

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Daisy Machado**

**“Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da riboflavina:  
determinação de marcadores moleculares de inflamação, senescência  
e morte celular”**

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Daisy Machado</u> e aprovada pela Comissão Orientadora.
---

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Silvia Mika Shishido

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<b>M18a</b>	<p>Machado, Daisy Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da riboflavina: determinação de marcadores moleculares de inflamação, senescência e morte celular / Daisy Machado. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadores: Carmen Veríssima Ferreira, Sílvia Mika Shishido. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Transdução de sinal. 2. Riboflavina. 3. Dermatite fototóxica. 4. Hidrogel. I. Ferreira, Carmen Veríssima. II. Shishido, Sílvia Mika. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
-------------	---

**Título em inglês:** Evaluation of riboflavin cytotoxicity and phototoxicity: determination of molecular markers in inflammation, senescence and cell death.

**Palavras-chave em inglês:** Signal transduction; Riboflavin; Phototoxic dermatitis; Hydrogel.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Carmen Veríssima Ferreira, Maurício da Silva Baptista, Francisco Benedito Teixeira Pessine.

**Data da defesa:** 10/06/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

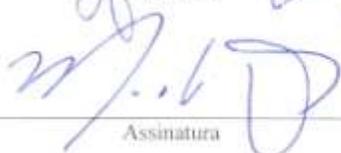
Campinas, 10 de junho de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

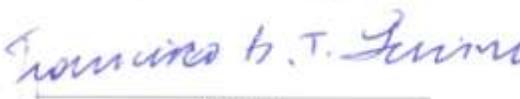
Profª. Dra. Carmen Veríssima Ferreira (Orientadora)

  
Assinatura

Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

  
Assinatura

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

  
Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profª. Dra. Luciana Maria de Hollanda

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**“Se vi mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes.”**

Isaac Newton

## Dedicatória

À Família *Machado*

Meus pais *Wanderlúcio e Neuza*,  
pessoas que me ensinaram o que é importante e  
o valor de cada pequeno momento, pois eles são tão importantes quanto os grandes;  
meus irmãos *Henilson, Denise e Neilson*,  
amigos, companheiros,  
estão sempre prontos a ajudar e a ouvir;  
meus avôs ‘*in memorian*’,  
onde quer que eles estejam sei que estão felizes  
por mais uma conquista;  
e minha tia *Cristina*,  
pessoa que sempre está disposta a ouvir e  
quem faz a melhor propaganda a meu respeito.  
Amo todos vocês.

## **Agradecimentos**

**À Profª Drª Carmen Veríssima Ferreira.**

Pessoa muito importante no desenvolvimento de mais esta etapa do meu aprimoramento intelectual. Esta oportunidade dada foi muito importante para mim, espero ter retribuído à altura tal oportunidade. Agradeço a paciência e compreensão em todos os momentos e ensinamentos que direta e indiretamente me influenciaram nesta etapa que está finalizando e que me influenciarão nas futuras.

**À Profª Drª Sílvia Mika Shishido.**

Professora, amiga, companheira. Só tenho que agradecer esta oportunidade de conviver tão perto de uma pessoa tão maravilhosa quanto você. Foi você quem me ensinou a dar os primeiros passos na pesquisa e isto para mim foi inesquecível. Palavras para agradecê-la por ser minha co-orientadora acho que não as tenho porque sua presença, paciência e compreensão foram muito mais que ensinamentos acadêmicos. Foram ensinamentos para o resto de minha vida. Mais uma vez obrigada por tudo.

Aos professores Maurício da Silva Baptista e Francisco Benedito Teixeira Pessine por aceitarem participar da banca de defesa e contribuir para melhorar esta dissertação com suas colocações e sugestões.

Aos professores *Cláudio Chrysóstomo Werneck, Francisco Benedito Teixeira Pessine, Rodrigo Ramos Catharino, Luciana Maria de Hollanda e Marcelo Lancellotti* por aceitarem participar da banca de qualificação e contribuir para a finalização deste trabalho com suas importantes colocações.

Aos professores da SCPG-BFM pelos ensinamentos e ajuda para o desenvolvimento da dissertação.

Ao *Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine* pelo empréstimo da lâmpada para os experimentos de fototoxicidade.

Ao *Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Hiroshi Aoyama*, um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido. Obrigada por todo este tempo de convivência que me possibilitou aprender mais e mais sobre vida e como ser uma boa profissional.

À *Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Giselle Zenker Justo*, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e de outros desenvolvidos paralelamente. Com a senhora muito aprendi.

À secretária da SCPG-BFM, *Sra. Andréia Vigilato*, pela paciência e ajuda em todos os momentos de 2007 a 2009.

À secretária do departamento de Bioquímica, *Sra. Marina Andressa*, pela colaboração, atenção e risadas durante todos estes anos.

Aos secretários da Pós-Graduação do Instituto de Biologia, *Sra. Silvia e Sr. Rafael*, pela paciência e ajuda durante todo o mestrado.

Ao *Sr. Ferreira* pela disponibilidade em sempre ajudar nas instalações das lâmpadas para o desenvolvimento do projeto.

À Família Takano, *tia Carmen, Dayane, Thais e Cláudio*, obrigado por ser esta família maravilhosa com a qual sempre posso contar.

Ao meu amigo *Thiago Fonseca Mezette*, que sempre esteve ao meu lado nos bons e maus momentos, construindo uma amizade indestrutível, te adoro.

À minha amiga *Aline Yumi Sawa*, por nunca desistir da nossa amizade e pela paciência de todos estes 10 anos de amizade, obrigada.

Ao meu amigo *Fagner Augusto Vieira*, amigo de longa data e que apesar da distância física sempre estamos juntos em pensamento.

À minha amiga *Ana Carolina Santos de Souza Galvão*, que se mostrou uma grande amiga com quem sei que posso sempre contar. Obrigada por me convidar a assistir seus experimentos junto com o Rodrigo porque foi lá que notei que a pesquisa pode ser divertida quando se tem bons amigos.

Ao meu amigo *Rodrigo Augusto da Silva*, mais do que um amigo, um companheiro para tudo. Com você aprendi muito coisa e sei que terei em você um amigo para toda a minha vida. Obrigada por toda a ajuda e companheirismo.

Ao meu amigo *Alex Rafacho*, pela presença marcante neste pequeno espaço de tempo de convivência. Sei que tenho em você um grande amigo, admiro sua postura profissional e adoro nossos churrascos.

À minha amiga *Géssika Puerta Sabio*, que mesmo distante fisicamente está sempre preocupada com seus amigos. Amiga para rir e chorar, conversar, sair e dançar. Adoro-te.

À minha amiga, *Verônica Madsen*, com quem vivi boas histórias e que apesar de morar na Dinamarca sempre se preocupa comigo e acompanha o que acontece comigo. Adoro-te amiga.

Ao *Willian Fernando Zambuzzi*, que sempre fica cantarolando suas modas de viola alegrando mais o ambiente do laboratório.

À *Cláudia de Lourdes Soraggi*, pelo companheirismo, paciência e importantes colocações que sempre considerei importantes.

À *Sarah Azoubel* que, em tão pouco tempo de convivência, está se mostrando uma ótima amiga. Companheira para as corridas matinais de domingo no Taquaral, é só pedir a sua ajuda para abrir um sorriso. Obrigada pela ajuda nos esquemas.

Ao *Antônio Hernandez Chaves Neto*, pela convivência neste tempo de laboratório e fora dele. Obrigada pela ajuda em tudo.

Aos meus colegas de laboratório, *Claudinha, Denise, Karla, Maria Augusta, Bispo, Roberta, Paula, Marylia, Ana Laura, Luisa, Rodolpho, Telma* que sempre tiveram paciência e ajudaram.

Aos meus amigos do Labex, *Paulo e Fernando*, por tantas festinhas e momentos de descontração.

Ao *Gilbert*, meu querido “English teacher” que sempre me ouviu, ajudou e ensinou nestes dois anos e meio de convivência.

À *Érika F. dos Anjos* por toda a ajuda e companheirismo neste tempo de convivência. Sei que tenho em você uma pessoa em quem posso contar. Obrigada por tudo.

Às colegas do Laboratório de Enzimologia *Érika, Camila, Luciana, Roberta, Marilena*, pelos momentos de risada e muita conversa. Obrigada pela alegre convivência que temos.

Aos técnicos do departamento de Bioquímica que sempre foram muito prestativos.

Aos profissionais da biblioteca do IB que sempre auxiliaram quando solicitados.

À Fapesp, pela aprovação da bolsa de mestrado que ajudou a desenvolver o trabalho.

À UNICAMP, pela oportunidade de desenvolver este trabalho sob seus domínios.

E a todos que contribuíram direto ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada!

**Financiamento**

Processo número 2006/05842-6



Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

Agradecimento especial



Universidade Estadual de Campinas



Laboratório de Bioensaios e Transdução de Sinal- UNICAMP



Laboratório de Enzimologia- UNICAMP



Universidade Federal de São Paulo



Rede Nanocosméticos- CNPq

Laboratório de Biomembranas - UNICAMP

## **Resumo**

A riboflavina (RF) é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B<sub>2</sub> e precursora das coenzimas FMN e FAD. Além da função biológica como componente de coenzimas, a RF apresenta atividade antitumoral e fotossensibilizante. A proposta principal desse estudo se baseou na avaliação da fototoxicidade da RF, bem como na determinação de marcadores moleculares da inflamação, senescência e morte celular, ações deletérias normalmente desencadeadas pela radiação UVA. Os resultados obtidos indicam que a RF tem potencial aplicação na terapia fotodinâmica, levando-se em conta os modelos celulares utilizados, fibroblastos (BALB/c 3T3) e queratinócitos humanos (HaCaT). As células BALB/c 3T3 tratadas com RF 6,0 µM e dose de 5 J/cm<sup>2</sup> de radiação UVA, apresentaram indução de apoptose principalmente pela via intrínseca. A indução de senescência foi evidenciada pelo aumento da p-caveolina e aumento da atividade da MMP-2 (principal protease responsável pela degradação de colágeno). De acordo com os níveis de NFκB e p-IKKα/β, a RF não alterou significativamente o processo de inflamação desencadeado pela radiação UVA. Nas células HaCaT, o tratamento com 5,0 µM de RF e dose de 5 J/cm<sup>2</sup> de radiação UVA levou a ativação da apoptose induzida tanto pela via extrínseca como pela intrínseca. O aumento nos níveis de p-caveolina, p21 e da atividade das MMPs-2 e -9 sugerem à indução de processo de senescência precoce também nos queratinócitos. Além disto, a diminuição da expressão do NFκB indica que o mesmo esteja se translocando para o núcleo e, portanto, regulando a resposta inflamatória. Outro aspecto avaliado foi a influência do copolímero F-127 na fototoxicidade da RF. A irradiação do hidrogel contendo F-127 e riboflavina manteve a propriedade fototóxica da mesma. Nossos dados sugerem que a RF apresenta potencial para uso em terapia fotodinâmica, uma vez que a mesma se mostrou fototóxica quando irradiada com doses subtóxicas de radiação UVA.

**Abstract**

Riboflavin (RF) is a water soluble vitamin which belongs to vitamin B<sub>2</sub> complex, an essential precursor of FMN and FAD coenzymes. Besides being a component of coenzymes, RF displays antitumoral and photosensitizing activities. The main proposal of this study was to evaluate the RF phototoxicity, as well as to determine molecular markers of inflammation, senescence and cellular death, deleterious actions normally triggered by the UVA radiation. Taking into consideration both cell lines used as models, fibroblasts (BALB/c 3T3) and human keratinocytes (HaCaT), the results obtained indicate that RF has potential application in photodynamic therapy. BALB/c 3T3 cells treated with 6.0  $\mu\text{M}$  RF associate with UVA radiation (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) showed apoptosis induction mainly via intrinsic pathway. An increase of p-caveolin and MMP-2 activity (major protease responsible for degrading collagen) evidenced senescence induction. According to NF $\kappa$ B and p-IKK $\alpha/\beta$  levels, RF did not significantly change the process of inflammation triggered by UVA radiation, in fibroblast cells. In HaCaT cells 5.0  $\mu\text{M}$  RF associated with UVA radiation (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) was observed apoptosis induction thorough extrinsic and intrinsic pathways. Senescence process was also observed in keratinocytes as indicated by an increase of p-caveolin, p21 and MMPs-2 and -9 activities. Besides, the decrease of NF $\kappa$ B expression indicates that this transcription factor translocates into the nucleus and in turn, regulates inflammatory response. Other aspect evaluated in this work was the influence of the F-127 in the RF phototoxicity. The irradiation of hydrogel containing F-127 and RF remained RF phototoxicity property. Our findings suggest that RF displays potential for use in photodynamic therapy, once it was phototoxic when irradiated with subtoxic UVA doses.

