção de ATP e a formação de EROs podem desencadear a necrose por perda do controle osmótico da célula, lesão de membrana e ativação de hidrolases (Kroemer et al., 1998; Green e Reed, 1998; Green e Kroemer, 2005). Além disso, estudos recentes sugerem que o remodelamento das cristas mitocondriais e alteração na composição de fosfolípidos nas membranas da organela, eventos que acompanham o processo de fissão mitocondrial, maximizam a formação dos poros mitocondriais, a liberação do citocromo *c* e contribuem para a transição do

$\Delta\psi_m$ após estímulo apoptótico (Parone e Martinou, 2006; Jeong e Seol, 2008; Scorrano, 2008).

Os resultados demonstrando perda imediata do potencial transmembrânico mitocondrial após o tratamento com sorbitol sugerem a formação de poros de transição de permeabilidade mitocondrial como mecanismo responsável pela liberação de proteínas apoptogênicas mitocondriais para o citoplasma durante a exposição de queratinócitos ao choque hiperosmótico, enquanto que a exposição ao H_2O_2 favorece a formação de poros dependentes de proteínas da família Bcl-2 na membrana mitocondrial externa. Embora os resultados indiquem o comprometimento mitocondrial pela diminuição do $\Delta\psi_m$ e aumento da relação Bax/Bcl-2, é necessária confirmação da participação de fatores apoptogênicos na morte celular como, por exemplo, o extravasamento do citocromo *c* para o citosol (Bouchier-Hayes et al., 2005), que depende tanto da permeabilização da membrana mitocondrial como também de sua dissociação da cardiolipina (Henry-Mowatt et al., 2004). A fim de se determinar o envolvimento da liberação de proteínas mitocondriais nos mecanismos moleculares disparados pelos diferentes agentes estressores, ensaios de imunofluorescência foram realizados. Os dados obtidos na microscopia confocal comprovaram a participação do citocromo *c* e AIF na resposta celular ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, a ativação da via intrínseca de morte celular.

Os estímulos apoptóticos podem ativar diferentes mecanismos moleculares resultando na liberação de proteínas apoptogênicas mitocondriais. De fato, um aumento na expressão de AIF foi observado por *western blotting* nas células

submetidas ao choque hiperosmótico e estresse oxidativo. A flavoproteína AIF foi originalmente identificada como uma proteína mitocondrial envolvida na morte celular (Norberg et al., 2010). Seu papel na morte celular como fator pró-apoptótico liberado do espaço intermembranas mitocondrial tem sido amplamente estudado, o que possibilitou a descoberta de que a translocação de AIF para o núcleo, independente da ativação de caspases, é capaz de mediar a morte celular apoptótica. A ação que o AIF exerce depende do estímulo indutor, podendo cooperar com a ação do citocromo *c* ou substituí-lo (Candé et al., 2004). Os resultados obtidos na análise por microscopia confocal de células HaCaT confirmaram a liberação de AIF do espaço intermembranas mitocondrial para o citosol como evento integrante dos mecanismos de indução de morte celular associados ao choque hiperosmótico e estresses oxidativo.

Vários estímulos ambientais e endógenos reconhecidos por induzir reações inflamatórias, estresse oxidativo, estresse hiperosmótico e choque térmico em queratinócitos humanos podem induzir a morte de células HaCaT de maneira tanto dependente quanto independente da ativação de caspases (Diker-Cohen et al., 2006). Embora atualmente esteja bem estabelecido que várias das alterações bioquímicas e morfológicas características das células em apoptose são induzidas por diferentes tipos de proteases, as enzimas da família das caspases continuam sendo consideradas o principal grupo de proteases responsáveis pela indução e execução do processo de morte apoptótica (Guimarães e Linden, 2004; Bröker et al., 2005; Turk e Stoka, 2007). Para verificar a atuação de caspases nos eventos de morte de queratinócitos submetidos aos tratamentos com sorbitol e H₂O₂, a atividade catalítica das caspases 8 e 9

(caspases iniciadoras) e da caspase 3 (caspase executora) foi investigada. Os resultados obtidos nos testes colorimétricos e de citometria de fluxo demonstraram que ambos os agentes estressores induzem a ativação de caspases. Entretanto, surpreendentemente, o tratamento das células com H₂O₂ não foi capaz de induzir a atividade catalítica da caspase 9 como ocorreu no tratamento com sorbitol. A ativação das caspases 3, 8 e 9 nas células expostas ao sorbitol corrobora com dados da literatura que demonstram a participação das vias intrínseca e extrínseca de apoptose na morte dessas células em resposta ao choque hiperosmótico (Xia et al., 2007). Os resultados obtidos no presente estudo, apesar de reforçarem a participação mitocondrial no mecanismo de morte celular induzido pelo estresse oxidativo, colocam em discussão a necessidade e real contribuição da ativação da caspase 9 neste processo.

De fato, a regulação da atividade da caspase 9 mostra-se dependente de vários mecanismos. Primeiro, a liberação do citocromo *c* pelos mecanismos já mencionados medeia a ativação alostérica da pró-caspase 9. Inicialmente, o próprio citocromo *c* liga-se à molécula adaptadora APAF-1, induzindo sua oligomerização e a formação de um complexo denominado apoptossomo. Os apoptossomos funcionam como centros recrutadores de pró-caspases 9 pelos domínios de recrutamento e ativação de caspases (CARD). Uma vez que moléculas de pró-caspase 9 são ligadas aos apoptossomos dá-se início ao processo que culmina na ativação da pró-caspase inativa em sua forma cataliticamente ativa. Desta maneira, a ativação da caspase 9 é dependente do extravasamento do citocromo *c* das mitocôndrias, da formação do apoptossomo no citosol e posterior recrutamento da pró-caspase 9 (Garrido et al., 2006b).

A confirmação da liberação do citocromo *c* por microscopia confocal e o fato da exposição das células HaCaT ao estresse oxidativo não ser capaz de induzir a atividade catalítica da caspase 9 levantaram novos questionamentos sobre o mecanismo responsável pela inibição do processo de ativação da caspase 9 e/ou inibição de sua atividade após processamento do zimogênio. Estes eventos podem ser regulados por uma série de proteínas anti-apoptóticas, como as proteínas Hsp (Garrido et al., 2006b), a JNK (Tran et al., 2007) e membros da família das IAPs (Sun et al., 2009). Desta maneira, a expressão de membros destas famílias de proteínas foi avaliada por *western blotting*. Os resultados apresentados revelaram aumento na expressão das proteínas Hsp90, Hsp27, JNK e XIAP nas células expostas ao estresse oxidativo, indicando estas proteínas como possíveis candidatas a mediadores do mecanismo de inibição da atividade da caspase 9.

Ainda, a associação de XIAP à GSK3 e a receptores de morte, com a consequente inibição dessas proteínas, modula negativamente a ativação e execução do programa apoptótico (Sun et al., 2009). O aumento da expressão de XIAP em ambos os modelos estudados e o fato das células expostas ao sorbitol apresentarem expressiva ativação da caspase 9 sugerem que sua expressão esteja relacionada ao controle de outros eventos celulares. Estudos também demonstraram que esta proteína relaciona-se com a concentração de EROs intracelular, aumentando a expressão de genes relacionados ao controle do balanço redox intracelular (Resch et al., 2008; Wilkinson et al., 2008).

Dentre outras proteínas que poderiam contribuir nesse controle, representantes da família das Hsp são apontadas na literatura como reguladoras

desse processo (Bruey et al, 2000; Arya et al., 2007). Assim, a possível participação da Hsp90 foi avaliada e os resultados obtidos demonstraram que o pré-tratamento de células HaCaT expostas ao estresse oxidativo com o inibidor específico de Hsp90, GA, intensificou a morte das células expostas ao estresse oxidativo. No entanto, este inibidor não proporcionou aumento na atividade da caspase 9, indicando o envolvimento de outros mecanismos e/ou moléculas na regulação da atividade desta enzima. Neste contexto, Paul e colaboradores (2002) demonstraram que a Hsp27, assim como a Hsp90, pode impedir a ativação da pró-caspase 9, mesmo após o extravasamento do citocromo *c* para o citoplasma. A análise conjunta dos dados e o fato de que somente as células expostas ao estresse oxidativo apresentaram aumento significativo na expressão da Hsp27 apoiam a hipótese de envolvimento da Hsp27 no mecanismo de inibição da caspase 9. Além disso, este dado reforça o fato da caspase 9 não estar atuando efetivamente no mecanismo de morte celular disparado pela exposição ao estresse oxidativo.

As células possuem mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo e quando a produção de EROs supera a capacidade destoxicante dos sistemas de defesa antioxidantes, a homeostase redox celular é alterada, tendo como resultado o estresse oxidativo (Curtin et al., 2002; Feissner et al., 2009). Além da ação de agentes estressores, a mitocôndria é a principal fonte de produção de EROs, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), as quais são geradas em consequência do metabolismo aeróbio. EROs são espécies altamente reativas, podendo reagir com DNA,

proteínas, carboidratos e lipídios de maneira irreversível (Takahashi et al., 2004; Murphy, 2009). O desequilíbrio na produção de EROs pode acarretar sérios danos celulares, ativação de diferentes mecanismos de morte celular e também contribuir na patologia de diversas doenças (Curtin et al., 2002; Feissner et al., 2009). Portanto, é de fundamental importância a avaliação do estado redox celular das células expostas a agentes estressores. Neste trabalho, a produção de EROs foi avaliada com a utilização da sonda diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA). Os resultados obtidos revelaram que ambos os agentes estressores causam a geração EROs; contudo, há uma maior produção dessas espécies nas células expostas ao H_2O_2 nas condições experimentais utilizadas.

Devido ao fato das EROs serem quimicamente reativas e instáveis, elas podem reagir com componentes da membrana formando lipoperóxidos e comprometendo suas propriedades, especialmente a permeabilidade (Takahashi et al., 2004). A peroxidação lipídica é uma das primeiras consequências do estresse oxidativo para as células (Droge, 2002). O início da peroxidação lipídica se dá pelo ataque de qualquer ERO capaz de abstrair um hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas, formando um radical peroxil e, num segundo momento, esta reação se propaga resultando no processo denominado de peroxidação lipídica. Os efeitos podem ser mais nocivos para a membrana mitocondrial interna devido à predominância da cardiolipina em sua constituição (Massoti et al., 1974). A cardiolipina apresenta importante função no controle da permeabilidade da membrana, bem como no estabelecimento do gradiente eletroquímico de prótons (Massoti et al., 1974). Devido ao fato do citocromo *c* encontrar-se ligado à face externa da camada de fosfolípidos da membrana

interna mitocondrial, principalmente às moléculas de cardiolipina, a oxidação desta proteína pelas EROs contribui diretamente para a liberação do citocromo *c* e ativação da maquinaria apoptótica (Petrosillo et al., 2003).

O controle do estado redox celular é indispensável para a manutenção das funções celulares e a eficiência da manutenção do balanço redox celular depende da ação conjunta dos sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático. Na tentativa de melhor caracterizar o cenário redox celular, a expressão de importantes membros do sistema antioxidante foi avaliada por *western blotting*. Os resultados demonstraram aumento significativo na expressão de GPX e GR nas células submetidas a ambos os tratamentos, além de aumento significativo de catalase (CAT), principalmente nas células expostas ao H₂O₂.

Em situações de desequilíbrio redox que favorecem o estresse oxidativo, as células apresentam dois mecanismos principais de defesa, com GSH e TRX participando do sistema não enzimático e MnSOD, CAT e GPX constituindo o sistema enzimático (Curtin et al., 2002). A GSH apresenta-se como o mais abundante composto tiol de baixo peso molecular encontrado em plantas e animais (Meister e Anderson, 1984; Sies, 1999). Este tripeptídeo é essencial em muitos processos celulares (Lamaestro e Malone, 1995), atuando, principalmente, na destoxificação de peróxidos. Além disso, a GSH é um dos principais participantes da resposta de destoxificação de xenobióticos pela conjugação com agentes eletrofílicos, sendo esta reação catalisada pela enzima glutathione S-transferase (GST). A GSH apresenta, ainda, diversas funções celulares adicionais a suas propriedades antioxidantes, podendo modular a proliferação celular, resposta imune, armazenamento, síntese de proteínas e ácidos nucleicos

(Paolicchi et al., 2002), além de exercer um importante papel na regulação da apoptose (Morceau et al., 2003). A função antioxidante da GSH interliga a resposta não enzimática a enzimática, sendo substrato para a enzima GPX na destoxificação de peróxidos. A GPX catalisa a conversão de peróxidos orgânicos em água, oxidando duas moléculas de GSH, formando glutathiona oxidada (GSSG). Outra enzima que age conjuntamente com a GPX é a glutathiona redutase (GR). A GR não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutathiona a sua forma reduzida (GSH) na presença de NADPH, tendo função na manutenção do ciclo metabólico da glutathiona (Anderson e Meister, 1989). Nossos resultados demonstraram aumento significativo na expressão de GR e GPX nas células expostas tanto ao choque hiperosmótico como ao estresse oxidativo.