**Lista de Abreviaturas**

$\epsilon$ : absorvidade molar  
 $\eta$ M: nanomolar  
 $\eta$ m: nanometro  
 $\lambda$ : comprimento de onda  
 $\mu$ L: microlitro  
 $\mu$ m: micrometro  
 $\mu$ M: micromolar  
A: absorbância  
AcLLnL: N-acetil-leucininil-leucininil-norleucinal  
AIF: fator indutor de apoptose  
AP-1: ativador de proteína 1  
b: comprimento do caminho ótico  
bFGF: fator básico de crescimento de fibroblasto  
BALB/c 3T3: célula imortalizada de fibroblasto de embrião de camundongo  
Bcl-2: proteína relacionada à sobrevivência celular  
C: concentração da amostra  
CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio  
CDKI: inibidor dependente de ciclina quinase  
C<sub>max</sub>: concentração máxima  
cm: centímetro  
cm<sup>2</sup>: centímetros quadrados  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono  
COLIPA: European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association  
CTL: controle  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DTT: ditionitrito  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético  
EU/COLIPA: European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, Brussels, Belgium  
FAD: flavina adenina dinucleotídeo  
FADD: domínio de morte associado ao Fas  
Fas: receptor de morte  
FasL: Fas ligante  
FMF: formilmetilflavina  
FMN: flavina mononucleotídeo  
G: guanina  
HaCaT: células imortalizadas de queratinócitos humanos  
HCl: ácido clorídrico  
HNO<sub>3</sub>: ácido nítrico  
HP: hematoporfirina IX

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peróxido de hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : ácido sulfúrico  
IC<sub>50</sub> : concentração do composto que diminui em 50% a viabilidade celular  
IL-1: interleucina 1  
IκB: inibidor de NFκB  
IKK: complexo quinase citoplasmático IκB  
IKKα : subunidade alfa de IKK  
IKKβ : subunidade beta de IKK  
IKKγ : subunidade gama de IKK  
J/cm<sup>2</sup> : joule por centímetro quadrado  
LC: lumicromo  
LF: lumiflavina  
LPS: lipopolissacarídeos  
MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos  
MMPs: metaloproteinases  
MTT: 3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio  
m/v: massa/volume  
NaF: fluoreto de sódio  
NaOH: hidróxido de sódio  
NEMO: também conhecido como IKKγ (vide IKKγ)  
NFκB: fator nuclear kappa B  
NIH: National Institute of Health-Baltimore, USA  
NRU: neutral red update (Captação de vermelho neutro)  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> : oxigênio singlete  
•OH: radical hidroxil  
OH<sup>-</sup>: íon hidróxido  
OE: óxido de etileno  
OECD: Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France  
OP: óxido de propileno  
PAK2: p21 (CDKN1A) quinase ativada 2  
PARP: polimerase poli-ADP ribose  
PBS: solução tampão fosfato  
PBS-Ca<sup>2+</sup>: solução tampão fosfato com cálcio  
PDVF: fluoreto de polivinilideno (polyvinylidene fluoride)  
PEG: poli(etileno glicol)  
PEO-PPO-PEO: poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)  
PIF: fator de foto-irritação  
PVDF: polivinilideno fluorido  
p-NA: p-nitroanilina  
RF: riboflavina  
<sup>3</sup>RF\*: estado excitado de flavina tripleto

RF<sup>•-</sup>: radical ânion de riboflavina  
RF<sub>ox</sub>: riboflavina oxidada  
RF<sub>red</sub>: riboflavina reduzida  
ROS: espécies reativas de oxigênio  
RSNOs: S-nitrosotióis  
S: substrato  
S<sup>•+</sup>: radical cátion do substrato  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
Ser: serina  
Smac/DIABLO: ativador secundário de caspase mitocondrial / liga-se direto a IAP (proteínas inibidoras de apoptose) com baixo pI  
T: timina  
TBS: tampão salino Tris  
TBS-t: tampão salino Tris com Tween 20  
TCA: tricloroacético  
TIMPs: inibidores de metaloproteinases de tecido  
TNF: fator de necrose celular  
TNF $\alpha$ : fator alfa de necrose celular  
TRADD: domínio de morte associado ao receptor para o TNF  
Tyr: tirosina  
UI: uréia imidazolidina  
UV: radiação ultravioleta (comprimento de onda entre 400 e 200 nm)  
UVA: radiação ultravioleta de comprimento de onda de 400 a 320 nm, também conhecido como “luz negra” ou onda longa  
+UVA: presença de radiação UVA  
-UVA: ausência de radiação UVA  
UVB: radiação ultravioleta de comprimento de onda de 320 a 280 nm, também conhecido onda média  
UVC: radiação ultravioleta de comprimento de onda de 280 a 200 nm, também conhecido como onda curta ou “germicida”  
UV-Vis: região ultra violeta - visível do espectro  
VN: vermelho neutro (cloridrato de amino-*m*-dimetilamino-2-metil-fenazina)  
W: Watt

**Índice.**

1.	Introdução	1
1.1.	Riboflavina	2
1.2.	Terapia fotodinâmica	4
1.3.	Fototoxicidade	5
1.4.	Radiação ultravioleta	6
1.5.	Radiação com luz UV em células <i>versus</i> marcadores moleculares	8
1.5.1.	Apoptose	8
1.5.2.	Inflamação	11
1.5.3.	Senescência	14
1.6.	Copolímero em bloco PEO-PPO-PEO	17
2.	Objetivo	19
3.	Material e Métodos	20
3.1.	Material	21
3.2.	Linhagens Celulares	21
3.3.	Métodos	22
3.3.1.	Ensaio de Citotoxicidade	22
3.3.1.1.	Ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT	22
3.3.1.2.	Ensaio de captação do Vermelho Neutro (NRU)	23
3.3.2.	Ensaio de fototoxicidade por captação de vermelho neutro (NRU)	23
3.3.3.	Determinação do Fator de Foto-irritação (PIF)	24
3.3.4.	Medida da proliferação celular (quantificação dos ácidos nucléicos)	25
3.3.5.	Determinação da atividade das caspases 3 e 8	26

3.3.6.	Western Blotting	26
3.3.7.	Zimografia	27
3.3.8.	Formulação de hidrogéis contendo riboflavina	28
3.3.9.	Incorporação da riboflavina em hidrogéis de copolímero	28
3.3.10.	Liberação <i>in vitro</i> da riboflavina a partir dos hidrogéis	29
3.3.11.	Ensaio de fototoxicidade por captação de vermelho neutro (NRU) a partir da liberação <i>in vitro</i> da riboflavina a partir dos hidrogéis	29
3.3.12.	Forma de análise de resultados	30
4.	Resultados e discussão	31
4.1.	Caracterização e fotodecomposição da riboflavina	32
4.2.	Avaliação da citotoxicidade da riboflavina através da redução do MTT e captação do VN	37
4.3.	Padronização do método de avaliação da fototoxicidade	38
4.4.	Avaliação da fototoxicidade da riboflavina	41
4.4.1.	Avaliação da viabilidade celular através da captação do VN	42
4.4.2.	Avaliação da viabilidade celular através da medida de proliferação celular	43
4.5.	Irradiação com luz UVA em células <i>versus</i> marcadores moleculares	46
4.5.1.	Irradiação com luz UVA em células <i>versus</i> marcadores moleculares de apoptose	46
4.5.1.2	Efeito da riboflavina sobre as células <i>versus</i> marcadores moleculares de apoptose	53
4.5.1.3	Efeito da radiação e riboflavina sobre as células <i>versus</i> marcadores moleculares de apoptose	60

4.5.2.	Irradiação com luz UVA em células <i>versus</i> marcadores moleculares de inflamação	66
4.5.2.1.	Efeito da radiação UVA em células <i>versus</i> marcadores moleculares de inflamação	67
4.5.2.2.	Efeito da radiação e riboflavina sobre as células <i>versus</i> marcadores moleculares de inflamação	70
4.5.3.	Irradiação com luz UVA em células <i>versus</i> marcadores moleculares de senescência	72
4.5.3.1.	Efeito da radiação em células <i>versus</i> marcadores moleculares de senescência	72
4.5.3.2.	Efeito da riboflavina e irradiação UVA sobre as células <i>versus</i> marcadores moleculares de senescência	77
4.6.	Incorporação e liberação da riboflavina a partir dos hidrogéis de F-127	87
4.7.	Avaliação da citotoxicidade do F-127 pela redução do MTT e captação do VN	91
4.8.	Avaliação da fototoxicidade dos hidrogéis do F-127	94
4.8.1.	Avaliação da fototoxicidade através da captação do VN	94
4.9.	Avaliação da fototoxicidade dos hidrogéis de F-127 contendo riboflavina	97
4.9.1.	Liberação da riboflavina a partir dos hidrogéis	97
4.9.2.	Efeito da radiação UVA nas soluções contendo RF e F-127	99
4.9.3.	Fototoxicidade da riboflavina liberada a partir dos hidrogéis de F-127	100
5.	Conclusões	106
6.	Referência bibliográfica	109

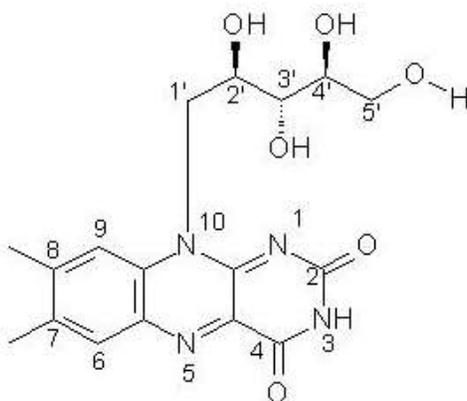
7. Anexo

# INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

### 1.1. Riboflavina

Riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina) - (RF) é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B<sub>2</sub>. Apresenta coloração amarela e possui em sua estrutura uma cadeia ribitil e um sistema de anéis isoaloxazina (Figura 1).



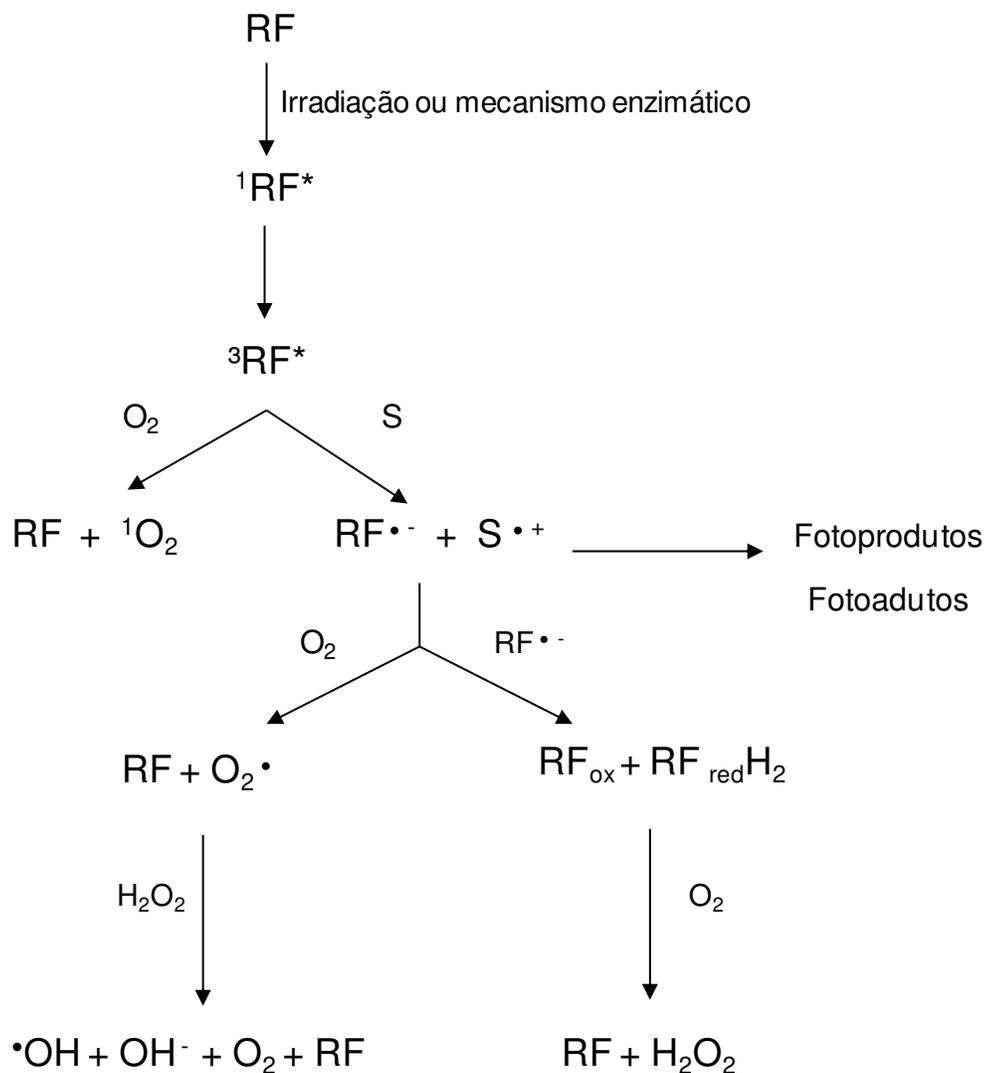
**Figura 1:** Estrutura da riboflavina com o sistema de anéis isoaloxazina e cadeia ribitil.

Essa vitamina é componente das coenzimas FMN (flavina mononucleotídeo) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo), as quais participam de diversas reações de óxido-redução importantes no metabolismo (Hustad *et al.*, 1999). Coenzimas derivadas da RF são requeridas para o metabolismo do ácido fólico, piridoxina e niacina, além de serem utilizadas por enzimas de eritrócitos, como a glutatona redutase que é uma enzima importante pertencente ao sistema de proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas nessas células (Rivlin *et al.*, 1983). Curiosamente, a RF pode tanto contribuir quanto inibir o estresse oxidativo, através da sua dupla habilidade de produzir

superóxido e, ao mesmo tempo, poder estar envolvida na redução de hidroperóxidos (Massey, 2000).

Na literatura há relatos que a RF apresenta outras funções biológicas podendo atuar como quimioprotetor (Webster *et al.*, 1996), modulador do estado redox (Massey, 2000) e agente citotóxico/antitumoral (Edwards *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2006; de Souza Queiroz *et al.*, 2007). Tal vitamina também é fotossensibilizador endógeno, apresentando sensibilidade à radiação ultravioleta (UV) e visível (La Rochette *et al.*, 2000). A RF ao absorver luz atinge o estado singlet e através de transferência de energia intramolecular (cruzamento intersistemas), leva ao aumento da população do estado triplete excitado, que pode ser desativado seguindo mecanismos do tipo I ou II. No mecanismo do tipo I, a RF no estado triplete excitado age diretamente sobre um substrato levando a fotoxidação do mesmo e, como consequência, ocorre a geração de radicais intermediários, além de espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (La Rochette *et al.*, 2000; Edwards e Silva, 2001). No mecanismo do tipo II, a RF no estado triplete excitado interage com oxigênio molecular gerando oxigênio singlete (Esquema 1).

A capacidade fotossensibilizadora da RF em sistemas biológicos está relacionada ao elevado potencial redox de sua forma triplete ativada. A RF irradiada reage com os aminoácidos triptofano, tirosina e, em menor extensão, com fenilalanina. Como resultado da fotoxidação dos aminoácidos mencionados forma-se espécies reativas de oxigênio e outros fotoprodutos tóxicos para as células (Souza *et al.*, 2005). Substâncias com capacidade fotossensibilizadora tem sido alvo de estudos na área de tratamento e prevenção de doenças com emprego de luz, tais como vitiligo e câncer.



**Esquema 1:** Mecanismos tipo I e tipo II em presença de oxigênio molecular.  ${}^1\text{RF}^*$  representa o estado singleto excitado de flavina,  ${}^3\text{RF}^*$  estado tripleto excitado de flavina, S substrato,  $\text{RF}\cdot^-$  radical ânion de riboflavina,  $\text{S}\cdot^+$  radical cátion do substrato,  ${}^1\text{O}_2$  oxigênio singleto (Souza *et al.*, 2005).

## 1.2. Terapia fotodinâmica

Nas últimas décadas a terapia fotodinâmica tem obtido expressivo destaque na área médica e de pesquisa (Castano *et al.*, 2006; Gold, 2006). A terapia fotodinâmica é caracterizada pelo acúmulo de uma substância fotossensibilizadora em um tecido especialmente iluminado e, subseqüentemente, destruído (Edwards *et al.*, 1994). Os

fotossensibilizadores induzem reação fotoquímica do tipo II, que levam à produção de agentes citotóxicos, especialmente oxigênio singlete. A reação fotoquímica do tipo I também pode ser induzida pelos fotossensibilizadores e as substâncias tóxicas geradas podem causar peroxidação lipídica, danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), à membrana plasmática, ao citoesqueleto e outras organelas subcelulares (Koceva-Chyla *et al.*, 2006). A irradiação com luz UV é considerada importante estratégia terapêutica em dermatologia e tem melhorado dramaticamente o tratamento de doenças de pele. Os objetivos da terapia fotodinâmica são inibir o avanço da doença e mais importante, prevenir, modular ou eliminar completamente o mecanismo patogênico que causa a doença (Weichenthal e Schwarz, 2005).

### **1.3. Fototoxicidade**

De acordo com a “European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association” (COLIPA), a fototoxicidade pode ser caracterizada por uma reação inflamatória da pele causada pela aplicação tópica ou administração sistêmica de substâncias químicas e subsequente exposição à luz, particularmente às radiações UVA. Desta forma, quando se pretende usar novas substâncias químicas em produtos dermatológicos a avaliação do potencial fototóxico dos componentes da formulação representa um passo essencial durante o desenvolvimento do produto (Onoue e Tsuda, 2006). Nos últimos anos, muitos testes *in vitro* têm sido sugeridos como substitutos válidos para testes de fototoxicidade *in vivo* (Dijoux *et al.*, 2006).

Os modelos celulares relevantes para testes de agentes irritantes/fototóxicos para a pele são os fibroblastos e os queratinócitos (Benavides *et al.*, 2004). Porém, resultados de literatura mostram que os queratinócitos apresentam menor sensibilidade a xenobióticos

quando comparados aos fibroblastos (Dijoux *et al.*, 2006). O ensaio de captação de vermelho neutro (NRU) utilizando células de fibroblasto BALB/c 3T3 para avaliação da fototoxicidade é validado pela EU/COLIPA (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, Brussels, Belgium) (OECD Guideline) e apresenta correlação de cerca de 95 a 100% com os resultados obtidos *in vivo* (Benavides *et al.*, 2004).

#### **1.4. Radiação ultravioleta**

A radiação ultravioleta (UV) faz parte do espectro eletromagnético de radiação, que inclui radiações de onda muito curtas como raios-X e  $\gamma$  e muito longas, como radiação de micro ondas. A UV é uma radiação eletromagnética não ionizante com comprimento de onda ( $\lambda$ ) menor que a da luz visível e maior que a dos raios X, ou seja, compreendida entre 380 nm a 100 nm. Segundo a Comissão Internacional de l'Eclairge (1987) a UV é subdividida em UVA (400- 320 nm, também chamada de “luz negra” ou onda longa), UVB (320- 280 nm, também chamada de onda média) e UVC (280- 100 nm, também chamada de UV curta ou “germicida”) (Hussein, 2005). Os componentes da UVC e parte da UVB emitidos pelo sol são absorvidos pela camada de ozônio da atmosfera terrestre, sendo assim, quase a totalidade dos raios UV que efetivamente chegam à superfície da Terra compõem-se de UVA.

A radiação UVA tem capacidade de penetrar mais profundamente na pele e pode atingir os fibroblastos da derme (Fagot, 2004). Portanto, efeitos como bronzeamento, senescência e carcinogênese da pele e danos aos olhos estão associados a radiação UVA (Ridley *et al.* 2009). Os efeitos genotóxicos da UVA solar são mediados principalmente pela ativação de fotosensibilizadores endógenos tendo por resultado a geração de um

estresse oxidativo local. Embora a radiação UVB seja parcialmente absorvida pelo ozônio da atmosfera, a parcela que chega a Terra é suficiente para causar danos à pele. O UVB tem capacidade de penetração na pele menor que a UVA, porém como a radiação nesses comprimentos de onda é absorvida por proteínas e DNA, podem induzir lesões mutagênicas com a formação de dímeros de pirimidina (Marrot e Meunier, 2008). Os componentes da UVC embora sejam absorvidos em quase toda sua totalidade pela camada de ozônio terrestre, são os mais danosos. O UVC ataca todos os constituintes orgânicos de organismos vivos, como por exemplo, os lipídeos que podem ser destruídos quando irradiados em comprimentos de onda de 190 a 200 nm (Ridley et al., 2009), levando a danos irreversíveis.

Como mencionado anteriormente, as flavinas apresentam propriedades químicas que as tornam altamente susceptíveis a reações de fotodecomposição. Considerando que em meio fisiológico a disponibilidade de flavinas na forma de riboflavina livre ou como coenzimas é alta, o potencial das flavinas participarem em processos fototóxicos deve ser considerado. Baier e colaboradores (2006) demonstraram que a excitação da riboflavina, FMN e FAD com radiação UVA, causou alta produção de oxigênio singlete. Portanto, dependendo da concentração das mesmas na pele, as flavinas são potenciais geradores de oxigênio singlete, até mesmo mais significativo que as porfirinas exógenas usadas para eliminar as células na terapia fotodinâmica.

## 1.5. Irradiação com luz UV em células *versus* marcadores moleculares

### 1.5.1. Apoptose

Dentre os efeitos biológicos da irradiação com luz UV, o mais estudado é a indução de apoptose (Weichenthal e Schwarz, 2005). A apoptose pode ser definida como morte celular geneticamente programada, sendo um processo importante na manutenção da homeostasia tecido/órgão. Essa morte pode ser induzida via receptor de morte (receptores da família do fator de necrose tumoral - TNF) ou por estímulo genotóxico provocado por xenobióticos, radicais livres, radiação UV e indisponibilidade de fatores de crescimento (Uren e Vaux, 1996; Ferreira *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2006).

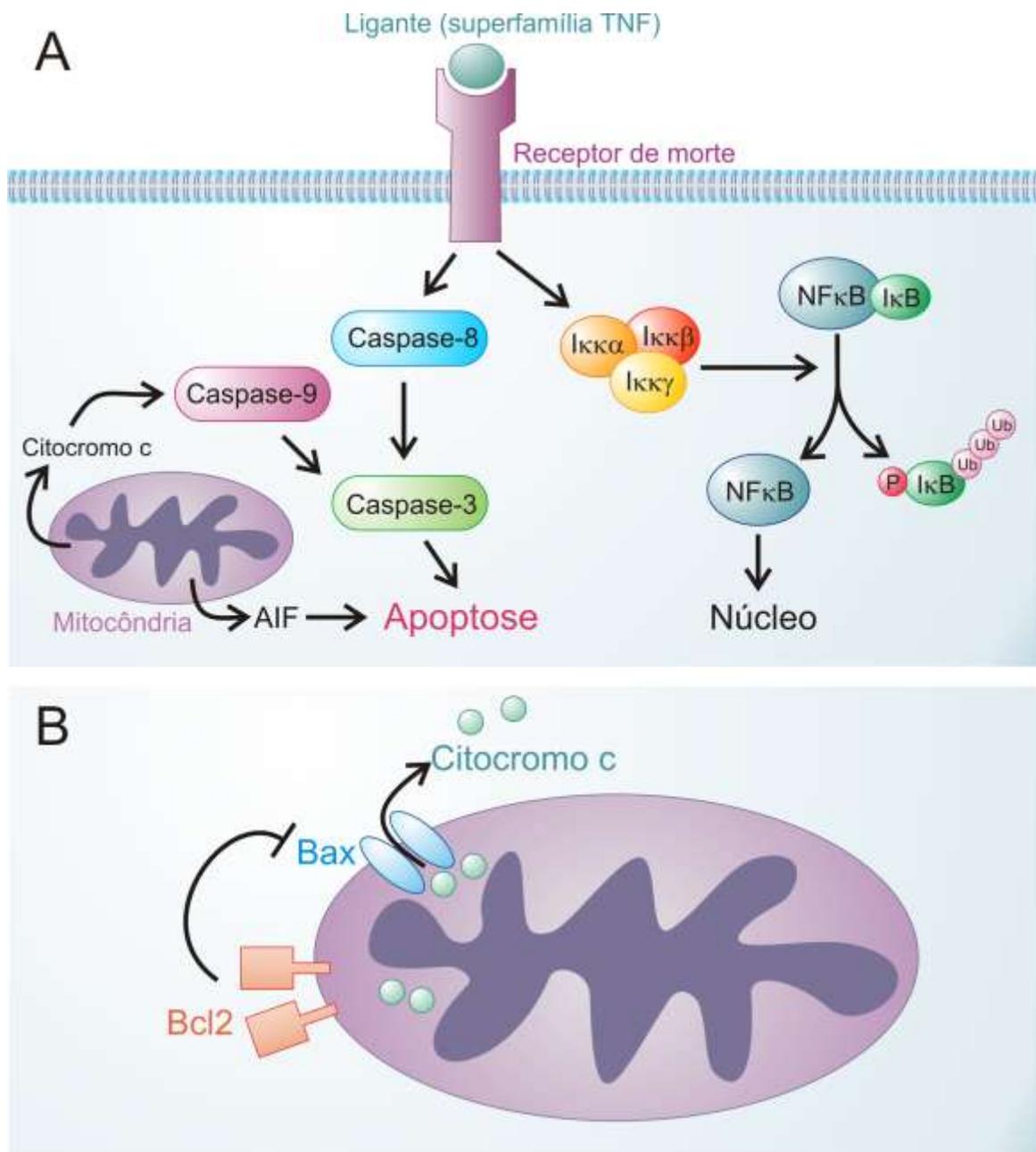
A sinalização apoptótica e consequente ativação de caspases pode ocorrer através de duas vias sinalizadoras, dependendo da natureza do estímulo. A via extrínseca é desencadeada através da ativação de receptores de morte, enquanto na via intrínseca a mitocôndria é mediadora chave no processo de morte celular (Assunção Guimarães e Linden, 2004).

Na via extrínseca, o sinal de morte é transmitido através de um ligante extracelular membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), juntamente com a ligação de proteínas específicas a estes receptores (TNF/FasL). O TNF ou FasL (Fas ligante) se liga ao seu receptor e, então, ocorre a ligação de proteínas ao domínio de morte destes receptores: TRADD (domínio de morte associado ao receptor para o TNF) ou FADD (domínio de morte associado ao Fas). A trimerização das subunidades dos receptores, juntamente com o recrutamento de proteínas citoplasmáticas leva à ativação de proteases (caspases) que irão atuar sobre diferentes substratos. Tais substratos incluem proteínas do citoesqueleto,

polimerase poli-ADP ribose (PARP), laminina B e quinase PAK2 (responsável pela produção dos corpos apoptóticos) (McConkey, 1998; Souza *et al.*, 2006). Uma vez ativa, a caspase 8 cliva e ativa a caspase 3 que induz diretamente a fase de execução do processo apoptótico (Figura 2A).

A via intrínseca desencadeia a apoptose em resposta a danos no material genético, defeitos nos “check points” do ciclo celular, mitose catastrófica, hipóxia, ausência de fatores de crescimento, agentes quimioterápicos, radiação, substâncias citotóxicas e outros tipos severos de estresse celular que agem dentro da célula (Gottlieb, 2000; Wang e El-Deiry, 2003; Liston *et al.*, 2003). Esta via envolve a ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 que agem na mitocôndria afetando sua permeabilidade seletiva. Isto leva a formação de poros por onde extravasam fatores apoptogênicos como citocromo c (Figura 2B), fator de indução de apoptose (AIF), Smac/DIABLO, entre outras (Kaufmann e Hengartner, 2001; Wang e El-Deiry, 2003).

Adicionalmente a ativação de caspases, a liberação do citocromo c causa vagarosa e irreversível perda de função mitocondrial e decréscimo de respiração, o que leva à morte celular. Portanto, a via apoptótica mitocondrial parece resultar em eventos que irreversivelmente levam a célula à morte (Liston *et al.*, 2003).



**Figura 2: Vias de sinalização ativada por ligante e receptor de morte.** (A) O ligante da superfamília TNF ativa a via extrínseca da apoptose através da caspase 8, iniciadora, que posteriormente ativa a caspase 3, efetora, que leva a morte apoptótica. Além desta via, este ligante pode fosforilar as subunidades IKK e consequentemente ocorrerá a fosforilação do IκB, o qual será ubiquitinado e degradado, liberando o NFκB para se translocar ao núcleo. (B) Proteínas pró-apoptótica (Bax) e anti-apoptótica (Bcl-2). Bcl-2 inibe a polimerização de homo ou heterodímero de Bax para a formação do poro por onde o citocromo c transloca do espaço intermembrana da mitocôndria para o citoplasma onde ativa a caspase 9. Bcl-2 inibe este processo se ligando ao domínio BH3 do Bax, impedindo que o Bax se oligomerize e forme o poro (Chikup e Green, 2008).

A família Bcl-2 de proteínas intracelulares reguladoras de apoptose consiste de membros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-1, Mcl-1, A1) e pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bcl-X<sub>S</sub>, Bad, Bid, Bik, Hrk), sendo que o balanço entre os membros determinará quando a apoptose será inibida ou induzida (Kulms e Schwarz, 2000). Os membros anti-apoptóticos como a própria Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> inibem pelo menos parcialmente a apoptose. Isso ocorre através de sua interação com membros apoptóticos, como o Bax, inativando-os e, assim evitando a formação de poros. Como consequência, não ocorre liberação do citocromo c da mitocôndria, evitando-se assim, a apoptose. A super expressão de Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> aumenta a sobrevivência de muitos tipos celulares e previne a indução de apoptose por uma ampla faixa de agentes químicos e físicos, incluindo radiação UV (Chikup e Green, 2008). Na literatura pode-se encontrar uma série de evidências revisadas por Kulms e Schwarz (2000) e Suzuki e colaboradores (2009), indicando a ativação da apoptose induzida por radiação UV, tanto por via extrínseca como pela intrínseca. Portanto, em nosso estudo, foram monitoradas tanto a atividade das caspases como a atividade e/ou expressão de Bax, Bcl-2 e AIF como parâmetros para avaliação da indução de apoptose.

### **1.5.2. Inflamação**

Os danos ao DNA causados pela radiação UVA são provavelmente devidos à geração de ROS, levando às mutações características de transversão de G (guanina) a T (timina), uma vez que o DNA não absorve significativamente radiação UVA (Pfeifer *et al.*, 2005).