Além da GR e da GPX, evidências indicam uma importante ação da gama-GT no sistema de defesa antioxidante celular (Kugelman et al., 1994). A gama-GT possui um papel central na manutenção da homeostase de GSH, pois medeia o metabolismo de GSH de forma a garantir a manutenção dos estoques de cisteína necessários para a síntese de novas moléculas de GSH (Rajpert-DE et al., 1992). A catalase é uma enzima intracelular, encontrada na maioria dos organismos, que desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 ao catalisar sua decomposição em H_2O (Nordberg e Arner, 2001). Levando-se em consideração a expressão de gama-GT e CAT em nosso estudo, pode-se sugerir que a alta expressão de gama-GT nas células expostas ao sorbitol contribui na manutenção dos níveis necessários de GSH para ação da GPX contra EROs.

É importante ressaltar ainda a ação da MnSOD, uma importante enzima com ação antioxidante mitocondrial, essencial para a manutenção do desenvolvimento e funções normais celulares (Oberley, 2005). Segundo revisão publicada por Tsutsui e colaboradores (2009), o aumento nos níveis de MnSOD confere ampla proteção às mitocôndrias de cardiomiócitos contra o estresse oxidativo. Os resultados obtidos em nossos estudos demonstraram significativa redução na expressão de MnSOD nas células expostas a ambos os agentes estressores, sendo mais evidente nas células expostas ao choque hiperosmótico. Estes resultados corroboram com os dados referentes ao potencial transmembrânico mitocondrial, pois as células expostas ao sorbitol apresentaram uma significativa redução da expressão de MnSOD concomitante a uma rápida diminuição do $\Delta\psi_m$, enquanto que as células expostas ao estresse oxidativo apresentaram gradativa diminuição do $\Delta\psi_m$ e redução pouco expressiva de MnSOD comparada às células expostas ao sorbitol. Estes resultados indicam envolvimento da proteína MnSOD na manutenção do potencial transmembrânico mitocondrial (Tsutsui et al., 2009).

Outro possível mecanismo de indução de apoptose é desencadeado por alterações na permeabilidade e/ou ruptura da membrana lisossomal. A liberação de proteases lisossomais para o citoplasma contribui tanto na ativação da cascata apoptótica quanto na necrose (Barbosa et al., 2006; Queiroz et al., 2009; Kirkegaard e Jäättela, 2009). Inúmeros estudos demonstraram que as EROs também induzem a permeabilidade da membrana lisossomal (PML) e o extravasamento do conteúdo lisossomal para o citoplasma (Guicciardi et al., 2004;

Fehrenbacher e Jäättela, 2005; Boya e Kroemer, 2008). Os resultados referentes à avaliação da integridade da membrana lisossomal empregando-se o fluorocromo acridina laranja (AO) demonstraram que a exposição das células aos agentes estressores causa ruptura da membrana lisossomal. Além das vias intrínseca e extrínseca de ativação de morte celular, as alterações na permeabilidade ou a ruptura da membrana lisossomal podem acarretar na liberação de proteases lisossomais para o citoplasma, podendo contribuir na ativação da cascata apoptótica. Neste sentido, a permeabilização seletiva ou parcial da membrana lisossomal normalmente associa-se à ativação de mecanismos de apoptose, enquanto que a permeabilização total ou ruptura da membrana favorece a necrose (Giucciard et al., 2004; Boya e Kroemer, 2007). Um dos membros mais abundantes da classe de proteases nos lisossomos é a catepsina B, a qual está envolvida em diferentes processos celulares, como no processamento e liberação de proteínas, na resposta celular a antígenos exógenos e na morte celular (Foghsgaad et al., 2001; Werneburg et al., 2002; Guicciardi et al., 2004; Barbosa et al., 2006; Queiroz et al., 2009).

A fim de elucidar o possível envolvimento da catepsina B nos mecanismos de morte celular disparados pela exposição dos queratinócitos ao sorbitol e do H_2O_2 , a distribuição celular da catepsina B foi investigada por microscopia confocal. Os resultados obtidos demonstraram distribuição pontual da catepsina B nas células controle, indicando integridade da membrana lisossomal e compartimentalização lisossomal desta enzima. No entanto, após exposição das células ao sorbitol e ao H_2O_2 , observou-se distribuição mais difusa da fluorescência, corroborando com os resultados de comprometimento da

membrana lisossomal, obtidos no ensaio com AO. Com base nestes resultados pode-se sugerir que os lisossomos e a catepsina B estão envolvidos na morte celular disparada em resposta aos diferentes agentes estressores. A apoptose induzida pela catepsina B envolve a quebra de um ou mais substratos citosólicos e resulta na liberação do citocromo *c* para o citosol, clivagem e ativação de pró-caspases 9 e 3, seguida pelas demais alterações apoptóticas (Guicciard et al., 2004).

As células epidérmicas são constantemente expostas a uma variedade de estímulos endógenos e a diferentes estresses ambientais, como radiação ionizante e alterações na temperatura e umidade. Desta forma, estas células possuem a capacidade de integrar estes sinais e decidir, com base no tipo e na intensidade do estresse, seu destino de sobrevivência, diferenciação ou morte (Wada e Penninger, 2004; Diker-Cohen et al., 2006). Este controle é realizado por vias sinalizadoras que interpretam e transmitem estes sinais ao núcleo. Neste contexto, as MAPKs são proteínas quinases que fosforilam vários substratos citoplasmáticos e nucleares, culminando na regulação da atividade de enzimas e da expressão de genes que codificam inúmeras proteínas (Haneda et al., 1999). Dentro da grande família das MAPKs três grupos são bem caracterizados em mamíferos: a família das ERKs, a MAPK p38 e a família das JNKs (Roux e Blenis, 2003; Wada e Penninger, 2004). Dados na literatura apontaram a importante participação de JNK e MAPK p38 na indução de apoptose em queratinócitos por vários tipos de estresse, incluindo radiação UV, estresse oxidativo, choque térmico, citocinas pró-inflamatórias e choque osmótico (Shimizu et al., 1999; Matsuzawa et al., 2002; Brenneisen et al., 2002; Cheng et al., 2002; Ravid

et al., 2002; Bode e Dong, 2003; Schieke et al., 2005; Diker-Cohen et al., 2006; Krutmann, 2006). Estes fatos, somados à importância reconhecida dessas quinases na regulação de vias de sobrevivência, proliferação e morte de queratinócitos, tornam fundamental a avaliação da expressão e atividade de MAPKs. Os resultados obtidos pela técnica de *western blotting* demonstraram significativo aumento na expressão e nos níveis da forma fosforilada/ativada de JNK1/2 e diminuição tanto da expressão como dos níveis de MAPK p38 ativa após o estresse oxidativo.

Em geral, a ativação da via de sinalização da ERK1/2 é relacionada à resposta celular a fatores de crescimento e sobrevivência, controlando eventos como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. De fato, os resultados obtidos pela análise de *western blotting* e citometria de fluxo confirmaram ativação da quinase de sinalização de sobrevivência celular ERK1/2, provavelmente em resposta à ininterrupta ativação de EGFR pela secreção autócrina de fatores de crescimento da família do EGF pelas células HaCaT (Diker-Cohen et al., 2006). A ativação das vias de sinalização celulares mediadas por JNK e MAPK p38 estão associadas ao estímulo de morte celular, mediando, entre outros processos, a parada do ciclo celular e indução de apoptose, atuando sobre diferentes substratos como proteínas do citoesqueleto, outras quinases, fosfatases, fosfolipases e fatores de transcrição (Bode e Dong, 2003; Huh et al., 2004; Wada e Penninger, 2004). Recentemente, demonstrou-se que além de sua ativação, o tempo que essas proteínas se mantêm ativas contribui na decisão do destino celular. Há relatos de que a ativação transiente de JNK e MAPK p38 induz o crescimento e a diferenciação celular, enquanto que a ativação persistente dessas

proteínas é responsável pela ativação do mecanismo de morte apoptótica (Nielsen et al., 2008). Desta maneira, o papel das MAPKs na decisão de morte/sobrevivência celular está associado à intensidade e duração dos estímulos aos quais as células são submetidas.

Curiosamente os resultados demonstrando ausência de ativação da MAPK p38 obtidos nos nossos experimentos são contrários aos relatos da literatura (Shimizu et al., 1999; Matsuzawa et al., 2002; Brenneisen et al., 2002; Cheng et al., 2002; Ravid et al., 2002; Bode e Dong, 2003; Schieke et al., 2005; Diker-Cohen et al., 2006; Krutmann, 2006). Tal comportamento provavelmente associa-se ao fato de que o pico de ativação da MAPK p38 ocorra em tempos inferiores ao estudado. Em estudo apresentado por Nielsen e colaboradores (2008), no qual foram avaliados os efeitos de diferentes tipos de estresse osmótico sobre a atividade das MAPKs de fibroblastos de camundongo NIH-3T3, o pico de ativação da MAPK p38 foi alcançado 10 min após exposição aos agentes estressores, decaindo após este período. Com base nestes resultados é provável que não haja necessidade das células manterem os níveis de MAPK p38 ativada elevados por períodos prolongados para estimular a sinalização de morte. Além disso, deve-se considerar que uma estimulação persistente de JNK nas células HaCaT expostas ao estresse foi observado, sendo, portanto uma via fundamental na sinalização de morte.

Atuando em conjunto com as MAPKs, a via de sinalização JAK/STAT atua na resposta celular a citocinas e fatores de crescimento, controlando diversos processos biológicos, como diferenciação, senescência e apoptose. Nesta via, os sinais extracelulares são transmitidos ao núcleo pela fosforilação dos membros da

família das STATs (Hebenstreit et al., 2005). O funcionamento inadequado ou a ativação permanente da via JAK/STAT está associado com uma série de doenças, incluindo o câncer (Boudny e Kovarik, 2002). Ahmed e Ivashkiv (2000) demonstraram ativação da via de sinalização JAK/STAT em macrófagos expostos a ambos os agentes estressores, sorbitol e H₂O₂. Entretanto, em nosso modelo, a exposição das células a estes agentes estressores reduziu os níveis de fosforilação das JAKs. Adicionalmente, os resultados obtidos por citometria de fluxo revelaram que a exposição das células ao estresse não causou a fosforilação dos membros estudados da família das STATs (STAT1, STAT3 e STAT5). Estes resultados em conjunto sugerem que esta via de sinalização está associada à sobrevivência celular e sua inibição contribui na morte celular.

A via JAK/STAT pode ser regulada negativamente por PTPs (You et al., 1998; Alexandre, 2002). Em particular, duas PTPs citoplasmáticas, SHP1 e SHP2, estão associadas à regulação da via JAK/STAT, atuando tanto na desfosforilação das JAKs, como também das STATs (You et al., 1999; Xu e Qu, 2008). Park e colaboradores (2009) demonstraram que EROs promovem a fosforilação da SHP2 e o tratamento de cultura primária de astrócitos com H₂O₂ estimula a fosforilação tempo e dose-dependente desta fosfatase. A SHP2 na presença do H₂O₂ se complexa com a STAT3, reduzindo seus níveis de fosforilação. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a exposição das células aos agentes estressores aumenta significativamente os níveis de fosforilação da SHP2, provavelmente devido às EROs, modulando negativamente a ativação da via JAK/STAT.