As proteínas que são expressas após a exposição UV podem ser classificadas por sua funcionalidade e incluem os produtos proto-oncogênicos (como os membros da família AP-1 e NFκB, e p53), fatores de crescimento (interleucina 1α (IL 1α), fator básico de

crescimento de fibroblasto (bFGF) (Li *et al.*, 2001) e de marcadores específicos de diferenciação (queratinas) (Bender *et al.*, 1997).

AP-1 e o fator de transcrição NF $\kappa$ B são conhecidos por exercerem funções na diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula e, conseqüentemente, em funções importantes na tumorigênese (Gilmore *et al.*, 1996; Shaulian e Karin, 2001). Um dos grupos mais estudados de fatores de transcrição induzidos pela radiação UV é membro da família NF $\kappa$ B/Rel. Esta família é composta por 5 membros que atuam como fatores de transcrição homo- ou heterodímeros regulando a expressão de genes críticos para processos biológicos múltiplos, incluindo reações inflamatórias, respostas imune e apoptose (Ghosh *et al.*, 1998). O NF $\kappa$ B é formado pelas subunidades p50 e p65 sendo mantido inativo no citoplasma das células, sem nenhum estímulo. Para a sua ativação é necessário sua translocação ao núcleo. A localização celular do NF $\kappa$ B é controlada rigidamente por uma família de proteínas inibitórias denominadas I $\kappa$ Bs (Huang e Miyamoto, 2001; Tam e Sam, 2001; Seé, 2004) (Figura 2A). Quando inativo, o NF $\kappa$ B é mantido no citoplasma através de forte associação com o I $\kappa$ B $\alpha$ . A exposição das células a uma variedade de estímulos extracelulares, como o fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1) ou lipopolissacarídeos (LPS) conduz à rápida fosforilação em Ser-32 e Ser-36, seguido da ubiquitinação e, finalmente, à degradação mediada por proteasoma, de I $\kappa$ B $\alpha$ . Assim o NF $\kappa$ B é liberado e se transloca ao núcleo para regular a transcrição do gene (Karin e Bem-Neriah, 2001).

Os mecanismos da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  por indutores de NF $\kappa$ B, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e LPS, foram bem caracterizados devido à facilidade relativa de se acompanhar a fosforilação e a multiubiquitinação de intermediários de I $\kappa$ B $\alpha$  antes de sua degradação (Karin e Bem-Neriah, 2001).

Há três pontos importantes que distinguem o mecanismo de sinalização induzido por radiação UV do “mecanismo tradicional” de indução de NFκB. Primeiro, a radiação UV induz a degradação de IκBα e a ativação de NFκB com cinética mais lenta, sendo que o pico de atividade ocorre em cerca de 2 a 4 h após o tratamento. Quando comparado com a indução por TNF-α ou IL-1, o pico de atividade do NFκB é observado dentro de 10 a 20 minutos. Além disto, os níveis de NFκB são muito mais elevados. Tais constatações foram observadas por Bender e colaboradores (1998) através da análise da translocação do NFκB ao núcleo, degradação do IκBα e ligação do NFκB ao DNA. Segundo, em contraste aos indutores, a atividade IκB quinase (IKK) é indetectável na resposta à radiação UV. Nesse sentido, a degradação de IκBα não é afetada por mutação nos seus sítios de fosforilação ou por mutações nos centro catalítico de IKK quando a lisina, aminoácido crucial para a associação ao ATP, é substituído por uma alanina (Bender *et al.*, 1998; Li e Karin, 1998). Terceiro, a irradiação UV não acumula o intermediário fosforilado de IκBα (pIκBα), mesmo na presença de inibidores potentes do proteasoma tais como o N-acetil-leucinil-leucinil-norleucinal (AcLLnL) ou lactacistina (Li e Karin, 1998).

Nas vias clássicas associadas às citocinas pró-inflamatórias (TNFα, IL1β), o complexo de multissubunidades IKK (complexo quinase citoplasmático IκB) é ativado, sendo esse, o responsável pela indução da fosforilação de IκBα. Assim, é provável que a ativação de IKK seja o ponto de convergência para a maioria dos estímulos de ativação de NFκB (Israel, 2000). O complexo protéico IKK contém duas subunidades catalíticas, IKKα/IKK1 e IKKβ/IKK2 e uma importante proteína regulatória, o NEMO (denominado também, IKKγ) (Habraken e Piette, 2006; Yamaoka *et al.*, 1998). A interação entre complexos NEMO e IKKα/IKKβ é crítica para a ativação pró-inflamatória de IKK. A

ativação do complexo de IKK conduz à fosforilação rápida de Serina (Ser)-32 e de Ser-36 do I $\kappa$ B $\alpha$ . O pI $\kappa$ B $\alpha$  é recrutado então, à maquinaria da ubiquitina onde a lisina 21 e 22 são poliubiquinadas ligando-se subsequentemente a subunidade 26S proteossomal degradando-se (Zandi *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2002; Cooper e Bowden, 2007). Finalmente, o NF $\kappa$ B livre transloca-se para o núcleo e atua como fator de transcrição de genes específicos. Desta forma, a análise da expressão de NF $\kappa$ B e p-IKK $\alpha/\beta$  e a razão entre eles pode nos fornecer informações sobre a indução ou não de processo inflamatório. Assim, a expressão destas proteínas foi utilizada para avaliar a inflamação no modelo de estudo.

### **1.5.3. Senescência**

A maioria das células não pode se dividir indefinidamente devido a um processo denominado senescência celular. Tal processo parece ser uma característica importante nas células somáticas, à exceção das células tumorigênicas. Na senescência celular, os eventos são caracterizados pela interrupção irreversível do crescimento, exibição de uma morfologia larga e achatada e aumento de muitas proteínas inibidoras do ciclo celular, além do aumento na atividade ácida da  $\beta$ -galactosidase (Fripiat *et al.*, 2001; Volonte *et al.*, 2002). Além do processo cronológico de senescência, outros fatores como exposição ambiental (irradiação UV), genéticos, ação hormonal e processos metabólicos (geração de compostos químicos reativos), podem levar a senescência celular precoce.

A radiação UV solar é dividida em três componentes, UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280 nm). Os componentes da UVC são bloqueados pela camada de ozônio terrestre, já UVA e UVB são responsáveis pelos numerosos efeitos deletérios na pele, incluindo aparência de idade prematura, caracterizada pelas rugas, textura rija e

pigmentação (Lee, 2003). A radiação UVA tem capacidade de penetrar mais profundamente na pele e pode atingir os fibroblastos da derme (Fagot, 2004). Muitas evidências indicam que há semelhanças entre o envelhecimento cronológico e o causado pela radiação UV na pele, os quais são caracterizados por alterações moleculares, incluindo alteração de transdução de sinal que promove a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) e caveolina -1 (Galbiati *et al.*, 2001; Rittié e Fisher, 2002).

As MMPs fazem parte de uma família de endopeptidases zinco dependente, são capazes de degradar componentes da matriz extracelular como colágeno, gelatina e fibronectina e são produzidas nas células como zimogênio. Enzimas proteolíticas clivam os pró-domínios resultando na ativação dos centros catalíticos. A MMP ativa é regulada em três níveis: síntese (primariamente na transcrição), ativação do zimogênio e inibição da atividade proteolítica, por inibidores proteicos específicos chamados TIMPs (tecidos inibidores de metaloproteinases) (Rittié e Fisher, 2002).

A expressão de MMP-1, MMP-3 e MMP-9 é em parte responsável pelos danos causados pela irradiação com luz UV na pele humana (Fisher *et al.*, 1997). A MMP-1 (colagenase 1) inicia a degradação de colágenos fibrilares dos tipos I e III, a MMP-9 (gelatinase B) degrada fragmentos de colágenos gerados pela colagenase e a MMP-3 (estromelisin 1) degrada colágeno do tipo IV e ativa a pró MMP-1.

Wlaschek e colaboradores (1995) relataram que a radiação UVA pode induzir atividade de MMP-1, -2 e -3 em fibroblastos humanos em cultura e *in vivo*. Além disso, sabe-se que tanto a radiação UVA quanto a UVB aumenta atividade de MMP-2 e MMP-9 em queratinócitos humanos (Koivukangas *et al.*, 1994). Assim, o aumento da expressão das MMPs está associado tanto ao envelhecimento cronológico da pele, quanto ao efeito deletério da radiação UV (Rittié e Fisher, 2002).

As espécies reativas do oxigênio (ROS) geradas pela luz UV são mediadoras de efeitos tais como a ativação de fatores da transcrição (Wlaschek *et al.*, 1995), peroxidação lipídica (Brenneisen *et al.*, 1998) e quebra da fita de DNA (Nocentini *et al.*, 2001). Hantke e colaboradores (2002) mostraram, através de evidências indiretas, que o oxigênio singlete e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são as principais ROS produzidas pela radiação UVA, e que estão envolvidas na indução de MMP-1, -2, e -3. Além disso, neste estudo foi observado que as ROS também anulam e danificam os sistemas antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos da pele.

As cavéolas são invaginações vesiculares da membrana plasmática e têm como componentes estruturais as caveolinas (Okamoto *et al.*, 1998). As caveolinas possuem um domínio “*scaffolding*” passível de ancoramento, aos quais moléculas envolvidas na sinalização se ligam em um estado inativo e através de mudanças conformacionais são ativadas e liberadas. Uma ampla gama de proteínas envolvidas na transdução de sinal está localizada na cavéola e/ou interagem com a caveolina. Nos exemplos se incluem, receptores de hormônios esteróides, tirosinas quinases, quinases da família Src, PKA, PKC, componentes pós-receptores, como Ras, eNOS, canais iônicos e transportadores (Patel *et al.*, 2008). Nos mamíferos, a família da caveolina se constitui de caveolinas-1, -2 e -3 e estas interagem com colesterol para formação das unidades funcionais das cavéolas. As caveolinas-1 e -2 estão expressas em muitas células, incluindo adipócitos, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Contudo, a caveolina-3 tem sua expressão restrita às células da musculatura esquelética e lisa, bem como os miócitos cardíacos (Galbiati *et al.*, 2001).

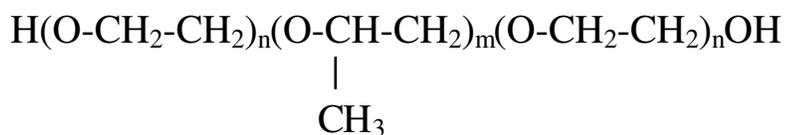
O bloqueio na proliferação celular e a inibição da progressão do ciclo celular são dois passos fundamentais para atingir a senescência celular. Moléculas que regulam negativamente a progressão do ciclo celular são consideradas possíveis proteínas na

promoção e/ou manutenção do fenótipo de senescência (Volonte *et al.*, 2002). Galbiati e colaboradores (2001) demonstraram que o aumento na expressão de caveolina-1 em fibroblastos de embrião de ratos é suficiente para inibir a progressão do ciclo celular em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Esses autores também demonstraram que a interrupção do ciclo celular mediado pela caveolina-1, em fibroblastos de embrião de ratos, ocorre por meio de uma via dependente de p53/p21. Mais recentemente, este mesmo grupo (Dasari *et al.*, 2006) mostrou que o estresse oxidativo induz a senescência prematura, pelo estímulo da transcrição do gene da caveolina-1 através de proteína quinase/SP-1 ativada por MAPKp38. Ainda, estes autores mostraram que a expressão de caveolina-1 leva à ativação de ATM, p53 e aumento na expressão de p21, induzindo a senescência celular de fibroblasto de pulmão (Volonte *et al.*, 2008).

Assim pode-se considerar que as MMPs -2 e -9, caveolina-1/p-caveolina-1 e p21 estão envolvidas no processo de senescência tornando-os bons marcadores moleculares para o monitoramento desse processo.

### 1.6. Copolímeros em bloco PEO-PPO-PEO.

Os copolímeros em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) apresentam a unidade de repetição:



onde os valores de **n** e **m** podem variar de 4 a 265 e 16 a 69, respectivamente (Alexandridis e Hatton, 1995), sendo n=99 e m=65 para o copolímero F-127. Estes copolímeros são

comercialmente disponíveis com os nomes de Poloxamer (produzidos pela ICI, Inglaterra) ou Pluronic (produzido pela BASF, Alemanha) - (ICI Catalog, 1992). Na área farmacêutica, esses copolímeros têm sido utilizados para liberação controlada de fármacos (Yokoyama, 1992), na cobertura de ferimentos de queimadura (Henry, 1989) e para a proteção de microorganismos contra danos mecânicos (Murhammer e Goochee, 1990).

O uso de matrizes poliméricas como veículos em medicamentos podem causar efeito estabilizador de fármacos, isto é, podem levar a um aumento da meia vida, da eficiência e do tempo de permanência do fármaco no organismo, mantendo sua atividade biológica. Foi observado que matrizes poliméricas atóxicas como as de poli(etileno glicol) (PEG) (Shishido e de Oliveira, 2000, Shishido *et al.*, 2003) e de hidrogéis de copolímeros em bloco PEO-PPO-PEO (Shishido *et al.*, 2003) apresentam propriedades estabilizadoras de S-nitrosotióis (RSNOs). Esta característica também pode ser utilizada para estabilizar os fotoprodutos da riboflavina, visando a manutenção das propriedades dessas espécies. Além disso, foi relatado por alguns pesquisadores (Jagannath *et al.*, 2000) que estes copolímeros promovem aumento da permeabilidade de drogas.

## **2. Objetivos**

O objetivo principal desse estudo foi avaliar o potencial fototóxico da riboflavina através da análise da integridade da membrana lisossomal e de proteínas de vias de transdução de sinal relacionadas com senescência, inflamação e morte celular: NFκB, caveolina, caspases 3 e 8 e MMPs, ao longo do processo de irradiação UV nos queratinócitos humanos e fibroblastos de camundongo, *in vitro*. Assim, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Padronizar o ensaio de fototoxicidade através da técnica de captação do vermelho neutro, de acordo com as normas da EU/COLIPA;
- Preparar a formulação de hidrogéis de copolímero em bloco PEO-PPO-PEO, contendo riboflavina para futuro uso tópico;
- Realizar ensaios de citotoxicidade da formulação e também da riboflavina livre;
- Analisar sob o aspecto molecular, o efeito deletério da radiação, radiação/riboflavina nas células BALB/c 3T3 e HaCaT através da análise da atividade e/ou expressão das proteínas NFκB, metaloproteinases, caveolina, caspases 8 e 3.