Além da SHP2, outras PTPs são importantes na regulação de vias de sinalização. Uma classe desta família em particular é representada pelas proteínas fosfatases de baixa massa molecular (LMWPTPs), cujo papel biológico ainda não foi totalmente elucidado. Estudos indicam que as PTPs, incluindo as LMWPTPs, exercem efeitos positivos e negativos em inúmeras vias de sinalização celular, participando na regulação de diferentes processos biológicos (Tonks, 2006). Em especial, as LMWPTPs são importantes moduladoras de vias de sinalização associadas à sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular. Porém, poucos trabalhos são encontrados na literatura com citações do envolvimento desta fosfatase e de que forma ela modula as vias de sinalização de células epidérmicas (Chiarugi et al., 2000; 2003). Assim a participação de LMWPTPs no mecanismo molecular disparado pelos agentes estressores foi investigada pela determinação da expressão e da atividade enzimática desta fosfatase nos diferentes modelos.

Em particular, os resultados obtidos demonstraram aumento significativo na expressão e atividade de LMWPTPs nas células expostas ao estresse oxidativo. De certa forma estes resultados foram inesperados, pois um dos principais mecanismos de regulação da atividade de PTPs é a oxidação de resíduos de cisteína presentes no sítio ativo, que leva à inativação catalítica deste grupo de fosfatases pela oxidação do resíduo sulfidrílico em ácido sulfênico e perda da capacidade de formação de um intermediário cisteinil-fosfato na primeira etapa do mecanismo catalítico (Souza et al., 2009).

A produção de EROs é relacionada à ativação de receptores de fatores de crescimento, como o PDGFR, o FGFR e o EGFR, e também em resposta à ação

de xenobióticos, podendo modular ou até mesmo inibir irreversivelmente a atividade de LMWPTPs (Souza et al., 2009). O fato da exposição das células ao H_2O_2 causar um significativo aumento na produção de EROs, relaciona o aumento da atividade da LMWPTP com o mecanismo de morte celular disparado em resposta aos diferentes agentes estressores. No entanto, deve-se considerar que a inibição de PTPs pela modulação oxidativa pode ocorrer de diferentes formas, ou seja, pela inibição reversível (oxidação transiente), que ocorre quando a oxidação do resíduo cisteína do sítio catalítico leva à produção do ácido sulfênico, ou pela inibição irreversível (oxidação irreversível), que ocorre quando há formação de ácido sulfínico e ácido sulfônico (Zhang, 2002). Devido ao fato das células produzirem EROs em resposta ao seu metabolismo normal e também como mecanismo de defesa contra inúmeros estímulos, as células possuem sistemas antioxidantes com função inibitória ou neutralizadora de EROs. Nossos resultados demonstraram que ao mesmo tempo em que as células aumentam a produção de EROs também ocorre significativo aumento na expressão de proteínas do sistema antioxidante. O parcial restabelecimento do equilíbrio redox celular pelo sistema antioxidante pode contribuir na manutenção da atividade de LMWPTPs, evitando que a reação de Cys-OH com outra molécula reativa ocorra, prevenindo assim a consequente inativação irreversível da atividade enzimática de LMWPTPs. Neste contexto, TRX, GR, GSH e glutaredoxina desempenham papel fundamental na recuperação da atividade catalítica da enzima oxidada (Souza et al., 2009). Em conjunto, nossos resultados sugerem que proteínas do sistema antioxidante celular podem, pelo menos em parte, prevenir a oxidação irreversível da LMWPTP em queratinócitos submetidos ao estresse.

Durante a apoptose, a clivagem específica de proteínas constituintes do citoesqueleto como gelsolina, laminina e actina levam a alterações no funcionamento de organelas celulares e também na estrutura morfológica da célula (Cao et al., 2010). Alterações na estrutura celular são controladas pelo remodelamento do citoesqueleto, evento este que é coordenado por mecanismos cooperativos envolvendo a interação entre proteínas do citoesqueleto e monômeros de actina, regulando, assim, a capacidade de polimerização e despolimerização dos filamentos de actina e possibilitando o rearranjo do citoesqueleto celular (Kim e Coulombe, 2010). Devido ao importante papel no controle do remodelamento do citoesqueleto, alterações na expressão e fosforilação de proteínas do citoesqueleto, foram investigadas. Os resultados obtidos por microscopia confocal demonstraram que células controle exibem padrão de distribuição homogêneo dos filamentos de F-actina. As imagens obtidas para faloidina indicaram conexão estável entre célula-célula e célula-substrato, além de sua organização em relação à cofilina. A exposição das células ao estresse oxidativo revelou alterações na dinâmica dos filamentos de actina com evidente desorganização, apesar da cofilina não apresentar alterações significativas.

A atividade da cofilina é controlada pela relação entre sua forma ativa (cofilina) e sua forma inativa fosforilada (p-cofilina). Nossos resultados demonstraram aumento da fosforilação de cofilina em seu resíduo inibitório (Ser3). Este resultado foi acompanhado pela diminuição da atividade da serina fosfatase PP2A, que modula positivamente a atividade da cofilina pela desfosforilação do resíduo de serina. A modulação da atividade da cofilina nos processos de

rearranjo do citoesqueleto é necessária, pois exerce função na polimerização dos filamentos de actina (Wiggin et al., 2008). Zambuzzi e colaboradores (2009) demonstraram a importância da manutenção da forma inativa de cofilina e inibição da PP2A nos mecanismos de rearranjo do citoesqueleto durante a adesão de pré-osteoblastos humanos. Além de sua ação no controle dos processos de remodelamento do citoesqueleto, recentemente, sua contribuição na ativação da apoptose foi demonstrada (Klant et al., 2009). A oxidação da cofilina por estresse oxidativo leva à formação de ligações dissulfeto intermoleculares, induzindo mudanças conformacionais na molécula da proteína que causam a perda da afinidade pela actina e sua translocação para a mitocôndria. Como consequência, ocorre inchamento desta organela, abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e liberação do citocromo *c*. A liberação do citocromo *c* pode ocorrer independentemente da ativação de Bax e requer oxidação de ambos os resíduos de cisteína da cofilina (Klant et al., 2009). Portanto, em adição à formação dos complexos Bax/Bax e Bax/Bak, os resultados apontam uma possível contribuição da cofilina na liberação do citocromo *c* e ativação da maquinaria apoptótica em resposta ao estresse oxidativo.

Diante desses resultados, a expressão/ativação de proteínas relacionadas ao remodelamento do citoesqueleto foi avaliada nas células HaCaT expostas ao estresse oxidativo. A FAK é uma proteína chave na sinalização mediada pelas integrinas, atuando como molécula adaptadora que recruta proteínas sinalizadoras para porções sub-membranares onde integrinas se agrupam. O complexo então formado transmite sinais da matriz extracelular ao citoesqueleto (Cox et al., 2006). Desta forma, a FAK influencia a atividade dos principais reguladores da dinâmica

do citoesqueleto de actina, as proteínas da família das Rho GTPases (Mitra et al., 2005). Os resultados obtidos por *western blotting* demonstraram aumento significativo na fosforilação do resíduo de autofosforilação da FAK nas células expostas ao H₂O₂. A fosforilação deste resíduo recruta a proteína c-Src (Schaller et al., 1994), sendo esta quinase a responsável pela fosforilação do resíduo tirosina 577 do domínio quinase e do resíduo tirosina 925, ambos presentes na porção C-terminal de ativação da FAK. No entanto, a exposição ao H₂O₂ reduziu a fosforilação destes resíduos, indicando assim inibição da FAK. Os principais substratos da c-Src incluem, além da FAK, proteínas adaptadoras e fatores de transcrição, sendo que sua atividade pode ser regulada, dentre outras formas, pela fosforilação do resíduo inibitório (Tyr527) pela Csk (Yagi et al., 2007). A análise dos resultados indicou que o estresse oxidativo regula negativamente a atividade da Src. É interessante salientar que a exposição ao estresse oxidativo além de inibir Src e FAK, aumenta significativamente a atividade de LMWPTP. Zambuzzi e colaboradores (2008) demonstraram que a LMWPTP regula a atividade da Src, que é desfosforilada diretamente em seu resíduo de ativação (Tyr416). Com base nestes dados pode-se sugerir o envolvimento de LMWPTP na regulação deste processo.

Levando-se em consideração o importante papel das Rho GTPases nos mecanismos de remodelamento do citoesqueleto, a expressão de Rho e Rac1 foi analisada. Os resultados mostraram aumento significativo apenas na expressão de Rac1 nas células expostas ao H₂O₂. As funções de Rac1 relacionadas ao controle do rearranjo do citoesqueleto já estão bem estabelecidas na literatura. Por exemplo, Rac1 pode interagir diretamente com diferentes proteínas efetoras,

além de exercer papel chave na integração de estímulos extracelulares com o núcleo (Bosco et al., 2009). Em queratinócitos, além dessas funções, esta proteína exerce importante papel no controle e manutenção das junções intercelulares mediadas pelas caderinas, sendo necessária para a manutenção da adesão célula-célula (Braga et al., 1999). Já a proteína Rho está envolvida no controle da formação das fibras de estresse e na formação da adesão focal (Popoff e Geny, 2009).

Os complexos de adesão focal são importantes sítios de nucleação para ativação de vias de sinalização envolvidas no rearranjo do citoesqueleto e apoptose (Brakenbush e Fassler, 2003). As células expostas ao estresse oxidativo apresentaram redução da fosforilação dos resíduos de ativação da FAK (Tyr577 e Tyr 925). Além do possível papel da Hsp27 na modulação da atividade caspase 9 discutido anteriormente, estudos reportam seu envolvimento também em processos de remodelamento do citoesqueleto (Miron et al., 1991; An et al., 2004; Zambuzzi et al., 2009). Lee e colaboradores (2008) demonstraram inibição da FAK e de MMP-2 após exposição de células que super-expressam Hsp27 a um agente inibidor da polimerização de actina. Este mesmo efeito foi observado em nossos estudos de exposição de células HaCaT ao H₂O₂, sugerindo que a Hsp27 também modula a polimerização da actina. A inibição concentração e tempo-dependente da atividade gelatinolítica da MMP-2 corrobora com esta hipótese.

As MMPs não são expressas constitutivamente na pele, mas são induzidas em resposta a sinais exógenos, tais como citocinas e fatores de crescimento, além da interação célula-matriz extracelular (Kähäri e Saarialho-Kere, 1997). As MMPs

exercem papel fundamental em processos normais de remodelamento da matriz extracelular, regeneração tecidual, envelhecimento cronológico e deletério da pele, remodelamento do citoesqueleto, além de inúmeras dermatoses e câncer (Rittié, 2002; Gialeli et al., 2011). MMPs são expressas diferencialmente de acordo com a situação e estímulo (Kahari e Saarialho-Kere, 1997; Johansson et al., 2000ab; Ravanti e Kahari, 2000; Rittié, 2002; Zambuzzi et al., 2009). Além do mecanismo de controle da expressão e/ou atividade de metaloproteinases, em especial da MMP-2, pela Hsp27, estudos também demonstraram que as MAPKs possuem um importante papel na regulação da secreção da MMP-9 por queratinócitos, sendo este efeito dependente de AP-1 e NF κ B (Zeigler et al., 1999; Holvoet et al., 2003). Interessante ressaltar que evidências apontam o envolvimento de receptores tirosina quinase específicos, como EGFR, na expressão diferencial de moléculas de adesão e também na proteólise da matriz extracelular pela ação da MMP-9, sendo este evento dependente da ativação prolongada da ERK (McCawley et al., 1999). Estes fatos são consistentes com a inibição observada na atividade da MMP-2 e MMP-9 observada após exposição das células HaCaT aos diferentes agentes estressores.