# Material e Métodos

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Material**

Riboflavina, corante vermelho neutro, hematoporfirina e MTT foram adquiridos da Sigma-Aldrich, o Lutrol F-127 foi obtido da BASF, o conservante uréia imidazolidinila da Brasquim e a tiourea da Baker. Os anticorpos primários caveolina-1, fosfo-caveolina, Bax e fosfo-IKK $\alpha$  e secundário (anti-“coelho”, anti-“rato”) foram adquiridos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA) e os anticorpos primários NF $\kappa$ Bp65/p50, Bcl-2, AIF, p21, e actina da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Os kits de dosagem colorimétrico de caspase 3 e 8 foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis). Tris base, tween 20 e acrilamida foram obtidos da USB; SDS e o-vanadato da Calbiochem; triton-X 100 e inibidores da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes foram obtidos da Merck.

#### **3.2. Linhagens celulares**

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens celulares de fibroblastos de embrião de camundongo BALB/c 3T3, adquirida do NIH (National Institute of Health-Baltimore, USA) e de queratinócitos humanos HaCaT, gentilmente cedida pela Dra. Liudmila Kodach (Academic Medical Center, Amsterdam University). As células BALB/c 3T3 e HaCaT foram cultivadas em meio DMEM e suplementadas com 15% e 10% de soro fetal bovino, respectivamente, e 1% de antibiótico. As células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> ou em placas de 60 cm<sup>2</sup>, na densidade de  $2 \times 10^4$  células/mL para células Balb/c 3T3 e  $1,4 \times 10^4$  células/mL para HaCaT e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Ensaio de Citotoxicidade**

##### **3.3.1.1. Ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT**

Nesse ensaio, a viabilidade celular é avaliada através da medida da capacidade das células de reduzir o MTT (3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio) a formazan. O formazan é um pigmento insolúvel que é extraído das células e quantificado espectrofotometricamente em  $\lambda=570$  nm. A redução do MTT é catalisada principalmente pelas desidrogenases mitocondriais e também do citoplasma. Portanto, a alteração da função mitocondrial poderá ser detectada através da variação da capacidade de redução do MTT.

As células BALB/c 3T3 e HaCaT foram plaqueadas numa densidade  $1 \times 10^4$  células/mL e  $7 \times 10^3$  células/mL em placas de 96 poços, respectivamente, e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  por 24 h. O meio foi substituído por diferentes concentrações de riboflavina (0-175  $\mu\text{M}$ ) diluída em meio suplementado. Após 24 h de incubação, o meio de tratamento foi removido, os poços foram lavados com PBS e adicionado meio sem soro contendo o corante MTT (0,5 mg/mL). Após incubação por 4 h a  $37^\circ\text{C}$ , o meio foi retirado cuidadosamente e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida no espectrofotômetro (ELx 800 BIO-TEK) em  $\lambda = 570$  nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle, onde as células não foram expostas aos agentes testes (Mosmann, 1983).

### **3.3.1.2. Ensaio de captação de vermelho neutro (NRU).**

Nesse ensaio, a viabilidade celular é avaliada através da medida da capacidade das células de captar o vermelho neutro (VN: hidrocloreto de amino-*m*-dimetilamino-2-metil-fenazina). As células são fixadas e o VN intracelular é extraído e quantificado espectrofotometricamente em  $\lambda=540$  nm. A captação do VN é realizada pelos lisossomos e então, este teste reflete a integridade da membrana dos lisossomos e conseqüentemente, um indicativo da viabilidade celular.

O mesmo procedimento, em relação ao tratamento descrito no item 9.3.1.1 é realizado nesta técnica. Após o período de tratamento com a RF, o meio de cultura foi removido e em seguida foram adicionados 100 $\mu$ L do VN, e incubado a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 3 h. Após a incubação, a solução de VN foi removida e as células foram lavadas com PBS, fixadas com solução de formol/cálcio (formol 4% acrescido de CaCl<sub>2</sub> 1%) por 2 min e o corante captado pelos lisossomos foi extraído com solução de ácido acético 1%/etanol 50% (Borenfreund e Puerner, 1984). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle, a densidade óptica foi quantificada espectrofotometricamente (ELx 800 BIO-TEK) a 540 nm.

### **3.3.2. Ensaio de fototoxicidade por captação de vermelho neutro (NRU)**

As células BALB/c 3T3 e HaCaT foram plaqueadas numa densidade de 1x10<sup>5</sup> células/mL e 7x10<sup>4</sup> células/mL, respectivamente, em 2 placas de 96 poços, incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 h (Borenfreund e Puerner, 1984). Após esse período, o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes como PBS. O tratamento foi feito em várias concentrações dos compostos testes (1nM a 150 $\mu$ M), sendo utilizado como controle

positivo de fototoxicidade a hematoporfirina IX (HP) e negativo, a tiourea. O tempo de tratamento foi uma hora. Posteriormente uma placa contendo as amostras foi exposta à radiação UVA, irradiância de 1,7 mW/cm<sup>2</sup> (determinada com utilização de radiômetro - Cole Parmer, UVA - 365 nm), por 50 min, portanto dose de 5 J/cm<sup>2</sup>, utilizando uma lâmpada de UVA (Bellarium S 100 W - Wolff System - gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine do Instituto de Química da Unicamp). Outra placa contendo as amostras não foi exposta à radiação UVA. Após exposição à radiação o meio foi removido, os poços foram lavados duas vezes com PBS, adicionado meio de cultura com soro e realizada incubação por 22 h (período de recuperação). Após esse período, o meio de cultura foi removido e em seguida avaliada a viabilidade celular pela captação do vermelho neutro (item 3.3.1.2).

### **3.3.3. Determinação do Fator de Foto-irritação (PIF).**

O parâmetro a ser determinado no ensaio de fototoxicidade (modelo descrito no item 3.3.2.) é denominado fator de foto-irritação (PIF). O PIF é obtido pela razão entre os valores de IC<sub>50</sub> (concentração do composto que diminui em 50% a viabilidade celular) obtidos no experimento na ausência de radiação UVA (-UVA) e os valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos experimentos na presença da radiação UVA (+UVA), portanto o cálculo do PIF é determinado de acordo com a equação 1:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-UVA)}{IC_{50}(+UVA)} \text{ (equação 1)}$$

A equação 1 pode ser utilizada em situações onde é possível determinar os dois valores de IC<sub>50</sub>, na presença e na ausência de radiação. Nesse caso, o composto será

considerado fototóxico se o valor de PIF for  $\geq 5$ , no caso de PIF  $< 5$  o composto será considerado não fototóxico.

Caso não seja possível determinar o IC<sub>50</sub> na ausência de radiação, o valor de IC<sub>50</sub> (-UVA) deverá ser substituído pelo valor da concentração máxima testada [C<sub>max</sub> (-UVA)]:

$$PIF = \frac{C_{m\acute{a}x}(-UVA)}{IC_{50}(+UVA)} \text{ (equação 2)}$$

Caso o valor de PIF obtido pela equação 2 seja  $>1$  o composto será considerado fototóxico e para o PIF  $\leq 1$ , o composto será considerado não fototóxico.

Caso não seja possível determinar o valor de IC<sub>50</sub> na presença e na ausência de radiação, o PIF será calculado segundo a equação 3, onde o PIF será igual a 1.

$$PIF = \frac{C_{m\acute{a}x}(-UVA)}{C_{m\acute{a}x}(+UVA)} = 1 \text{ (equação 3)}$$

Nesta situação o valor do PIF sempre será 1, então o composto é considerado não fototóxico.

#### **3.3.4. Medida da proliferação celular (quantificação dos ácidos nucléicos)**

As células BALB/c 3T3 ( $2,0 \times 10^4$  células/mL/poço) e HaCaT ( $2,1 \times 10^4$  células/mL/poço) foram plaqueadas em placas de 24 cavidades e cultivadas por 24 h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após este período as células foram lavadas com PBS, tratadas com os compostos testes e em seguida expostas à radiação UVA (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>) durante 50 min ou mantidas no escuro. As células foram lavadas com tampão (PBS) e cultivadas novamente em meio completo, nas mesmas condições descritas anteriormente, por 22, 44 e 66 h. Após os tempos de tratamento especificados, as células foram lavadas com tampão PBS-Ca<sup>2+</sup> gelado, fixadas em tricloroacético (TCA) 5% e lisadas em 1 mL de hidróxido de

sódio (NaOH) (0,5 N). A proliferação relativa da população celular nos períodos foi calculada em função da diferença entre os valores de absorvância (260 nm) dos lisados celulares ao início e ao final do período de crescimento (Gesztési, 1990).

### **3.3.5. Determinação da atividade das caspases 3 e 8.**

As atividades de caspases (3 e 8) foram determinadas utilizando como substratos os lisados celulares (kit R&D Systems). Após o tratamento das células com a RF, as mesmas foram lisadas e a atividade das caspases quantificada pela mediante leitura da absorvância do produto p-nitroanilina (p-NA) no comprimento de onda 405 nm.

### **3.3.6. Western Blotting.**

As células BALB/c 3T3 ( $2,0 \times 10^6$ ) e HaCaT ( $1,4 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de Petri e cultivadas por 24 h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após este período as células foram lavadas com PBS, tratadas com diferentes concentrações de RF e, em seguida, expostas à radiação UVA (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>) durante 50 min ou mantidas no escuro. As células foram lavadas com tampão e cultivadas novamente em meio completo, nas mesmas condições descritas anteriormente, por 22 h. Após este período as células foram coletadas e centrifugadas por 5 min a 10000 g (Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11). O pellet foi coletado e lisado em 200 µL de tampão de lise 50 mM Tris -HCl [pH 7,4], 1% Tween 20, 0,25% deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM O-Vanadato, 1 mM NaF, e inibidores de proteases (1 µg/mL de aprotinina, 10 µg/mL de leupeptina e 1 mM 4-(cloridrato de fluoreto aminoetil benzosulfonila)) por 2 h em gelo. Os extratos proteicos foram centrifugados e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry

(Hartree, 1972). Aos extratos foi adicionado tampão de amostra na proporção 1:1. Tampão de amostra: 2X dodecil sulfato de sódio (SDS), 100 mM Tris-HCl [pH 6,8], 200 mM de ditioneitol (DTT), 4% SDS, 0,1% azul de bromofenol e 20% de glicerol. Os extratos celulares foram resolvidos por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) e transferidos para membranas de PVDF. As membranas foram então bloqueadas em 1% de leite desnatado em tampão salino Tris (TBS)-Tween 20 (0,05%) (TBS-t) e incubados “overnight” a 4°C com anticorpo primário NFκBp65/p50, Bcl-2, Caveolina-1, p-Caveolina, Bax, AIF, p21, p-IKKα e actina diluído em 1:1000. Após lavagem em TBS-t, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:5000) em tampão de bloqueamento por uma hora, seguido por lavagem em TBS. A detecção das bandas foi realizada através de quimioluminescência.

### **3.3.7. Zimografia.**

As células BALB/c 3T3 ( $3,0 \times 10^4$  células/mL/poço) e HaCaT ( $2,1 \times 10^4$  células/mL/poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas por 24 h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após este período as células foram lavadas com PBS, tratadas com os compostos testes e em seguida expostas à radiação UVA (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>) durante 50 min ou mantidas no escuro. As células foram lavadas com tampão e cultivadas novamente em meio completo, nas mesmas condições descritas anteriormente, por 22 h. Após este período de recuperação o meio de cultura foi coletado, centrifugado a 10000 g por 5 min (Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) e o sobrenadante coletado para a quantificação proteica pelo método de Lowry (Hartree, 1972).

As metaloproteinases (MMP-2 e -9) foram fracionadas em gel de poliacrilamida a 12% contendo gelatina a 4%. Após o fracionamento, os géis foram lavados em solução

aquosa de Triton X-100 (2% m/v) e incubados 18 h em tampão de proteólise (Tris-CaCl<sub>2</sub>) a 37°C. Foram realizados estudos com inibidor clássico EDTA (inibe MMP através do sequestro de zinco da solução) na concentração de 5,0 mM. O gel foi corado com solução contendo corante Coomassie Blue G-250 durante 3 h; em seguida, o gel foi descorado e fixado com solução contendo metanol 50% e glicerol 5% (Souza *et al.*, 2000). A análise das bandas foi realizada por densitometria pelo programa Scion Image.

### **3.3.8. Formulação de hidrogéis contendo riboflavina.**

Hidrogéis de F-127 contendo RF não-irradiada foram preparados pelo método “frio” descrito por Schmolka, 1972. O copolímero foi dissolvido em PBS a 5°C, homogeneizado levemente e em seguida transferido para um refrigerador (<10°C). Após o processo de dissolução “overnight”, uma solução de RF foi adicionada e adequadamente homogeneizada, a 5°C. Foram preparadas formulações variando a concentração dos copolímeros de 25, 30 e 35% m/m e de RF de 150 µM a 1 µM.

### **3.3.9. Incorporação da riboflavina em hidrogéis de copolímero.**

A incorporação da RF foi monitorada na faixa de comprimento de onda UV-Vis (300-800 nm) em espectrofotômetro com arranjo de diodos da Agilent, modelo 8453 com dispositivo de Peltier acoplado. Todos os experimentos foram conduzidos em cubetas de quartzo de um cm de caminho óptico. As soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas imediatamente antes do uso e mantidas sob abrigo da luz.

Os espectros de emissão de fluorescência da RF foram obtidos em espectrofluorímetro Hitachi F-4500, sendo utilizada fenda de 5 nm para excitação e 2,5 nm

para emissão e velocidade de varredura de 240 nm/min. As amostras foram excitadas com luz em 444 nm e leitura da emissão de 450 a 650 nm. As cubetas foram lavadas em solução sulfonítrica (HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 v/v) antes e, durante as leituras, lavadas exaustivamente com água e álcool. Todas as medidas foram realizadas a temperatura 22-25 °C.

### **3.3.10. Liberação *in vitro* da riboflavina a partir dos hidrogéis**

O modelo sem membrana foi utilizado para o teste de liberação *in vitro*. As soluções contendo os hidrogéis foram transferidas para tubos de ensaio e termostatizadas a 37°C, durante 20 min em banho termostático (COEL, Biomatic). O meio de liberação (PBS) foi pré-equilibrado a 37°C e adicionado 1,0 mL ao tubo, entrando o mesmo em contato com a superfície do gel contendo RF. Em tempos pré-determinados, as amostras do sobrenadante foram removidas e substituídas por soluções novas. A quantidade de RF liberada foi determinada espectrofotometricamente (Ultrospec 2000 UV/Visible spectrophotometer Pharmacia Biotech).