O conhecimento e melhor compreensão das alterações moleculares e moléculas sinalizadoras envolvidas nos mecanismos de morte celular induzida pela exposição a diferentes agentes estressores é de fundamental importância para a determinação de novos alvos e desenvolvimento de terapias dermatológicas mais eficientes e sítio-dirigidas. Devido ao importante papel exercido por inúmeras quinases não avaliadas neste estudo pela técnica de

western blotting, em diferentes processos celulares, utilizou-se o PepChip como ferramenta adicional de investigação dos efeitos do sorbitol e do H₂O₂ nas células HaCaT (Parikh e Peppelenbosch, 2010). Desta maneira, o perfil de ativação de proteínas quinases de queratinócitos humanos expostos aos diferentes tipos de estresse foi determinado. A comparação dos resultados de controle *versus* sorbitol e controle *versus* H₂O₂ demonstrou modulação da atividade de importantes quinases relacionadas à ativação de vias de sobrevivência celular, como inibição de FGFR3 em ambos os modelos, aumento da atividade de EGFR e inibição de CK2 e Src no estresse oxidativo. Tanto EGFR como CK2 podem atuar, direta ou indiretamente, como moduladores positivos da atividade da Akt, mediando, assim, processos que garantem a sobrevivência celular (Yde et al., 2007; Calautti et al., 2005). A ativação da via PI3K/Akt em queratinócitos é decisiva para a manutenção da sobrevivência celular, protegendo as células da morte durante o processo de diferenciação celular (Calautti et al., 2005). No entanto, células expostas aos 2 tipos de estresse não apresentaram ativação de Akt e não houve diferenças na expressão da PKA α e da subunidade p85 da PI3K, avaliadas por citometria de fluxo e *western blotting* respectivamente. Estes dados sugerem uma menor contribuição da via de sobrevivência celular mediada pela PI3K/Akt nas alterações observadas nos queratinócitos após exposição ao estresse. Além disso, os resultados obtidos neste estudo sugerem alterações em quinases específicas dependendo do tipo de estresse, sendo interessante do ponto de vista de terapêutico.

A Figura 37 resume as principais alterações induzidas em queratinócitos pelo choque hiperosmótico (Fig. 37A) e estresse oxidativo (Fig. 37B), caracterizadas neste estudo. Em conjunto, os resultados demonstraram que ambos os agentes estressores induzem a geração de EROs, levando à morte de células HaCaT com participação da apoptose e ativação da cascata de sinalização mediada pela JNK. Em ambos os modelos a permeabilização da membrana mitocondrial é um evento central na indução da morte celular, embora os mecanismos moleculares associados ao comprometimento mitocondrial sejam distintos. Enquanto o sorbitol induz uma rápida despolarização da membrana mitocondrial, provavelmente devido à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, a oligomerização de proteínas *Bax-like* e consequente formação de poros na membrana mitocondrial externa explicaria a redução menos acentuada do $\Delta\psi_m$ nas células tratadas com H_2O_2 . Da mesma forma, diferenças importantes também foram observadas na ativação de caspases e na sinalização celular relacionada ao remodelamento do citoesqueleto, com destaque para a organização dos filamentos de actina e atividade da cofilina. Além disso, este estudo indicou a contribuição dos lisossomos na indução de morte celular e um importante mecanismo de modulação do estado redox celular que seria responsável pela oxidação reversível da LMW-PTP, a qual poderia atuar sobre diferentes efetores, como a quinase Src e, desta forma, contribuir para a morte celular bem como para as alterações atípicas observadas no citoesqueleto. Em resumo, esses resultados indicam diferenças importantes na resposta de queratinócitos humanos ao estresse oxidativo e ao choque hiperosmótico e reforçam a importância de se

caracterizar e analisar em conjunto os vários eventos moleculares e celulares envolvidos nessa resposta.

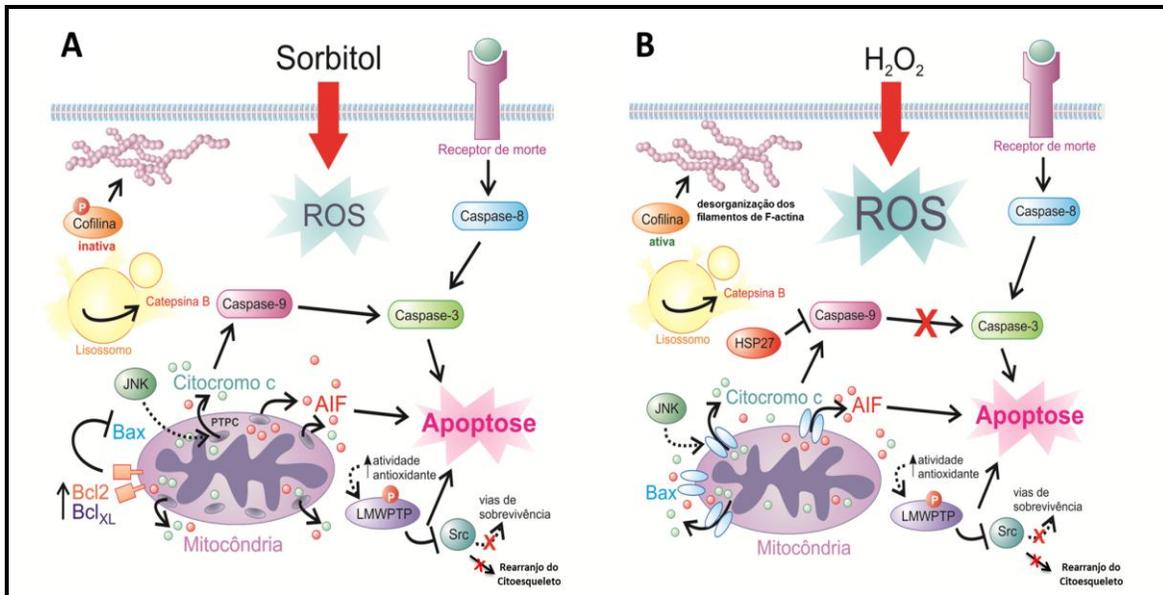


Figura 37: Representação esquemática dos efeitos moleculares do choque hiperosmótico e do estresse oxidativo em queratinócitos. Os resultados apresentados neste trabalho indicam a participação da apoptose na morte das células HaCaT expostas ao peróxido de hidrogênio (estresse oxidativo) e ao sorbitol (choque hiperosmótico). Em ambos os modelos, a indução de apoptose estaria associada à ativação da cascata de sinalização mediada pela JNK e ao aumento da produção intracelular de EROs. Além disso, a permeabilização da membrana mitocondrial possui um importante papel neste processo, sendo mediada por diferentes mecanismos dependendo do agente estressor. **(A)** A exposição das células ao sorbitol demonstrou a participação das vias intrínseca e extrínseca, com ativação de capases 8, 3 e 9. A liberação de AIF e citocromo c da mitocôndria para o citosol seria mediada pela formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, indicada pela rápida perda do $\Delta\psi_m$. **(B)** Por outro lado, nas células expostas ao H_2O_2 houve ativação apenas das capases 8 e 3, sendo a inibição da ativação da pró-caspase 9 provavelmente mediada pela ação da Hsp27. Neste modelo, a formação de poros na membrana mitocondrial externa, com liberação das proteínas apoptogênicas para o citoplasma celular, envolve a oligomerização de proteínas Bax-like. Além da mitocôndria, os lisossomos também contribuem na morte celular induzida por ambos os agentes estressores, conforme indicado pela ruptura da membrana lisossomal e liberação de catepsina B para o citosol. Além disso, as alterações incomuns no arranjo dos filamentos de actina observadas no modelo de estresse oxidativo indicam uma importante ação sobre proteínas do citoesqueleto, incluindo a cofilina. Finalmente, um aumento na defesa antioxidante celular seria fundamental para a manutenção da atividade da LMW-PTP e inibição da sinalização mediada pela Src. Ilustração: Sarah Azoubel Lima.

Certamente, esta abordagem assegura credibilidade ao modelo *in vitro* e permite sua aplicação em diferentes áreas da pesquisa básica e aplicada. De fato, este trabalho não só ampliou o conhecimento sobre os eventos

moleculares envolvidos na resposta de queratinócitos ao estresse oxidativo e ao choque hiperosmótico, ao caracterizar o papel de proteínas quinases e fosfatases e ao analisar a contribuição de diferentes organelas e do citoesqueleto no mecanismo de morte celular, mas também abriu novas perspectivas para dar continuidade ao estudo dos modelos propostos. De particular interesse são os efeitos dos dois tipos de estresse sobre componentes da matriz extracelular e sua relação com o processo de morte. Além disso, será fundamental aprofundar os estudos sobre os mecanismos que regulam o rearranjo do citoesqueleto e analisar o papel de proteínas lisossomais e do cálcio intracelular nos efeitos observados. Finalmente, é importante destacar a importante contribuição deste trabalho ao proporcionar modelos *in vitro* para aplicação no desenvolvimento de novos compostos para fins terapêuticos ou cosméticos.

Compostos biologicamente ativos destacam-se como potenciais fármacos ou candidatos a novas drogas estruturalmente e funcionalmente diversas, além de constituírem modelos moleculares de referência para a síntese de novos fármacos (KoeHN e Carter, 2005). Aliando estruturas moleculares complexas a uma ampla variedade de efeitos biológicos dentre os quais, ação anti-inflamatória, anti-alérgica, antitumoral e antioxidante, inúmeros compostos naturais apresentam potencial citoprotetor (Warskulat et al.; 2004 Cui et al.; 2004, El-Mahdy et al.; 2008). Recentemente, demonstrou-se que a riboflavina e seus fotoprodutos induzem a diferenciação de osteoblastos (Neto et al., 2010). A fim de se analisar seu potencial citoprotetor, soluções de riboflavina e de riboflavina irradiada foram utilizadas no pré-tratamento de células HaCaT submetidas aos dois tipos de estresse. Embora a riboflavina e a riboflavina irradiada não apresentassem

citotoxicidade às células HaCaT em uma ampla faixa de concentração, não houve ação citoprotetora contra o choque hiperosmótico e estresse oxidativo, nas condições experimentais testadas. É importante ressaltar que estes resultados não descartam a possibilidade de ação da riboflavina em outros tipos de patologias dermatológicas, ou em terapias combinadas.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que os danos causados aos queratinócitos pelo H_2O_2 e pelo sorbitol são irreversíveis, com indução de apoptose e necrose mediada pela ativação da cascata de sinalização da JNK. Enquanto no estresse oxidativo a permeabilização da membrana mitocondrial ocorre provavelmente devido à oligomerização de proteínas *Bax-like* e formação de poros na membrana mitocondrial externa, os dados sugerem que no choque hiperosmótico este evento está associado à rápida despolarização da membrana mitocondrial, mediada pela formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Em adição ao papel da mitocôndria nos mecanismos de morte, os resultados demonstraram comprometimento da membrana lisossomal, com extravasamento de catepsina B para o citosol, indicando que a morte celular ocorre por mecanismos dependentes e independentes de caspases. Resultados interessantes mostrando alterações morfológicas atípicas no citoesqueleto, principalmente no arranjo dos filamentos de actina em relação à cofilina foram obtidos, abrindo novas perspectivas de estudos neste sentido.

A investigação do estado redox celular indicou que estes eventos são mediados por espécies reativas de oxigênio, apesar do aumento observado na expressão de algumas enzimas associadas à defesa antioxidante celular, a qual seria responsável por prevenir a oxidação irreversível da LMWPTP. Este achado é particularmente interessante, pois a ativação desta fosfatase poderia desfosforilar receptores de fatores de crescimento, como o EGFR, e inibir vias de sinalização de sobrevivência celular.

Desta maneira, este estudo apresenta resultados inéditos e relevantes cientificamente, pois é o primeiro a demonstrar alterações no citoesqueleto e ação de proteínas quinases e fosfatases nos mecanismos que determinam o destino de queratinócitos expostos ao choque hiperosmótico e ao estresse oxidativo, contribuindo de maneira abrangente para o conhecimento da biologia dos queratinócitos. Além disso, a padronização e caracterização molecular dos modelos estudados possibilitarão a busca por novos ativos biológicos, capazes de modular as funções da pele num contexto preventivo ou terapêutico, podendo contribuir como plataformas para o desenvolvimento de fármacos de primeira linha, baseados em novos conceitos sobre as funções da pele em nível molecular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad I, Fasihullah Q, Noor A, Ansari IA, Ali QNM (2004a). Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *International Journal Pharmaceutics*. 280: 199-208.
- Ahmad I, Fasihullah Q, Vaid FHM (2006). Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 82: 21-27.
- Ahmad I, Fasihullah Q, Vaid FHM (2004b). A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 75: 13-20.
- Ahmed ST, Lionel B, Ivashkiv LB (2000). Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *Journal of Immunology*. 165: 5227-5237.
- Ahn KS, Moon KY, Lee J, Kim YS (2003). Downregulation of NF-kappaB activation in human keratinocytes by melanogenic inhibitors. *Journal of Dermatological Science*. 31: 193-201.
- Alexander DR (2000). The CD45 tyrosine phosphatase: appositive and negative regulator of immun cell function. *Seminars in Immunology*. 12: 349-359.
- Alidoost F, Gharagozloo M, Bagherpour B, Jafarian A, Sajjadi SE, Hourfar H, Moayedi B (2006). Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from beta-thalassemia major patients. *International Immunopharmacology*. 6: 1305-1310.
- Allen RG, Tresini M (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine*. 28: 463-499.
- Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH (2006). The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncology*. 2: 53-71.
- Allombert-Blaise C, Tamiji S, Mortier L, Fauvel H, Tual M, Delaporte E, Piette F, DeLassale EM, Formstecher P, Marchetti P, Polakowska R (2003). Terminal differentiation of human epidermal keratinocytes involves mitochondria and caspase-dependent cell death pathway. *Cell death & differentiation*. 10: 850-852.
- An SS, Fabry B, Mellema M, Bursac P, Gerthoffer WT, Kayyali US, Gaestel M, Shore SA, Fredberg JJ. (2004). Role of heat shock protein 27 in cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell. *Journal of Applied Physiology*. 96: 1701-1713.

- Anderson ME, Meister A (1989). Glutathione monoesters. *Analytical Biochemistry*. 183: 16-20.
- Aoyama H, Silva TMA, Miranda MA, Ferreira CV (2003). Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*. 26: 896-900.
- Arnoult D (2008). Apoptosis-associated mitochondrial outer membrane permeabilization assays. *Methods*. 44: 229-234.
- Arya R, Mallik M, Lakhotia SC (2007). Heat shock genes integrating cell survival and death. *Journal of Biosciences*. 32: 595-610.
- Assefa Z, Van Laethem A, Garmyn M, Agostinis P (2005). Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *BBA-Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 1755: 90-106.
- Assefa Z, Vantieghem A, Garmyn M, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede JR, Bouillon R, Merlevede W, Agostinis P (2000). p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 21416-21421.
- Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM (2006). Photodynamic therapy in dermatology. *European Journal of Dermatology*. 16: 340-348.
- Bach H, Sun JH, Mama Z, Av-Gay Y (2006). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis PtpA is an endogenous tyrosine phosphatase secreted during infection. *Infection and Immunity*. 74: 6540-6546.
- Bachmeier BE, Boukamp P, Lichtinghagen R, Fusenig NE, Fink E (2000). Matrix metalloproteinases-2,-3,-7,-9 and-10, but not MMP-11, are differentially expressed in normal, benign tumorigenic and malignant human keratinocyte cell lines. *Journal of Biological Chemistry*. 381: 497-507.
- Barbosa CM, Oliveira CR, Nascimento FD, Smith MC, Fausto DM, Soufen MA, Sena E, Araújo RC, Tersariol IL, Bincoletto C, Caires AC (2006). Biphosphinic palladacycle complex mediates lysosomal-membrane permeabilization and cell death in K562 leukaemia cells. *European Journal of Pharmacology*. 542: 37-47.
- Barford D, Dass AK, Egloff MP (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 27: 133-164.
- Bass DA; Parce W; Dechatelet LR; Szejda P, Seeds MC; Thomas M (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology*. 130: 1910-1917.

- Bauer MS, Aiken S (1989). The healing of open wounds. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal*. 4: 268-273.
- Berti A, Rigacci S, Raugei G, Degl'Innocenti D, Ramponi G (1994). Inhibition of cellular response to platelet-derived growth factor by low Mr phosphotyrosine protein phosphatase overexpression. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 349: 7-12.
- Bertollo CM, Oliveira ACP, Rocha LTS, Costa KA, Nascimento Jr. EB, Coelho MM (2006). Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of riboflavin in different experimental models *European Journal of Pharmacology*. 547: 184-191.
- Blair IA (2006). Endogenous glutathione adducts. *Current Drug Metabolism*. 7: 853-82.
- Bode AM, Dong Z (2003). Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Science Signaling: Journal and Knowledge Environment*. 167: RE2.
- Boehnke C, Reuter U, Flach U, Schuh-Hofer S, Einhäupl KM, Arnold G (2004). High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre. *European Journal of Neurology*. 11: 475-477.
- Borenfreund E, Puerner JA (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*. 24: 119-124.
- Bosco EE, Mulloy JC, Zheng Y (2009). Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66: 370-374.
- Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD (2005). Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*. 115: 2640-2647.
- Boudny V, Kovarik J (2002). JAK/STAT signaling pathways and cancer. *Janus kinases/signal transducers and activators of transcription*. *Neoplasma*. 49: 349-355.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal of Cell Biology*. 106: 761-771.
- Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, Alexander A, Diedrich MJ, Grossman D (2003). Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 120: 48-55.

- Boya P, Kroemer G (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 27: 6434-6451.
- Braga VMM, Maschio AD, Machesky L, Dejna E (1999). Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Molecular Biology of the Cell*. 10: 9-22.
- Brakebusch C, Fässler R (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 22: 2324-2333.
- Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 973: 31-43.
- Bröker LE, Kruyt FA, Giaccone G (2005). Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Research*. 11: 3155-3162.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biology*. 2: 645-652.
- Brutus NA, Hanley S, Ashraf QM, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (2009). Effect of hyperoxia on serine phosphorylation of apoptotic proteins in mitochondrial membranes of the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurochemical Research*. 34: 1219-1225.
- Burke TR Jr, Zhang ZY (1998). Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers*. 47: 225-241.
- Bursch W (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell death & differentiation*. 8: 569-581.
- Calautti E, Li J, Saoncella S, Brissette JL, Goetinck PF (2005). Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 32856-32865.
- Campbell C, Quinn AG, Angus B, Farr PM, Rees JL (1993). Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Research*. 53: 2697-2699.
- Camporeale G, Zemleni J (2003). Oxidative folding of interleukin-2 is impaired in flavin-deficient Jurkat cells, causing intracellular accumulation of interleukin-2 and increased expression of stress response genes. *Journal of Nutrition*. 133: 668-672.

- Candé C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G (2004). Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell death & differentiation*. 11: 591-595.
- Cao J, Sun W, Zhou G, Xu X, Peng Z, Hu Z (2010). Morphological and Biochemical Assessment of Apoptosis in Different Skeletal Muscles of Bulls during Conditioning. *Journal of Animal Science*. 88: 3439-3444.
- Carraway CAC. The cytoskeleton in the transduction of signal and regulation of cellular function. In *Cytoskeleton: signaling and cellular regulation*. New York, Oxford University Press, 2000, pp. 17.
- Caselli A, Marzocchini R, Camici G, Manao G, Moneti G, Pieraccini G, Ramponi G (1998). The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 32554-32560.
- Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB (2008). Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell death & differentiation*. 15: 171-182.
- Cheng H, Kartenbeck J, Kabsch K, Mao X, Marques M, Alonso A (2002). Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. *Journal of Cellular Physiology*. 192: 234-243.
- Chiang CW, Kanies C, Kim KW, Fang WB, Parkhurst C, Xie M, Henry T, Yang E (2003). Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for Bad-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 23: 6350-6362.
- Chiarugi P, Cirri P (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*. 28: 509-514.
- Chiarugi P, Taddei ML, Cirri P, Talini D, Buricchi F, Camici G, Manao G, Raugei G, Ramponi G (2000). Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase controls the rate and the strength of NIH-3T3 cells adhesion through its phosphorylation on tyrosine 131 or 132. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 37619-37627.
- Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM, Green DR (1992). Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Research*. 52: 997-1005.
- Cox BD, Natarajan M, Stettner MR, Gladson CL (2006). New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 99: 35-52.

- Criollo A, Galluzzi L, Maiuri MC, Tasdemir E, Lavandro S, Kroemer G (2007). Mitochondrial control of cell death induced by hyperosmotic stress. *Apoptosis*. 12: 3-18.
- Cui Y, Kim DS, Parck KC (2004). Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 96: 79-85.
- Curtin JF, Donovan M, Cotter TG (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*. 265: 49-72.
- Machado D, Silva RA, Justo GZ, Paredes-Gamero EJ, Souza ACS, Ferreira CV, Shishido SM (2010). Riboflavin associated to UVA radiation triggers senescence and death of fibroblast and keratinocytes: possible potential for photodynamic therapy purposes. *Journal of Dermatological Science* (submitted).
- Dascalu A, Matthey A, Oron Y, Korenstein R (2000). A hyperosmotic stimulus elevates intracellular calcium and inhibits proliferation of a human keratinocyte cell line. *Journal of Investigative Dermatology*. 115: 714-718.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes and Development*. 13: 2905-2927.
- Degtarev A, Boyce M, Yuan J (2003). A decade of caspases. *Oncogene*. 22: 8543-8567.
- Denda M, Sato J, Masuda Y, Tsuchiya T, Koyama J, Kuramoto M, Elias PM, Feingold KR (1998). Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function. *Journal of Investigative Dermatology*. 111: 858-63.
- Denning MF (2004). Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36: 1141-1146.
- Diker-Cohen T, Koren R, Ravid A (2006). Programmed cell death of stressed keratinocytes and its inhibition by vitamin D: the role of death and survival signaling pathways. *Apoptosis*. 11: 519-534.
- Diks SH, Kok K, O'Toole T, Hommes DW, van Dijken P, Joore J, Peppelenbosch MP (2004). Kinome profiling for studying lipopolysaccharide signal transduction in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 49206-49213.
- Diks SH, Peppelenbosch MP (2004). Single cell proteomics for personalised medicine. *Trends in Molecular Medicine*. 10: 574-577.
- Donepudi M, Grütter M (2002). Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry*. 101-102: 145-153.

- Dröge W (2002). Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Experimental Gerontology*. 37: 1333-1345.
- Eckert RL, Efimova T, Dashti SR, Balasubramanian S, Deucher A, Crish JF, Sturniolo M, Bone F (2002). Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 7: 36-40.
- Edwards AM, Barredo F, Silva E, De Ioannes AE, Becker MI (1999). Apoptosis induction in nonirradiated human HL60 and murine NOS/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin. *Photochemistry and Photobiology*. 70: 645-649.
- Edwards AM, Silva E, Jofre B, Becker MI, De Ioannes AE (1994). Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 24: 179-186.
- Efimova T, Broome AM, Eckert RL (2004). Protein kinase C delta regulates keratinocyte death and survival by regulating activity and subcellular localization of a p38 delta-extracellular signal-regulated kinase 1/2 complex. *Molecular and Cellular Biology*. 24: 8167-8183.
- Efimova T, Deucher A, Kuroki T, Ohba M, Eckert RL (2002). Novel protein kinase C isoforms regulate human keratinocyte differentiation by activating a p38 delta mitogen-activated protein kinase cascade that targets CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 31753-31760.
- Eisner V, Criollo A, Quiroga C, Olea-Azar C, Santibañez JF, Troncoso R, Chiong M, Díaz-Araya G, Foncea R, Lavandero S (2006). Hyperosmotic stress-dependent NFkappaB activation is regulated by reactive oxygen species and IGF-1 in cultured cardiomyocytes. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 580: 4495-500.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Patnaik S, Zhao Q, Arafa el-S, Barakat B, Mir SN, Wani AA (2008). Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. *Photochemistry and Photobiology*. 84: 307-316.
- Fehrenbacher N, Jäättelä M (2005). Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Research*. 65: 2993-2995.
- Feissner R, Skalska J, Gaum WE, Sheu S-S (2009). Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Frontiers in Bioscience*. 14: 1197-1218.