### **3.3.11. Ensaio de fototoxicidade por captação de vermelho neutro (NRU) a partir da liberação *in vitro* da riboflavina a partir dos hidrogéis**

As células BALB/c 3T3 e HaCaT foram plaqueadas numa densidade de  $6,3 \times 10^4$  células/mL e  $4,4 \times 10^4$  células/mL, respectivamente, em 2 placas de 24 poços, incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 h (Borenfreund e Puerner, 1984). Após esse período, o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes como PBS. O tratamento foi feito em transwell em várias concentrações dos compostos testes (10µM a 100µM) diluídas em hidrogel 25%, sendo utilizado como controle positivo de fototoxicidade a hematoporfirina

IX (HP) e negativo, a tiourea. O que se segue a esta metodologia é o ensaio de fototoxicidade por captação de vermelho neutro, descrito no item 3.3.2.

### **3.3.12. Forma de análise de resultados.**

Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados obtidos foram apresentados na forma de gráfico com seu respectivo desvio padrão. Para as análises estatísticas foi usado o programa one way ANOVA (e não paramétrico) com as amostras comparadas entre si pelo método de Tukey. Foram considerados significativamente diferentes os valores com  $P < 0,05$ .

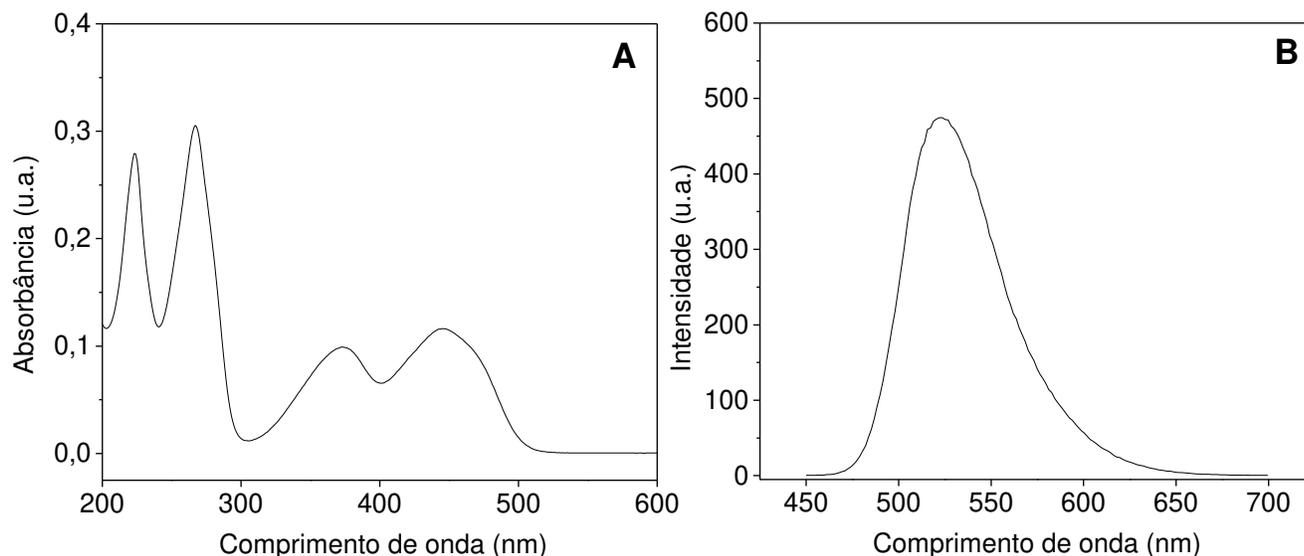
# Resultados e Discussão

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização e fotodecomposição da riboflavina

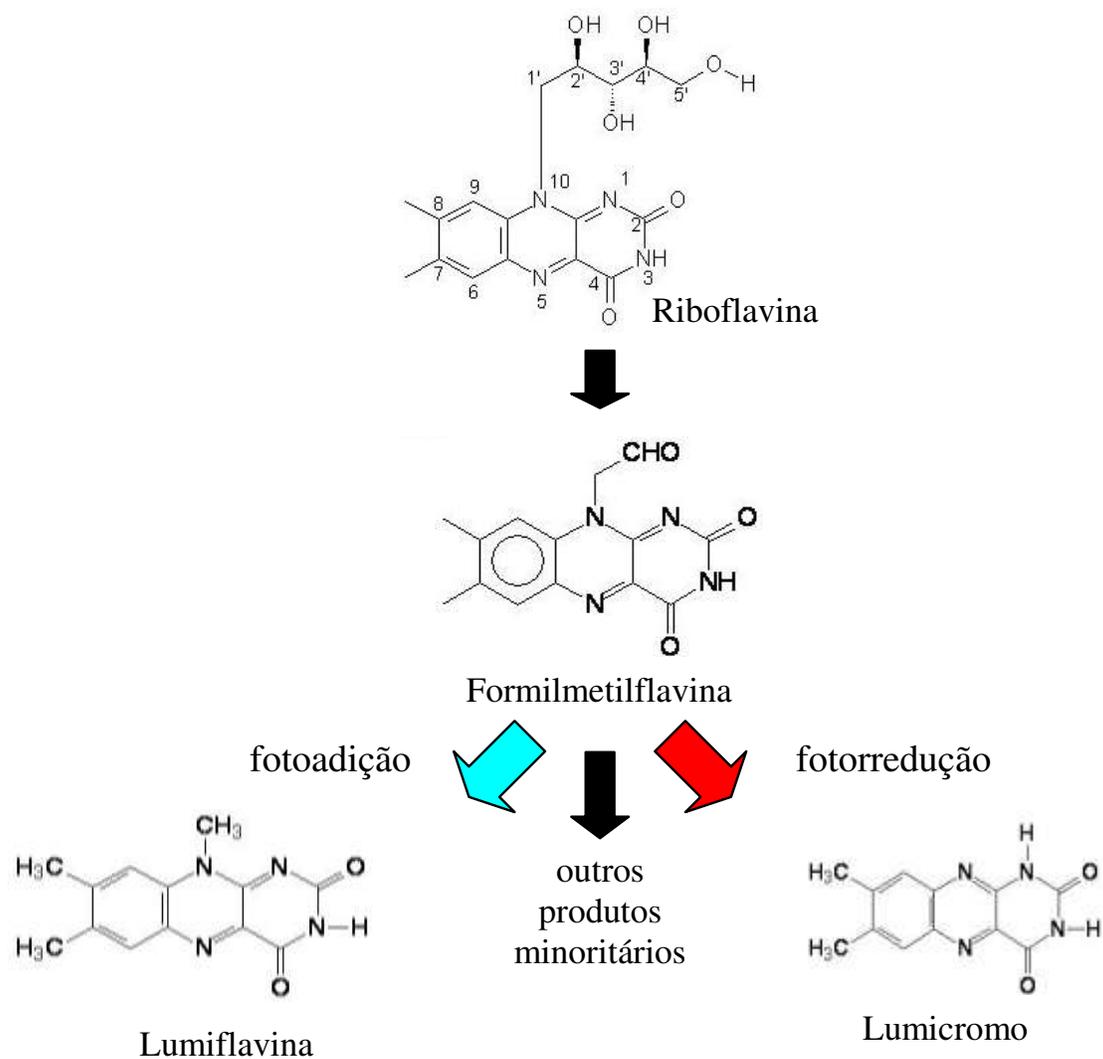
O espectro de absorção no UV/Vis da riboflavina (RF) em solução aquosa apresenta quatro bandas características com comprimentos de onda máximos ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) em 220, 265, 375 e 446 nm (Figura 3A). As bandas não se apresentam estruturadas e segundo a literatura (Heelis, 1982) são atribuídas a transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

A RF, como todas as flavinas, exibe fluorescência amarela brilhante em solução aquosa com máximo no comprimento de onda 520 nm como pode ser observado na Figura 3B.



**Figura 3: Caracterização espectral da RF em tampão PBS:** A RF 8,0  $\mu\text{M}$  foi dissolvida em água e o espectro de absorção no UV/Vis (A) foi obtido em um espectrofotômetro com arranjo de diodos da Agilent, modelo 8453 com dispositivo Peltier acoplado. O espectro de emissão de fluorescência (B) da RF foi obtido em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, sendo utilizada uma fenda de 5 nm para excitação e 2,5 nm para emissão e uma velocidade de varredura de 240 nm/min. A amostra foi excitada em 444 nm e conseqüente leitura da emissão de 450 a 700 nm.

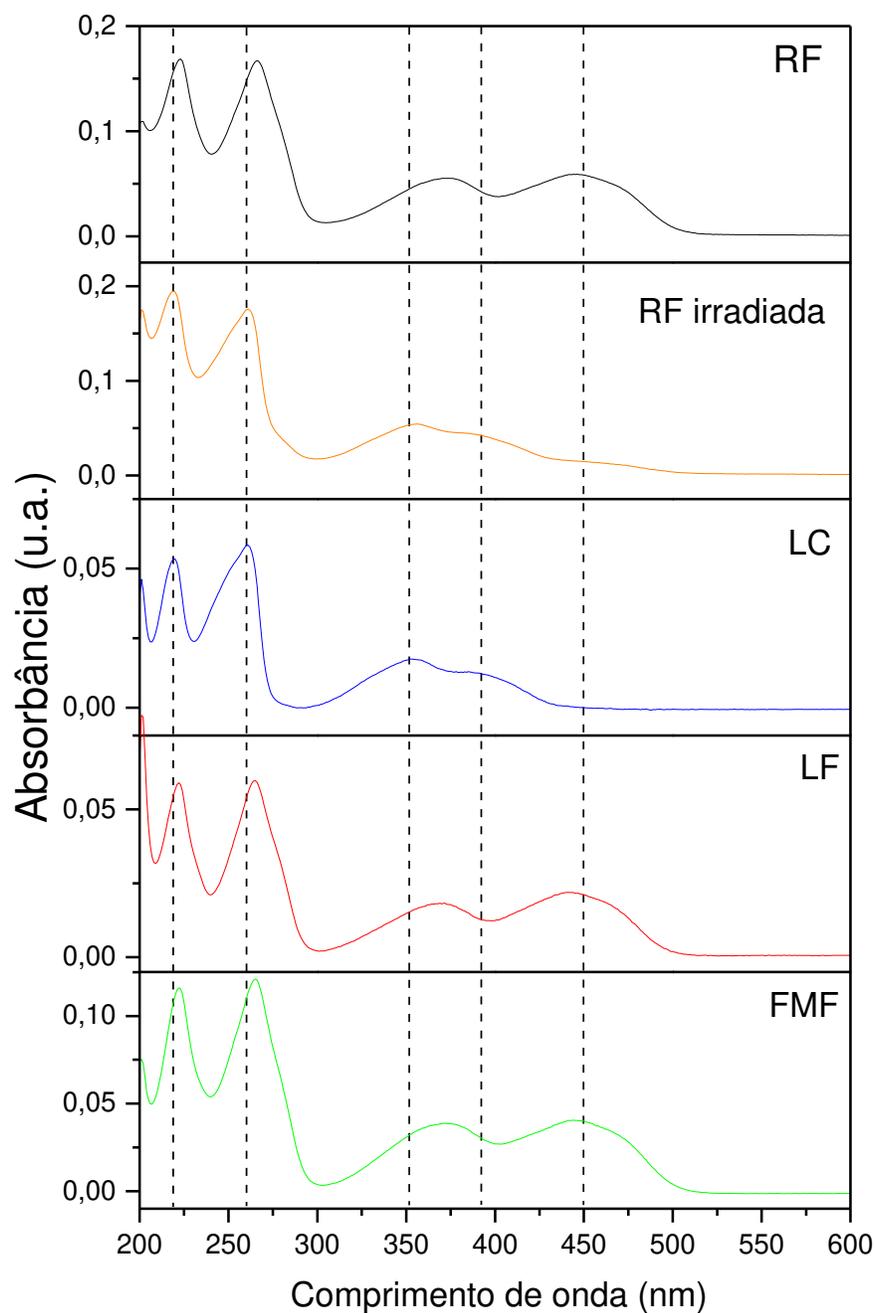
As flavinas, de modo geral, quando irradiadas podem sofrer reações de fotorredução, fotodealquilação ou fotoadição (Heelis, 1982). A literatura mostra que na fotodecomposição da RF, a formilmetilflavina (FMF) é o principal intermediário o qual hidrolisa formando o lumicromo (LC) e a lumiflavina (LF) como fotoprodutos majoritários (Ina, 1959; Guttman, 1962; Treadwell *et al.*, 1968; Heelis, 1980; Ahmad e Rapson, 1990; Ahmad *et al.*, 2004). De Souza Queiroz e colaboradores (2007) determinaram, por espectrometria de massas, que os fotoprodutos da RF irradiada em meio de cultura encontram-se distribuídos da seguinte maneira: RF (79%), lumicromo (6,2%) e a uma mistura composta de formilmetilflavina, lumiflavina, 2-cetoriboflavina e 4-cetoriboflavina (14,8%). Embora os fotoprodutos majoritários sejam conhecidos, uma determinação mais exata de todos os fotoprodutos formados é muito complexa, uma vez que praticamente todos eles mantêm a estrutura dos anéis (flavina), alterando apenas os grupos ligados ao N1 ou N10. O esquema 2 mostra algumas das possíveis reações de fotodecomposição da RF.



**Esquema 2: Possíveis reações de fotodecomposição da RF.** O lumicromo e a lumiflavina são os principais fotoprodutos.

A Figura 4 mostra os espectros no UV/Vis da RF antes e após a irradiação, respectivamente. Observa-se que as bandas características da RF com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 374 e 446 nm foram drasticamente reduzidas, ocorrendo o aparecimento de nova banda com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 356 nm e dois ombros em 386 e 455 nm. Além disso, nota-se que o deslocamento dos  $\lambda_{\text{máx}}$  em 223 e 266 nm para 219 e 261 nm. Observa-se que o LC apresenta bandas com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 219, 261, 353 nm e um ombro em 385 nm e a LF apresenta bandas com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 222, 265, 371 e 445 nm (tabela 1).

Através da comparação entre os espectros pode-se concluir que, provavelmente o fotoproduto majoritário é o lumicromo, devido às bandas com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 219, 261 e 356 nm. O ombro em 450 nm pode ser atribuído tanto à LF formada em uma proporção menor, como à RF remanescente. Embora a análise espectral indique esses dois fotoprodutos, a formação de intermediários como FMF e outros fotoprodutos não pode ser descartada, uma vez que essas espécies devem apresentar absorções nessas mesmas regiões e, portanto, as bandas podem estar sobrepostas.