- Ferreira CV, Justo GZ, Souza AC, Queiroz KC, Zambuzzi WF, Aoyama H, Peppelenbosch MP (2006). Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives. *Biochimie*. 88: 1859-1873.
- Ferri KF, Kroemer G (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology*. 3: E255-E263.
- Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jäättelä M (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *Journal of Cell Biology*. 153: 999-1010.
- Freinkel RK, Woodley DT. *The Biology of the Skin*. New York, Parthenon Publishing, 2001; pp. 19-45.
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th ed., New York, Wiley-Liss, 2005, pp. 345-352.
- Fuchs E, Byrne C (1994). The epidermis: rising to the surface. *Current Opinion in Genetics and Development*. 4: 725-736.
- Galan JE, Bliska JB (1996). Cross talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 12: 221-255.
- Gandarillas A (2000). Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Experimental Gerontology*. 35: 53-62.
- Garach-Jehoshua O, Ravid A, Liberman UA, Koren R (1999). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases the growth-promoting activity of autocrine epidermal growth factor receptor ligands in keratinocytes. *Endocrinology*. 140: 713-721.
- Garcia Bartels N, Scheufele R, Prosch F, Schink T, Proquitté H, Wauer RR, Blume-Peytavi U (2010). Effect of standardized skin care regimens on neonatal skin barrier function in different body areas. *Pediatric Dermatology*. 27: 1-8.
- Garcia-Zuazaga J, Cooper KD, Baron ED (2005). Photodynamic therapy in dermatology: current concepts in the treatment of skin cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 5: 791-800.
- Garmyn M, Mammone T, Pupe A, Gan A, Declercq L, Maes D (2001). Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 Map Kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *The Society for Investigative Dermatology*. 117: 1290-1295.

- Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G (2006a). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*. 5: 2592-2601.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G (2006b). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell death & differentiation*. 13: 1423-1433.
- Ghaffar SA, Clements SE, Griffiths CE (2005). Modern management of psoriasis. *Clinical Medicine*. 5: 564-568.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 55: 178-194.
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 278: 16-27.
- Golstein P, Kroemer G (2007). A multiplicity of cell death pathways. Symposium on apoptotic and non-apoptotic cell death pathways. *European Molecular Biology Organization. Reports*. 8: 829-833.
- Gonzalez H (2010). Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 9: 482-488.
- Green DR, Kroemer G (2005). Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *Journal of Clinical Investigation*. 115: 2610-2617.
- Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281: 1309-1312.
- Grether-Beck S, Olaizola-Horn S, Schmitt H, Grewe M, Jahnke A, Johnson JP, Briviba K, Sies H, Krutmann J (1996). Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 14586-14591.
- Grimble RF (1997). Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 67: 312-320.
- Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH, Gores GJ (2000). Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Clinical Investigation*. 106: 1127-1137.

- Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ (2004). Lysosomes in cell death. *Oncogene*. 23: 2881-2890.
- Guimarães CA, Linden R (2004). Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles. *European Journal of Biochemistry*. 271: 1638-1650.
- Gutcher I, Webb PR, Anderson NG (2003). The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60: 1061-1070.
- Haass NK, Smalley KSM, Li L, Herlyn M (2006). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research*. 18: 150-159.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*. 186: 1-5.
- Haneda M, Sugimoto T, Kikkawa R (1999). Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *European Journal of Pharmacology*. 365: 1-7.
- Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A (2005). JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News and Perspectives*. 18: 243-149.
- Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D (2004). Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene*. 23: 2850-2860.
- Hetz C, Glimcher L (2008). The daily job of night killers: alternative roles of the Bcl-2 family in organelle physiology. *Trends in Cell Biology*. 18: 38-44.
- Holvoet S, Vincent C, Schmitt D, Serres M (2003). The inhibition of MAPK pathway is correlated with down-regulation of MMP-9 secretion induced by TNF-alpha in human keratinocytes. *Experimental Cell Research*. 290: 108-119.
- Holzer W, Shirdel J, Penzkofer A, Hegemann P, Deutzmann R, Hochmuth E (2005). Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution. *Chemical Physics*. 308: 69-78.
- Huh JE; Kang KS; Chae C; Kim HM; Ahn KS, Kim SH (2004). Roles of p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways during cantharidin-induced apoptosis in U937 cells. *Biochemical Pharmacology*. 67: 1811-1818.
- Hustad S, Ueland PM, Schneede J (1999). Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Clinical Chemistry*. 45: 862-868.

- Huyter G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payett P, Kennedy B, Tsapralis G, Gresse MJ, Ramachandran C (1995). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *Journal of Biological Chemistry*. 10: 843-851.
- Jeong SY, Seol DW (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*. 41: 11-22.
- Johansson N, Ahonen M, Kahari VM (2000a). Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57: 5-15.
- Johansson N, Ala-aho R, Uitto V, Grenman R, Fusenig NE, Lopez-Otin C, Kahari VM (2000b). Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Cell Science*. 113: 227-235.
- Jonas R, Silveira MM (2004). Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 118: 321-336.
- Jost M, Huggett TM, Kari C, Rodeck U (2001). Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 1519-1527.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology*. 6: 199-213.
- Kim S, Coulombe PA (2010). Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11: 75-81.
- Kirkegaard T, Jäättelä M (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1793: 746-754.
- Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, Yu LR, Veenstra TD, Shacter E (2009). Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nature Cell Biology*. 11: 1241-1246.
- Kobayashi T, Hattori S, Nagai Y, Tajima S, Nishikawa T (1998). Differential regulation of MMP-2 and MMP-9 gelatinases in cultured human keratinocytes. *Dermatology*. 197: 1-5.
- Koehn FE, Carter GT (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 4: 206-220.
- Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B (2002). Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods*. 265: 97-110.

- Krebs EG, Graves JD (2000). Interactions between protein kinases and proteases in cellular signaling and regulation. *Advances in Enzyme Regulation*. 40: 441-470.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*. 60: 619-642.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*. 87: 99-163.
- Kroemer G, Jäätelä M (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews Cancer*. 5: 886-897.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemir ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton AS, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*. 16: 3-11.
- Krutmann J (2006). The interaction of UVA and UVB wavebands with particular emphasis on signaling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 92: 105-107.
- Krysko DV, Berghe TV, D'Herde K, Vandenabeele P (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 44: 205-221.
- Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ (1994). Gamma-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 11: 586-592.
- Kyriakis JM, Avruch J (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews*. 81: 807-869.
- Lamaestro BM, Malone M (1995). Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Annals of Pharmacotherapy*. 12: 1263-1273.
- Leadsham JE, Kotiadis VN, Tarrant DJ, Gourlay CW (2010). Apoptosis and the yeast actin cytoskeleton. *Cell death & differentiation*. 17: 754-762.
- Lee AY, Kim NH, Choi WI, Youm YH (2005). Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-blistered epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology*. 124: 976-983.

- Lee YS, Jin DQ, Beak SM, Lee ES, Kim JA (2003). Inhibition of ultraviolet A modulated signaling pathways by asiatic acid and ursolic acid in HaCaT human keratinocytes. *European Journal of Pharmacology*. 476: 173-178.
- Lei K, Roger J, Davis RD (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 2432-2437.
- Leist M, Jäätelä M (2001). Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell death & differentiation*. 8: 324-326.
- Levine JA, Sorace M, Spencer J, Siegel DM (2005). The indoor UV tanning industry: a review of skin cancer risk, health benefit claims, and regulation. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 53: 1038-1044.
- Liu J, Lin A (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Research*. 15: 36-42.
- Liu T, Biddle D, Hanks AN, Brouha B, Yan H, Lee RM, Leachman SA, Grossman D (2006). Activation of dual apoptotic pathways in human melanocytes and protection by Survivin. *Journal of Investigative Dermatology*. 126: 2247-2256.
- Lorin S, Pierron G, Ryan KM, Codogno P, Djavaheri-Mergny M (2010). Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signalling pathways in the regulation of autophagy. *Autophagy*. 6: 153-154.
- Los M, Burek CJ, Stroh C, Bebedyk K, Hug H, Mackiewicz A (2003). Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as target for drug design. *Drug Discovery Today*. 8: 67-77.
- Lovelace MD, Cahill DM (2007). A rapid cell counting method utilising acridine orange as a novel discriminating marker for both cultured astrocytes and microglia. *Journal of Neuroscience Methods*. 165: 223-229.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Maldonado C, Cea P, Adasme T, Collao A, Díaz-Araya G, Chiong M, Lavandero S (2005). IGF-1 protects cardiac myocytes from hyperosmotic stress-induced apoptosis via CREB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 336: 1112-1118.
- Mammone T, Ingrassia M, Goyarts E (2008). Osmotic stress induces terminal differentiation in cultured normal human epidermal keratinocytes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. 44: 135-139.

- Manthey KC, Chew YC, Zempleni J (2005). Riboflavin deficiency impairs oxidative folding and secretion of apolipoprotein B-100 in HepG2 cells, triggering stress response systems. *Journal of Nutrition*. 135: 978-982.
- Manthey KC, Rodriguez-Melendez R, Hoi JT, Zempleni J (2006). Riboflavin deficiency causes protein and DNA damage in HepG2 cells, triggering arrest in G1 phase of the cell cycle. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 17: 250-256.
- Maruoka Y, Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Kurokawa H, Kajiyama M, Toyoshima K (1997). Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 238: 886-890.
- Masotti L, Lenaz G, Spisni A, Urry DW (1974). Effect of phospholipids on the protein conformation in the inner mitochondrial membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 56: 892-897.
- Massey V (2000). The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions*. 28: 283-296.
- Matsumura Y, Ananthaswamy HN (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 195: 298-308.
- Matsuzawa A, Nishitoh H, Tobiume K, Takeda K, Ichijo H (2002). Physiological roles of ASK-1 mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: Advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxidants and Redox Signaling*. 4: 415-452.
- Maziere C, Conte MA, Leborgne L, Levade T, Hornebeck W, Santus R, Maziere JC (2001). UVA radiation stimulates ceramide production: relationship to oxidative stress and potential role in ERK, JNK, and p38 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 281: 289-294.
- McCall MR, Frei B (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology & Medicine*. 26: 1034-1053.
- McConkey DJ, Orrenius S (1996). Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells*. 14: 619-631.
- Mégnin-Chanet F, Bollet MA, Hall J (2010). Targeting poly(ADP-ribose) polymerase activity for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67: 3649-62.
- Meister A (1984). New aspects of glutathione biochemistry and transport--selective alteration of glutathione metabolism. *Nutrition Reviews*. 42: 397-410.

- Merk HF, Baron JM, Heise R, Fritsche E, Schroeder P, Abel J, Krutmann J (2006). Concepts in molecular dermatotoxicology. *Experimental Dermatology*. 15: 692-704.
- Milani R, Ferreira CV, Granjeiro JM, Paredes-Gamero EJ, Silva RA, Justo GZ, Nader HB, Galembeck E, Peppelenbosch MP, Aoyama H, Zambuzzi WF (2010). Phosphoproteome reveals an atlas of protein signaling networks during osteoblast adhesion. *Journal of Cellular Biochemistry*. 109: 957-966.
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *Journal of Cell Biology*. 140: 627-636.
- Miron T, Vancompernelle K, Vandekerckhove J, Wilchek M, Geiger B (1991). A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *Journal of Cell Biology*. 114: 255-261.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 56-68.
- Modesti A, Marzocchini R, Raugei G, Chiti F, Sereni A, Magherini F, Ramponi G (1998). Cloning, expression and characterisation of a new human low Mr phosphotyrosine protein phosphatase originating by alternative splicing. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 431: 111-115.
- Morceau F, Duvoix A, Delhalle S, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M (2004). Regulation of glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*. 67: 1227-1238.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.
- Murphy MP, (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 417: 1-13.
- Nayak CS (2005). Photodynamic therapy in dermatology. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology*. 71: 155-160.
- Nestor MS, Gold MH, Kauvar AN, Taub AF, Geronemus RG, Ritvo EC, Goldman MP, Gilbert DJ, Richey DF, Alster TS, Anderson RR, Bank DE, Carruthers A, Carruthers J, Goldberg DJ, Hanke CW, Lowe NJ, Pariser DM, Rigel DS, Robins P, Spencer JM, Zelickson BD (2006). The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference. *Journal of Drugs in Dermatology*. 5: 140-154.

- Neto AH, de Souza Queiroz KC, Milani R, Paredes-Gamero EJ, Justo GZ, Peppelenbosch MP, Ferreira CV (2011). Profiling the changes in signaling pathways in ascorbic acid/beta-glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 112: 71-77.
- Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Bacon P, Panella J, Denning MF (2002). Life and death signaling pathways contributing to skin cancer. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 7: 27-35.
- Nielsen M.-B, Christensen ST, Hoffmann EK (2008). Effects of osmotic stress on the activity of MAPKs and PDGFR-mediated signal transduction in NIH-3T3 fibroblasts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 294: C1046-C1055.
- Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B (2010). Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 396: 95-100.
- Nordberg J, Arnér ES (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*. 31: 1287-1312.
- O'Toole EA (2001). Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clinical and Experimental Dermatology*. 26: 525-530.
- Oberley LW (2005). Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomedicine e Pharmacotherapy*. 59: 143-148.
- Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA (1990). Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 5144-5147.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4: 552-565.
- Ostman A, Bohmer FD (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends in Cell Biology*. 11: 258-266.
- Pannifer AD, Flint AJ, Tonks NK, Barford D(1998). Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 10454-10462.
- Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, Maellaro E, Pompella A (2002). Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochemical Pharmacology*. 64: 1027-1035.

- Parikh K, Peppelenbosch MP (2010). Kinome profiling of clinical cancer specimens. *Cancer Research*. 70: 2575-2578.
- Park SJ, Kim HY, Kim H, Park SM, Joe E, Jou I, Choi YH (2009). Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology domain-containing protein-tyrosine phosphatase in astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 46: 1694-1702.
- Parone PA, Martinou JC (2006). Mitochondrial fission and apoptosis: An ongoing trial. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763: 522-530.
- Parsad D, Kanwar AJ, Kumar B (2006). Psoralen-ultraviolet A vs. narrow-band ultraviolet B phototherapy for the treatment of vitiligo. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 20: 175-177.
- Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S (2002). Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Molecular Cell Biology*. 22: 816-834.
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G (2003). Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 17: 2202-2208.
- Piepkorn M, Pittelkow MR, Cook PW (1998). Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *Journal of Investigative Dermatology*. 111: 715-721.
- Popoff MR, Geny B (2009). Multifaceted role of Rho, Rac, Cdc42 and Ras in intercellular junctions, lessons from toxins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788: 797-812.
- Queiroz AF, Silva RA, Moura RM, Dreyfuss JL, Paredes-Gamero EJ, Souza AC, Tersariol IL, Santos EA, Nader HB, Justo GZ, de Sales MP (2009). Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 63: 1023-1033.
- Queiroz KSC, Zambuzzi WF, Souza ACS, Silva RA, Machado D, Justo GZ, Carvalho HF, Peppelenbosch MP, Ferreira CF (2007). A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Letters*. 258: 126-134.
- Raj D, Brash DE, Grossman D (2006). Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *Journal of Investigative Dermatology*. 126: 243-257.
- Rajpert-De ME, Shi M, Chang M, Robison TW, Groffen J, Heisterkamp N, Forman HJ (1992). Transfection with gamma-glutamyl transpeptidase enhances recovery from glutathione depletion using extracellular glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 114: 56-62.

- Ravanti L, Kahari VM (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair. *International Journal of Molecular Medicine*. 6: 391-407.
- Ravid A, Rubinstein E, Gamady A, Rotem C, Liberman UA, Koren R (2002). Vitamin D inhibits the activation of stress-activated protein kinases by physiological and environmental stresses in keratinocytes. *Journal of Endocrinology*. 173: 525-532.
- Reinehr R, Häussinger D (2006). Hyperosmotic activation of the CD95 death receptor system. *Acta Physiologica*. 187: 199-203.
- Resch U, Schichl YM, Sattler S, Martin R (2008). XIAP regulates intracellular ROS by enhancing antioxidant gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 375: 156-161.
- Rittié L, Fisher GJ (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews*. 1: 705-720.
- Robbins SL, Cotran RS. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. Rio de Janeiro, Elsevier Publishing, 2005, pp. xx-xx.
- Rodríguez I, Kaszkin M, Holloschi A, Kabsch K, Marqués MM, Mao X, Alonso A (2002). Hyperosmotic stress induces phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in HaCaT cells by an epidermal growth factor receptor-mediated process. *Cellular Signalling*. 14: 839-848.
- Roux PP, Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 320-44.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Molecular and Cellular Biology* 14: 1680-1688.
- Schieke SM, Ruwiedel K, Gers-Barlag H, Grether-Beck S, Krutmann J (2005). Molecular crosstalk of the ultraviolet A and ultraviolet B signaling responses at the level of mitogen-activated protein kinases. *Journal of Investigative Dermatology*. 124: 857-859.
- Schieke SM, von Montfort C, Buchczyk DP, Timmer A, Grether-Beck S, Krutmann J, Holbrook NJ, Klotz LO (2004). Singlet oxygen-induced attenuation of growth factor signaling: possible role of ceramides. *Free Radical Research*. 38: 729-737.
- Schmitt E, Sané AT, Bertrand R (1999). Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis. *Drug Resistance Updates*. 2: 21-29.

- Schönthal AH (2001). Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Letters*. 170: 1-13.
- Scorrano L (2005). Proteins that fuse and fragment mitochondria in apoptosis: confining a deadly con-fusion? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 37: 165-170.
- Shapiro SD, Kelley D, Kobayashi D (2001). Measurement of metalloproteinases. *Methods in Molecular Medicine*. 56: 383-390.
- Shimizu H, Banno Y, Sumi N, Naganawa T, Kitajima Y, Nozawa Y (1999). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UVB-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 112: 769-774.
- Sies H (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*. 27: 916-921.
- Sitalo LA, Tibudan SS, Denning MF (2002). Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 19346-19352.
- Sivaguru M, Ezaki B, He ZH, Tong H, Osawa H, Baluska F, Volkmann D, Matsumoto H (2003). Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 132: 2256-2566.
- Souza AC, Azoubel S, Queiroz KC, Peppelenbosch MP, Ferreira CV (2009). From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66: 1140-1153.
- Souza AC, Kodach L, Gadelha FR, Bos CL, Cavagis AD, Aoyama H, Peppelenbosch MP, Ferreira CV (2006a). A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. *Apoptosis*. 11: 1761-1771.
- Souza ACS, Cavagis ADM, Jucá MB, Ferreira CV, Aoyama H, Peppelenbosch MP (2005). Riboflavin: a multifunctional vitamin. *Química Nova* 28: 887-891.
- Souza NJA, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C (2006b). Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *International Endodontic Journal*. 39: 40-47.
- Sun M, Meares G, Song L, Jope RS (2009). XIAP associates with GSK3 and inhibits the promotion of intrinsic apoptotic signaling by GSK3. *Cellular Signalling*. 21: 1857-1865.

- Svobodová A, Walterová D, Psotová J (2006). Influence of silymarin and its flavonolignans on H₂O₂-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts. *Burns*. 32: 973-979.
- Takahashi A; Masuda A, Sun M; Centonze VE, Herman B (2004). Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). *Brain Research Bulletin*. 62: 497-504.
- Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A, Namikawa K, Miwa A, Okado H, Kiyama H, Iizuka H (2001). In vitro and in vivo transfer of Bcl-2 gene into keratinocytes suppresses UVB-induced apoptosis. *Photochemistry and Photobiology*. 74: 579-586.
- Tamura Y, Simizu S, Osada H (2004). The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Letters*. 569: 249-255.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9: 231-241.
- Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB (2010). Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends in Cell Biology*. 20: 79-91.
- Tonks NK (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7: 833-846.
- Tracey AS (2000). Hydroxamido vanadates: aqueous chemistry and function in protein tyrosine phosphatases and cell cultures. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 80: 11-16.
- Tran TH, Andreka P, Rodrigues CO, Webster KA, Bishopric NH (2007). Jun Kinase delays Caspase-9 activation by interaction with the apoptosome. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 20340-20350.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2009). Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovascular Research*. 81: 449-456.
- Turk B, Stoka V (2007). Protease signaling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 581: 2761-2767.
- Turk B, Stoka V, Rozman-Pungercar J, Cirman T, Droga-Mazovec G, Oresić K, Turk V (2002). Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biological Chemistry*. 383: 1035-1044.

- Tyurin VA, Tyurina YY, Ritov VB, Lysytsya A, Amoscato AA, Kochanek PM, Hamilton R, Dekosky ST, Greenberger JS, Bayir H, Kagan VE (2010). Oxidative lipidomics of apoptosis: quantitative assessment of phospholipid hydroperoxides in cells and tissues. *Methods in Molecular Biology*. 610: 353-374.
- Uchida Y, Houben E, Park K, Douangpanya S, Lee YM, Wu BX, Hannun YA, Radin NS, Elias PM, Holleran WM (2010). Hydrolytic pathway protects against ceramide-induced apoptosis in keratinocytes exposed to UVB. *Journal of Investigative Dermatology* 130: 2472-2480.
- Versteeg HH, Nijhuis E, Van Den Brink GR, Evertzen M, Pynaert GN, Deventer SJW, Coffe PJ and Peppelenbosch MP (2000). A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein. *Biochemical Journal*. 350: 717-722.
- Vihinen P, Ala-aho R, Kahari VM (2005). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 5: 203-220.
- Wada T, Penninger JM (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 23: 2838-2849.
- Walton KM, Dixon JE (1993). Protein tyrosine phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*. 62: 101-120.
- Wang HQ, Quan T, He T, Franke TF, Voorhees JJ, Fisher GJ (2003). Epidermal growth factor receptor-dependent, NFkappaB-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases-3, -8, and -9 in human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 45737-45745.
- Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochemical Journal*. 333: 291-300.
- Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ (2000). Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 14624-14631.
- Warskulat U, Reinen A, Grether-Beck S, Krutmann J, Haussinger D (2004). The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in maintaining cell homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 123: 516-521.
- Watson A, Morris VL, Chan BM (2009). Coordinated integrin and growth factor regulation of primary keratinocyte migration mediated through extracellular signal regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Archives of Dermatological Research*. 301: 307-317.

- Watt FM (1989). Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Current Opinion in Biotechnology*. 1: 1107-1015.
- Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK (1996). Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Letters*. 98: 129-135.
- Weichenthal M, Schwarz T (2005). Phototherapy: how does UV work? *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*. 21: 260-266.
- Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Gores GJ (2002). Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 283: G947-G956.
- Wiggan O, Bernstein BW, Bamburg JR (2005). A phosphatase for cofilin to be HAD. *Nature Cell Biology*. 7: 8-9.
- Wiland AM, Denu JM, Mourey RJ, Dixon JE (1996). Purification and kinetic characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphatase rVH6. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 33486-3392.
- Wilkinson JC, Wilkinson AC, Galbán S, Csomos AC, Duckett C (2008). Apoptosis-inducing factor is a target for ubiquitination through interaction with XIAP. *Molecular Cell Biology*. 28: 237-247.
- Xia Y, Wang J, Liu TJ, Yung WKA, Hunter T, Lu Z (2007). c-Jun downregulation by HDAC3-dependent transcriptional repression promotes osmotic stress-induced cell apoptosis. *Molecular Cell Biology*. 25: 219-232.
- Xu D, Qui CK (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Frontiers in Bioscience*. 13: 4925-4932.
- Xu R, Boudreau A, Bissell MJ (2009). Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices. *Cancer and Metastasis Reviews*. 28: 167-176.
- Yagi R, Waguri S, Sumikawa Y, Nada S, Oneyama C, Itami S, Schmedt C, Uchiyama Y, Okada M (2007). C-terminal Src kinase controls development and maintenance of mouse squamous epithelia. *European Molecular Biology Organization Journal*. 26: 1234-1244.
- Yde CW, Frogne T, Lykkesfeldt AE, Fichtner I, Issinger OG, Stenvang J (2007). Induction of cell death in antiestrogen resistant human breast cancer cells by the protein kinase CK2 inhibitor DMAT. *Cancer Letters*. 256: 229-237.