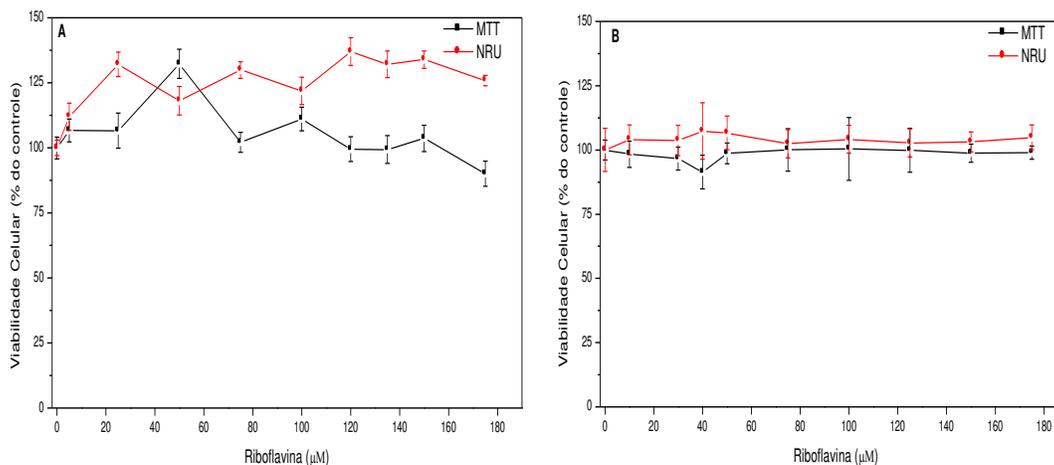
**Figura 4:** Fotodecomposição da RF em tampão PBS- $\text{Ca}^{2+}$ : Espectros de absorção no UV/Vis de soluções de RF, RF após irradiação, lumicromo (LC), lumiflavina (LF) e metilformilflavina (FMF). Dose de radiação de  $5 \text{ J/cm}^2$  ( $1,7 \text{ mW/cm}^2$  por um período de 50 minutos).

**Tabela 1.**  $\lambda_{\text{máx}}$  das bandas características das RF, RF irradiada, LC, LF e FMF.

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)				
RF	223	266	374	-	446
RF irradiada	219	261	356	386 (ombro)	450 (ombro)
LC	219	261	353	385 (ombro)	-
LF	222	265	371	-	445
FMF	222	265	370	-	441

#### 4.2. Avaliação da citotoxicidade da riboflavina através da redução do MTT e captação do VN

A Figura 5 mostra o efeito da RF na função mitocondrial (redução do MTT) e na integridade da membrana lisossomal (captação do VN) das células BALB/c 3T3 e HaCaT. Pode-se observar que em toda a faixa de concentração analisada de 10 a 175  $\mu\text{M}$ , a RF não se apresentou citotóxica, em termos de diminuição do número de células. No entanto, para os fibroblastos observamos aumento da captação do VN em torno de 30%, o que indica aumento do tamanho ou da quantidade de lisossomos (Figura 5A). A concentração máxima da RF utilizada foi definida de acordo com seu limite de solubilidade em PBS. Os resultados sugerem que a RF apresenta baixo potencial tóxico em células normais da pele.



**Figura 5:** Avaliação da citotoxicidade da RF em células BALB/c 3T3 e HaCaT: As células BALB/c 3T3 (A) e HaCaT (B) foram tratadas com diferentes concentrações de RF por 24h. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT (-■-) e captação de NRU (-●-) em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas à RF. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

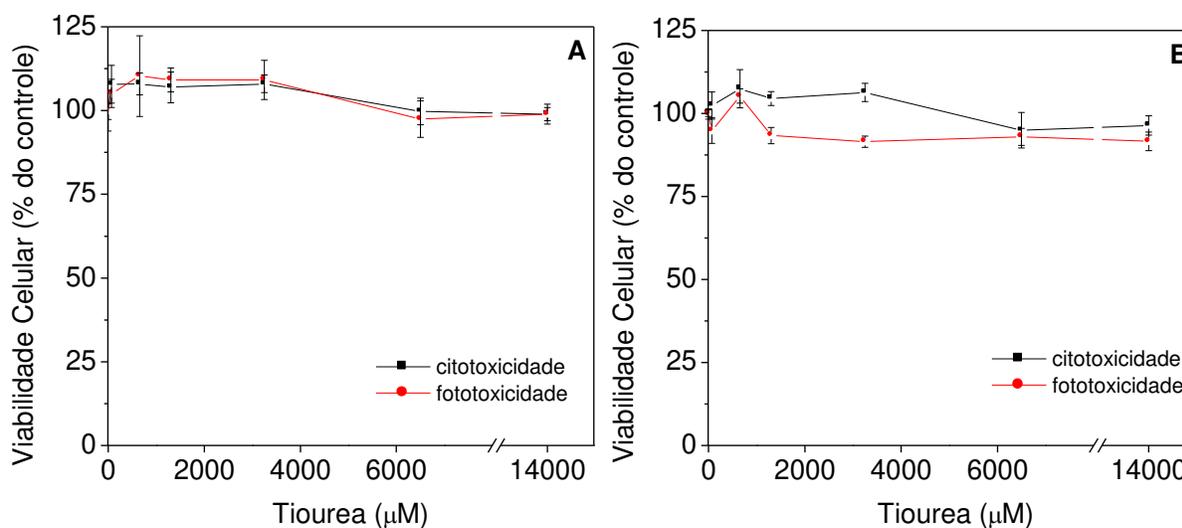
#### 4.3. Padronização do método de avaliação da fototoxicidade

A fototoxicidade induz fotoirritação *in vivo*, uma reação inflamatória reversível na pele causada pela aplicação tópica ou administração sistêmica de substâncias químicas e subsequente exposição à luz, particularmente às radiações UVA. Desta forma, quando se pretende usar novas substâncias químicas em produtos dermatológicos a avaliação do potencial fototóxico dos componentes da formulação representa um passo essencial durante o desenvolvimento do produto (Augustin *et al.*, 1997; Onoue e Tsuda, 2006).

A padronização do ensaio de fototoxicidade foi realizada utilizando células de fibroblastos (BALB/c 3T3) e queratinócitos (HaCaT). Segundo o guia da OECD para o teste de fototoxicidade por captação de VN, as doses de radiação podem variar de 1 a 9 J/cm<sup>2</sup>. A avaliação da viabilidade das células é realizada após irradiá-las em dose de 5

J/cm<sup>2</sup>, sendo considerada aceitável uma redução na viabilidade de até 20%, quando comparado com o controle no escuro. Nos estudos realizados neste trabalho, a redução na viabilidade devido à radiação manteve-se no intervalo de 10 a 15%. Nos ensaios de fototoxicidade, a tiourea e a hematoporfirina foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente.

De acordo com a Figura 6, a tiourea não apresenta citotoxicidade e nem fototoxicidade nas duas linhagens em toda a faixa de concentração testada (65 µM-14 mM). Embora a tiouréia apresente intensa absorbância na região ultravioleta, a ausência do efeito fototóxico parece não estar relacionada inteiramente a sua capacidade de atuação como filtro. O efeito parece ser específico para os compostos que contêm o grupo ligado do carbono-enxofre (Helleday *et al.*, 1998).



**Figura 6:** Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da tiourea: As células BALB/c 3T3 (A) e HaCaT (B) foram tratadas com concentrações diferentes de tiourea por 1h e (-●-) foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou (-■-) mantidas no escuro por 50 minutos. Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas à tiouréia. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

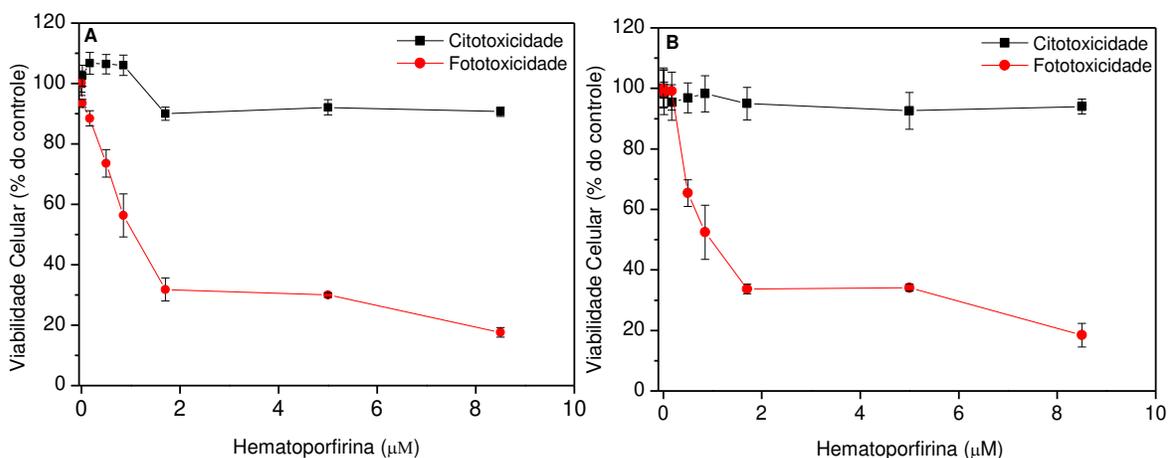
O valor de PIF calculado, de acordo com a equação 3, para a tiouréia é igual a 1.

$$PIF = \frac{C_{m\acute{a}x}(-UVA)}{C_{m\acute{a}x}(+UVA)} = 1 \text{ (equação 3)}$$

Assim, pode-se considerar que a tiouréia não apresenta potencial fototóxico, podendo ser utilizada como controle negativo para os experimentos de fototoxicidade.

A Figura 7 mostra o efeito da hematoporfirina (HP) nas células BALB/c 3T3 e HaCaT no escuro e sob radiação UVA, na dose de 5 J/cm<sup>2</sup>. No escuro não foi observada citotoxicidade, enquanto sob radiação UVA foi obtido o valor de IC<sub>50</sub> de 1,16 μM nas células BALB/c 3T3 e 0,90 μM nas células HaCaT.

A HP é sensível à radiação UV e visível e quando irradiada produz oxigênio singlete, espécie conhecidamente citotóxica (Suwa *et al.*, 1977).



**Figura 7:** Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da hematoporfirina: As células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram tratadas com concentrações diferentes de hematoporfirina por 1h e (-●-) foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou (-■-) mantidas no escuro por 50 minutos. Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas à HP. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

O valor de PIF para HP foi calculado utilizando a equação:

$$PIF = \frac{C_{m\acute{a}x}(-UVA)}{IC_{50}(+UVA)} \text{ (equação 2)}$$

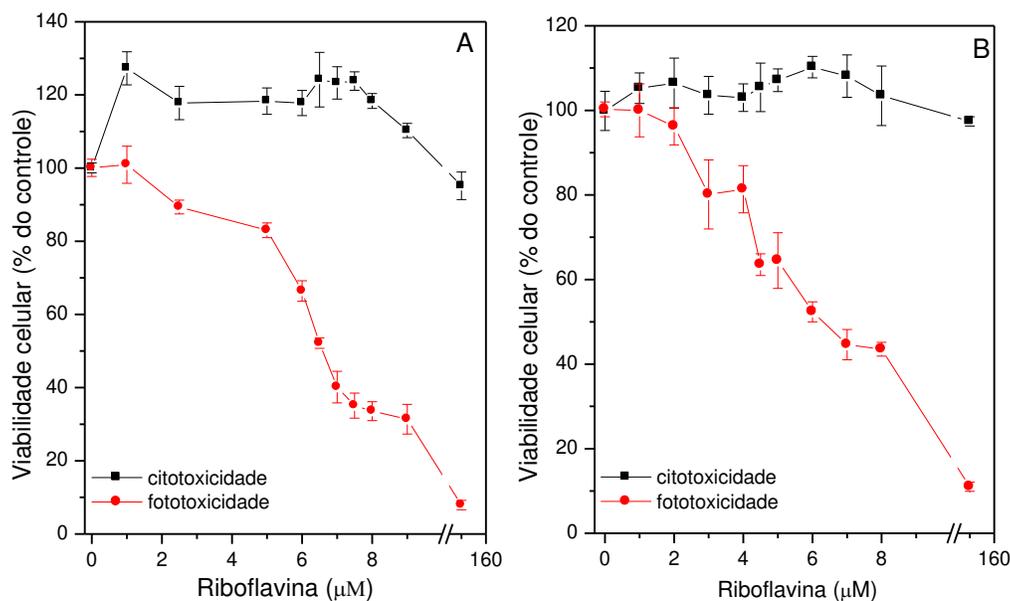
Embora a EU/COLIPA tenha validado o ensaio de fototoxicidade apenas para as células BALB/c 3T3, para efeito de comparação o valor de PIF também foi calculado para as células HaCaT. Os valores de PIF para as linhagens foram 7,32 e 9,44 para BALB/c 3T3 e HaCaT, respectivamente. Comparando os valores de PIF é possível concluir que para a HP, as duas linhagens apresentaram valores de PIF próximos. A EU/COLIPA determina que para que um composto seja considerado fototóxico o valor de PIF deve ser >1. Portanto, a HP é considerada fototóxica, podendo ser utilizada como controle positivo no ensaio de fototoxicidade para ambas as linhagens celulares.

#### **4.4. Avaliação da fototoxicidade da riboflavina**

A RF apresenta sensibilidade às radiações UV e visível e sua fotodecomposição pode gerar espécies reativas de oxigênio e outros fotoprodutos tóxicos às células (Silva *et al.*, 1994; Edwards e Silva, 2001). Alguns relatos na literatura têm demonstrado que a RF previamente irradiada e em seguida incubada com células tumorais pode ativar vias de transdução de sinais associadas com indução de apoptose (Edwards *et al.*, 1994; Massey, 2000; Souza *et al.*, 2006; de Souza Queiroz *et al.*, 2007). Portanto, avaliamos o potencial fototóxico da riboflavina nas células BALB/c 3T3 e HaCaT.

#### 4.4.1. Avaliação da viabilidade celular através da captação do VN

O efeito da RF nas células BALB/c 3T3 e HaCaT foi avaliado nas concentrações de 1 a 150  $\mu\text{M}$ . A Figura 8 mostra que a RF não apresenta citotoxicidade em toda a faixa de concentração estudada. Por outro lado, sob irradiação, foi possível obter os valores de  $\text{IC}_{50}$  de 6,5 e 6,0  $\mu\text{M}$  para as linhagens celulares BALB/c 3T3 e HaCaT, respectivamente.