- You M, Yu D-H, Feng G-S (1999). Shp-2 Tyrosine Phosphatase functions as a negative regulator of the Interferon-Stimulated Jak/STAT pathway. *Molecular Cell Biology*. 19: 2416-2424.
- Yu BP (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 74: 139-162.
- Yu LG, Packman LC, Weldon M, Hamlett J, Rhodes JM (2004). Protein phosphatase 2A, a negative regulator of the ERK signaling pathway, is activated by tyrosine phosphorylation of putative HLA class II-associated protein I (PHAPI)/pp32 in response to the antiproliferative lectin, jacalin. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 41377-41383.
- Zambuzzi WF, Bruni-Cardoso A, Granjeiro JM, Peppelenbosch MP, de Carvalho HF, Aoyama H, Ferreira CV (2009). On the road to understanding of the osteoblast adhesion: cytoskeleton organization is rearranged by distinct signaling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*. 108: 134-144.
- Zambuzzi WF, Granjeiro JM, Parikh K, Yuvaraj S, Peppelenbosch MP, Ferreira CV (2008). Modulation of Src activity by low molecular weight protein tyrosine phosphatase during osteoblast differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 22: 497-506.
- Zeigler ME, Chi Y, Schmidt T, Varani J (1999). Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 180: 271-284.
- Zhang W, Yamada H, Sakai N, Nikawa S, Nozawa Y (1992). Enhancement of radio-sensitivity by tamoxifen in C6 glioma cells. *Neurosurgery*. 31: 125-130.
- Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 265: 16330-16336.
- Zhang ZY (2002). Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 42: 209-234.
- Zhang ZY (2005). Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1754: 100-107.

8. ANEXO

Artigos completos publicados, aceitos ou submetidos

Boleti APA, Ventura CA, Justo GZ, **Silva RA**, Sousa ACT, Ferreira CV, Yano T, Macedo MLR (2007). Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. *Toxicon* 51: 1321-30.

Queiroz KSC, Zambuzzi WF, Souza ACS, **Silva RA**, Machado D, Justo GZ, Carvalho HF, Peppenbosch MP, Ferreira CF (2007). A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Letters*. 258: 126-134.

Brito AS, Arimatéia DS, Souza LR, Lima MA, Ferreira PA, **Silva RA**, Ferreira CV, Justo GZ, Leite EL, Andrade GPV, Oliveira FW, Nader HB, Chavante SF (2008). Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anticoagulant activity isolated from a *marine shrimp*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 16: 9588-95.

Queiroz AFS, **Silva RA**, Moura RM, Dreyfuss JL, Paredes-Gamero EJ, Souza ACS, Tersariol ILS, Santos EA, Nader HB, Justo GZ, Sales MP (2009). Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 63: 1023-1033.

Milani R, Ferreira CV, Granjeiro JM, Paredes-Gamero EJ, **Silva RA**, Justo GZ, Nader HB, Galembeck E, Peppelenbosch MP, Aoyama H, Zambuzzi WF (2010). Phosphoproteome reveals an atlas of protein signaling networks during osteoblast adhesion. *Journal of Cellular Biochemistry*. 109: 957-966.

Marcato PD, Caverzan J, Rossi-Bergmann B, Pinto EF, Machado D, **Silva RA**, Justo GZ, Ferreira CV, Durán N. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (no prelo).

Stéfani D, Paula AJ, Vaz BG, **Silva RA**, Andrade NF, Justo GZ, Ferreira CV, Souza Filho AG, Eberlin NM, Alves OL (2011). Structural and proactive safety aspects of oxidation debris from multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials* (no prelo).

Machado D, **Silva RA**, Justo GZ, Souza ACS, Ferreira CV, Shishido SM (2010). UVA radiation dose employed in phototoxicity test resulted in metabolic alterations in fibroblasts and keratinocytes. *Journal of the American Academic of Dermatology* (submetido).

Machado D, **Silva RA**, Justo GZ, Paredes-Gamero EJ, Souza ACS, Ferreira CV, Shishido SM (2010). Riboflavin associated to UVA radiation triggers senescence and death of fibroblast and keratinocytes: possible potential for photodynamic therapy purposes. *Journal of Dermatological Science* (submetido).

Silva RA, Paredes-Gamero EJ, Machado D, Zambuzzi WF, Souza ACS, Justo GZ (2011). Context dependent hyperosmotic stress-induced keratinocytes death: Influence of the cellular redox environment on Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase activation. *Free Radical Biology & Medicine* (submetido).

Trabalho completo publicado em anais de congressos

Sousa ACT, Queiroz KCS, Zambuzzi WF, Silva RA, Justo GZ, Carvalho HF, Ferreira CV (2007). Ação promissora da riboflavina irradiada como agente antitumoral e antimetastático. Workshop em "Terapia Fotodinâmica: Integração dos Aspectos Moleculares Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde (PDT 2007), São Pedro, Brasil. *Terapia Fotodinâmica: Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde*: 47-48.

Resumos publicados em periódicos e anais de congressos

Ridolfi DM, Marcato PD, Machado D, **Silva RA**, Justo GZ, Durán N (2010). In vitro cytotoxicity assays of solid nanoparticles in epithelial cells. *International Conference on Safe production and use of nanomaterials (Nanosafe 2010)*, Grenoble, France. *Book of Abstracts Nanosafe 2010*. NO4B-40: Session 4.

Durán N, Justo GZ, Ferreira CV, **Silva RA**, Machado D, Shishido SM, Teixeira Z (2008). Cellular and molecular approaches to in vitro and in vivo assessment of preliminary toxicological and biological activities of nanomaterials. *International Conference on Nanomaterial Toxicology (ICONTOX 2008)*, Lucknow, Índia. *Nanotoxicology*. v. 2. p. S82-S82.

Camargo CA, **Silva RA**, Yano CL, Sousa RRR, Gomes-Marcondes MCC, da Silva MEF, Aoyama H (2008). Chemoterapeutic effects of quercetin on rats with Walker 256 carcinosarcoma. *33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference - "Biochemistry of Cell Regulation"*, Atenas, Grécia. *The FEBS Journal*. v. 275. p. 396.

Resumos em congressos

Silva RA, Machado D, Ferreira CV, Justo GZ. Inhibition of environmental stresses-induced keratinocytes damage by vitamin B2 and osmolyte. VI International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, Brasil, 2 a 5 Setembro de 2007.

Sousa ACT, Farias AS, **Silva RA**, Justo GZ, Yano T. Induction of apoptosis in HeLa cells by *Stenotrophomonas maltophilia*. VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, Havana, Cuba, 4 a 7 Dezembro de 2007.

Silva RA, Machado D, Souza ACS, Ferreira CV, Justo GZ; Aoyama H. Living on the edge in search for molecular judges in keratinocytes life and death decision. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Aguás de Lindóia, Brasil, 17 a 20 de Maio de 2008.

Lima MA, Brito AS, Souza LR, Arimateia DA, Andrade GPV, Cruz AKM, Torri G, Ferreira PA, **Silva RA**, Ferreira CV, Nader HB, Oliveira FW, Chavante SF. Anticoagulant, antithrombotic and anti-inflammatory properties of a heparin-like compound from shrimp *L. Vannamei*. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Águas de Lindóia, Brasil, 17 a 20 de Maio de 2008.

Machado D, **Silva RA**, Souza ACS, Justo GZ, Aoyama H, Ferreira CV, Shishido SM. Mechanism of riboflavin phototoxicity based on inflammation, senescence and apoptosis markers: potential application on photodynamic therapy. XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia, Brasil, 16 a 19 de Maio de 2009.

Silva RA, Machado D, Milani R, Peppelenbosch MP, Shishido SM, Souza ACS, Ferreira CV, Galembeck E, Justo GZ. Phosphokinome profile of human keratinocytes metabolic reprogramming to different stressors. XXXVIII Annual Meeting of SBBq, Águas de Lindóia, Brasil, 16 a 19 de Maio de 2009.

Justo GZ, Queiroz KCS, **Silva RA**, Fuhler GM, Paredes-Gamero EJ, Ferreira CV, Durán N, Nader HB, Peppelenbosch M. Violacein increases chemotherapy cytotoxicity and induces apoptosis in human erythroleukemia cells through inhibition of the Src/JAK/STAT pathway and activation of PP2A. 2010 Keystone Symposia Meeting on Molecular and Cellular Biology, Vancouver, Canadá, 12 a 17 de Março de 2010.

Teixeira Z, Machado D, **Silva RA**, Justo GZ, Ferreira CV, Guterres SS, Durán N (2010). Estudos de citotoxicidade e fotoirritação de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de palmitato de retinila. V Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2010, Aracajú, Brasil, 27 a 29 de Maio de 2010.

Silva RA, Paredes-Gamero EJ, Rodrigues RLC, Machado, D, Sousa ACS, Tersariol ILS, Ferreira CV, Nader HB, Justo GZ. The messenger of death: Ca^{2+} increase contributes to apoptosis induction in human keratinocytes. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Foz do Iguaçu, Brasil, 18 a 21 de Maio de 2010.

Ridolfi DM, Marcato PD, Machado D, **Silva RA**, Justo GZ, Durán N. Solid lipid nanoparticles (SLN) for dermal application of tretinoin: *in vitro* cytotoxicity and phototoxicity. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Foz do Iguaçu, Brasil, 18 a 21 de Maio de 2010.

Silva RA, Paredes-Gamero EJ, Machado D, Souza ACS, Ferreira CV, Nader HB, Justo GZ. Disorganization of actin filaments in human epidermal keratinocytes during oxidative stress. XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, SBBC, São Paulo, Brasil, 24 a 27 de Julho de 2010.

Ridolfi DM, Marcato PD, Machado D, **Silva RA**, Justo GZ, Durán N. Chitosan to improve properties of solid lipid nanoparticles (SLN) in treatment of skin diseases. 7th. International Symposium on Natural Polymers and Composites, Gramado, Brasil, 7 a 10 de Setembro de 2010.

Silva RA, Machado D, Souza ACS, Shishido SM, Ferreira CV, Paredes-Gamero EJ, Justo GZ. Hyperosmotic and oxidative stress induce intracellular Ca^{2+} -dependent apoptosis through cathepsin B and caspase 3-mediated pathways in skin epidermal human cell line. OzBio 2010, Melbourne, Austrália, 26 de Setembro a 1º de Outubro de 2010.

Participação em banca examinadora

Participação em banca examinadora de trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina) da aluna Naegele Paula Maringolo, Veris Faculdades, Campinas, Brasil.

Trabalho intitulado: Atividade Anticâncer do Flavonóide Narigina no Tratamento Terapêutico de Ratos Inoculados com o Carcinossarcoma de Walker 256.

Participação em congressos

VI International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, Brasil, 2 a 5 de Setembro de 2007.

XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Águas de Lindóia, Brasil, 17 a 20 de Maio de 2008.

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Águas de Lindóia, Brasil, 17 a 20 de Maio de 2009.

XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Foz do Iguaçu, Brasil, 18 a 21 de Maio de 2010.

XV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, São Paulo, Brasil, 24 a 27 de Julho de 2010.

OzBio 2010, Melbourne, Austrália, 26 de Setembro a 1º de Outubro de 2010.

Autoria e co-autoria em trabalho premiado em congresso

Colaborador no trabalho “Mechanism of riboflavin phototoxicity based on inflammation, senescence and apoptosis markers: potential application on photodynamic therapy”, de autoria de Machado D, **Silva RA**, Souza ACS, Justo GZ, Aoyama H, Ferreira CV, Shishido SM, premiado na XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) – “SBBq Award”, realizada em Águas de Lindóia, SP, Brasil, 16 a 19 de Maio de 2009, como melhor poster apresentado no evento.

Autoria do trabalho “Disorganization of actin filaments in human epidermal keratinocytes during oxidative stress”, de autoria de **Silva RA**, Paredes-Gamero EJ, Machado D, Souza ACS, Ferreira CV, Nader HB, Justo G Z, premiado na XV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biologia Celular (SBBC) – Menção honrosa na categoria jovem pesquisador, realizada em São Paulo, SP, Brasil, 24 a 27 de Julho de 2010.

Aula ministrada

Título: “Novas estratégias para Enzimologia”

Aula teórica e prática ministrada na Disciplina Enzimologia (NB 211) do curso de Pós-graduação.

Departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP.

Prof. Responsável: Dr. Hiroshi Aoyama.

Carga horária: 4 h.

Curso de curta duração ministrado**Título: “Técnicas de biologia molecular aplicadas à pesquisa: Estudo da expressão e atividade de proteínas”**

Mini-curso teórico e prático ministrado na Jornada de Biologia 2008.
Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, SP.
Período: 30 e 31/10/2008.
Carga horária: 8 h.