**Figura 8:** Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da RF: As células BALB/c 3T3 (A) e HaCaT (B) foram tratadas com concentrações diferentes de RF por 1h e em seguida expostas à radiação UVA (dose  $5 \text{ J/cm}^2$  -●-) ou mantidas no escuro por 50 minutos (-■-). Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao controle, onde as células não foram expostas à RF. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

Utilizando a equação 2 foram obtidos os valores de PIF igual a 23 e 25 para as células BALB/c 3T3 e HaCaT, respectivamente. Os valores de PIF obtidos foram maiores que 1, indicando que a RF é um composto fototóxico para ambas as linhagens celulares. A

Tabela 2 mostra os valores de PIF obtidos para os padrões e RF nas duas linhagens celulares.

**Tabela 2:** Valores de IC<sub>50</sub> e PIF para os padrões e RF.

Composto	BALB/c 3T3			HaCaT		
	IC <sub>50</sub> (-UVA)	IC <sub>50</sub> (+UVA)	PIF	IC <sub>50</sub> (-UVA)	IC <sub>50</sub> (+UVA)	PIF
Tiouréia	14 mM	14 mM	1	14 mM	14 mM	1
Hematoporfirina	8,5 µM	1,2 µM	7,3	8,5 µM	0,9 µM	9,4
Riboflavina	150 µM	6,5 µM	23	150 µM	6,0 µM	25

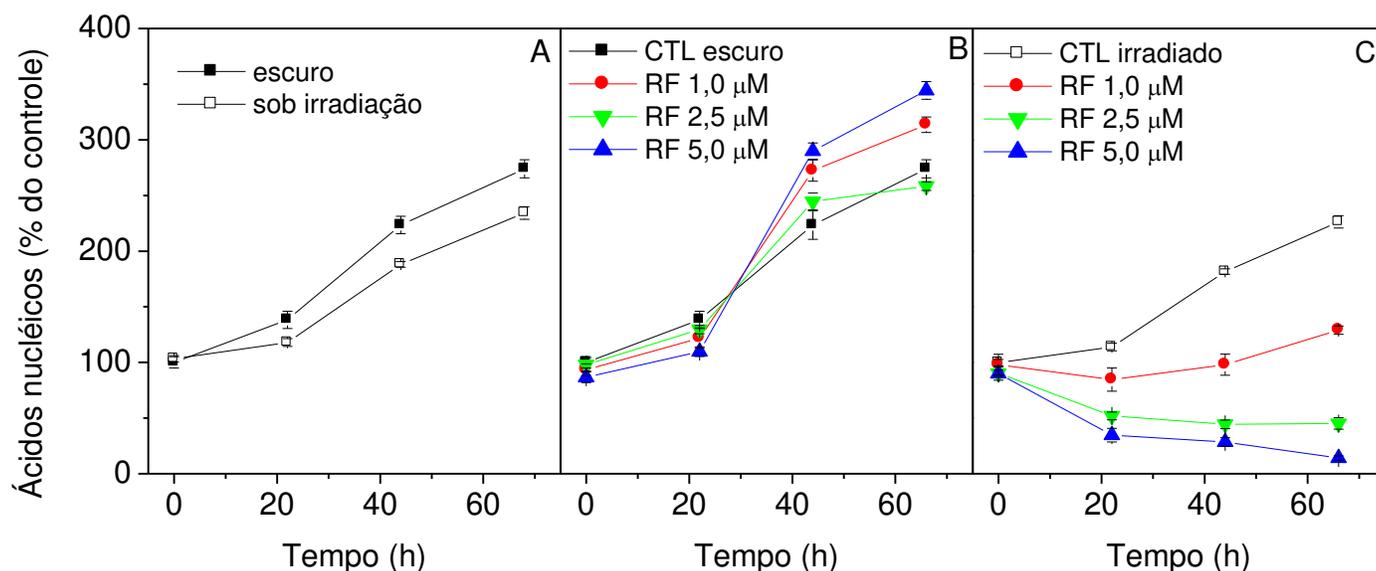
Considerando os resultados obtidos na Figura 4 é possível sugerir que o efeito fototóxico observado deve-se à formação de espécies tóxicas durante a fotodecomposição da RF.

Os modelos celulares relevantes para testes de agentes irritantes para pele são os fibroblastos e os queratinócitos (Benavides *et al.*, 2004). Embora a literatura (Dijoux *et al.* 2006) indique que os queratinócitos apresentem menor sensibilidade a xenobióticos, quando comparados com células de fibroblastos, nos experimentos apresentados nesse trabalho, as células HaCaT mostraram sensibilidade semelhante às células BALB/c 3T3. Portanto, pode-se concluir que a linhagem HaCaT é um bom modelo para avaliação da fototoxicidade.

#### **4.4.2. Avaliação da viabilidade celular através da medida de proliferação celular**

Em doses fisiologicamente relevantes, a geração de espécies reativas de oxigênio pela radiação UV ativa inúmeras vias de sinalização, causando peroxidação lipídica e induzindo dano oxidativo ao DNA e às proteínas celulares (Campbell *et al.*, 1993).

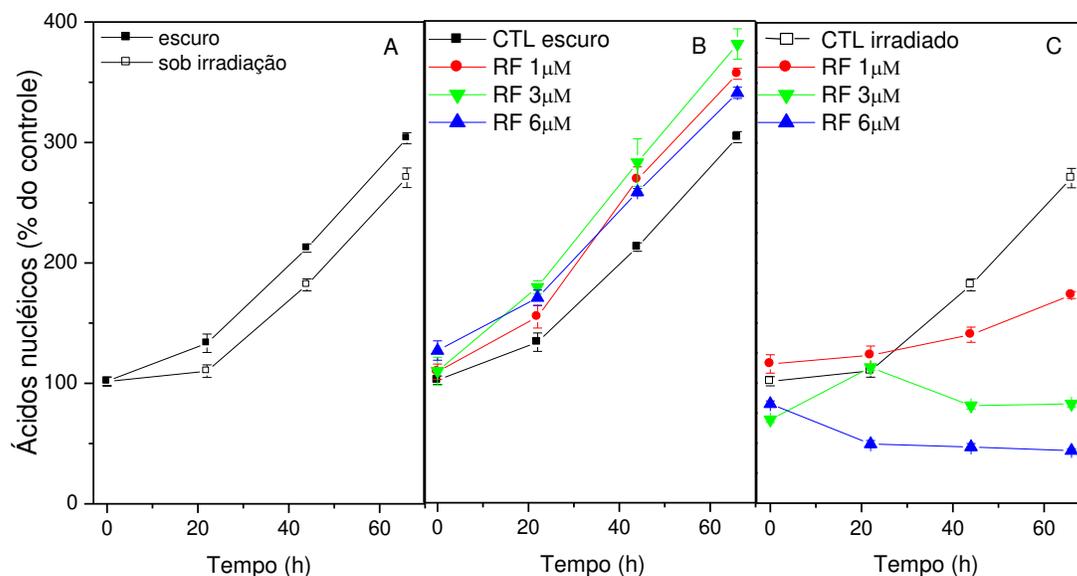
As Figuras 9A e 10A mostram que a exposição das células HaCaT e BALB/c 3T3, respectivamente, à radiação UVA causou apenas pequena redução na proliferação celular, quando comparado às células que foram mantidas no escuro.



**Figura 9:** Efeito da radiação UVA e RF na proliferação celular: **(A)** As células HaCaT foram (-□-) expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou (-■-) mantidas no escuro por 50 min. após esse período as soluções foram substituídas por meio de cultura suplementado e foram feitas as quantificações dos ácidos nucleicos nos tempos de recuperação de 22, 44 e 66 h. As células foram incubadas durante 1 h com concentrações variadas de RF (de 1,0 a 5,0 μM) e **(B)** mantidas no escuro durante 50 min e **(C)** foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>). Os ácidos nucleicos foram quantificados após os períodos de recuperação de 22, 44 e 66 h. A proliferação relativa foi expressa como percentual da variação da absorbância em 260 nm em relação ao ensaio controle, onde as células foram mantidas no escuro na ausência de RF. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

Observa-se nas Figuras 9B e 10B que a RF no escuro não inibe a proliferação celular, sendo possível notar aumento da proliferação na concentração de 5,0 μM e 6,0 μM nas linhagens HaCaT e BALB/c 3T3, respectivamente, nos períodos de 44 e 66 h. Por outro lado, a RF sob irradiação causou redução significativa na proliferação celular e de forma dependente da dose. Esses resultados mostram que o efeito se deve à RF sob irradiação,

uma vez que a irradiação *per se* não afeta a proliferação das células estudadas. Tal efeito era esperado uma vez que se sabe que a fotodecomposição da RF leva à geração de radicais intermediários, além de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (Souza *et al.*, 2005).



**Figura 10:** Efeito da radiação UVA e RF na proliferação celular: **(A)** As células BALB/c 3T3 foram (-□-) expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou (-■-) mantidas no escuro por 50 min. após esse período as soluções foram substituídas por meio de cultura suplementado e foram feitas as quantificações dos ácidos nucleicos nos tempos de recuperação de 22, 44 e 66 h. As células foram incubadas durante 1 h com concentrações variadas de RF (1,0-6,0 µM) e **(B)** mantidas no escuro durante 50 min e **(C)** foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>). Os ácidos nucleicos foram quantificados após os períodos de recuperação de 22, 44 e 66 h. A proliferação relativa foi expressa como percentual da variação da absorbância em 260 nm em relação ao ensaio controle, onde as células foram mantidas no escuro na ausência de RF. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

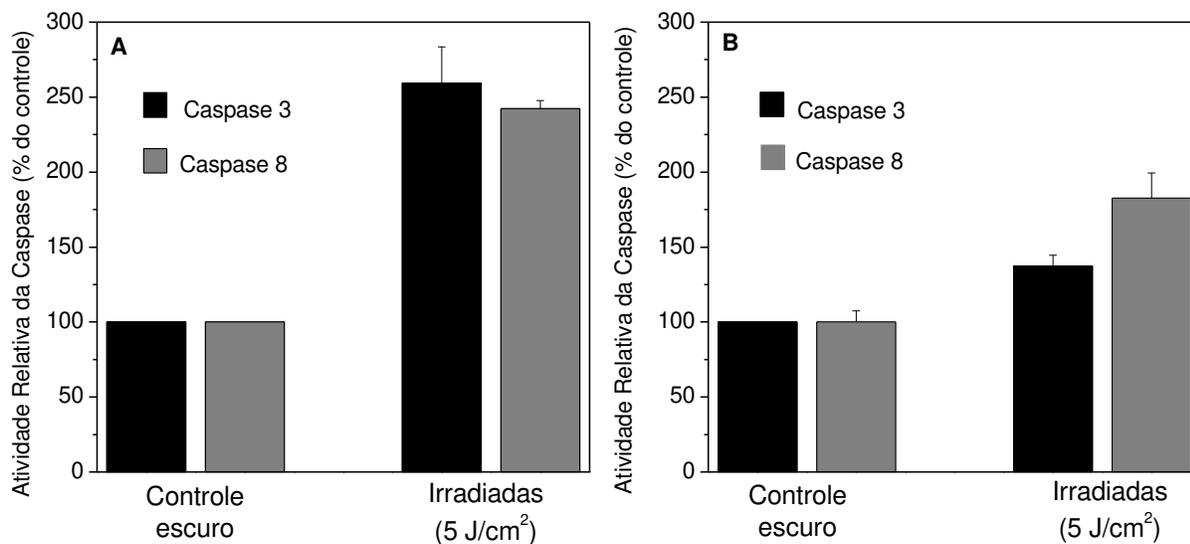
## **4.5. Irradiação com luz UVA em células *versus* marcadores moleculares**

### **4.5.1. Irradiação com luz UVA em células *versus* marcadores moleculares de apoptose**

As caspases podem ser divididas em dois grandes grupos. O primeiro é formado pelas caspases iniciadoras (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 e 12) responsáveis pelo início do processo apoptótico, após estímulo de morte e levam a ativação de caspases efetoras. O segundo grupo se constitui de caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) envolvidas na clivagem de múltiplos substratos durante a fase de execução da apoptose, resultando nas alterações morfológicas típicas do processo (Assunção Guimarães e Linden, 2004). Na via extrínseca o sinal de morte é transmitido através de um ligante extracelular. Este leva à trimerização das subunidades dos receptores e ao recrutamento de proteínas citoplasmáticas, que levam à ativação de proteases (caspases) que irão atuar sobre diferentes substratos. Uma vez ativa, a caspase 8 cliva e ativa a caspase 3 e induz diretamente a fase de execução do processo apoptótico. A via intrínseca envolve a ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, que agem na membrana mitocondrial levando ao extravasamento de fatores apoptogênicos como citocromo c, AIF, Smac/DIABLO, entre outras e a ativação das caspases efetoras (Kaufmann e Hengartner, 2001; Wang e El-Deiry, 2003). Dessa forma, a caspase 3 pode ser ativada tanto pela via extrínseca (via caspase 8) como pela via intrínseca.

A Figura 11 mostra a atividade relativa das caspases, sendo uma delas iniciadora (caspase 8) e outra efetora (caspase 3), após a exposição das células à radiação UVA. Nota-se que tanto na linhagem BALB/c 3T3 (Figura 11A) como na HaCaT (Figura 11B) ocorre aumento nas atividades das caspases. A radiação parece levar a maior aumento da atividade

das caspases nas células BALB/c 3T3, sugerindo que elas podem ser mais sensíveis à radiação que as células HaCaT.



**Figura 11:** Efeito da radiação UVA na atividade relativa das caspases 3 e 8: Células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou mantidas no escuro por 50 minutos (controle). Os valores foram expressos em porcentagens da atividade relativa das caspases em relação ao ensaio controle, onde as células foram mantidas no escuro. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

Chen e colaboradores (2000) demonstraram que concentrações subcitotóxicas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem induzir apoptose em fibroblastos humanos, IMR-90. Estes pesquisadores induziram o estresse oxidativo através da exposição das células a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM por 2 h com diferentes tempos de recuperação. O aumento da atividade da caspase 3 foi observado após 8 h de recuperação, com seu pico em 16 h e após 24 h o início de sua redução. Frank e colaboradores (2004) reportaram que, em fibroblastos humanos, a radiação UVB (dose de 1500 J/m<sup>2</sup>) levou ao aumento da atividade das caspases 3 e 9 após 4 dias, demonstrando que a dose aplicada leva à ativação das vias apoptóticas. Assim, é possível supor que a dose de radiação UV aplicada nos fibroblastos, mesmo sendo subcitotóxica (redução de viabilidade

celular observada menor que 15%) foi suficiente para ativação de vias de transdução de sinal, dentre elas a de morte apoptótica nos fibroblastos.

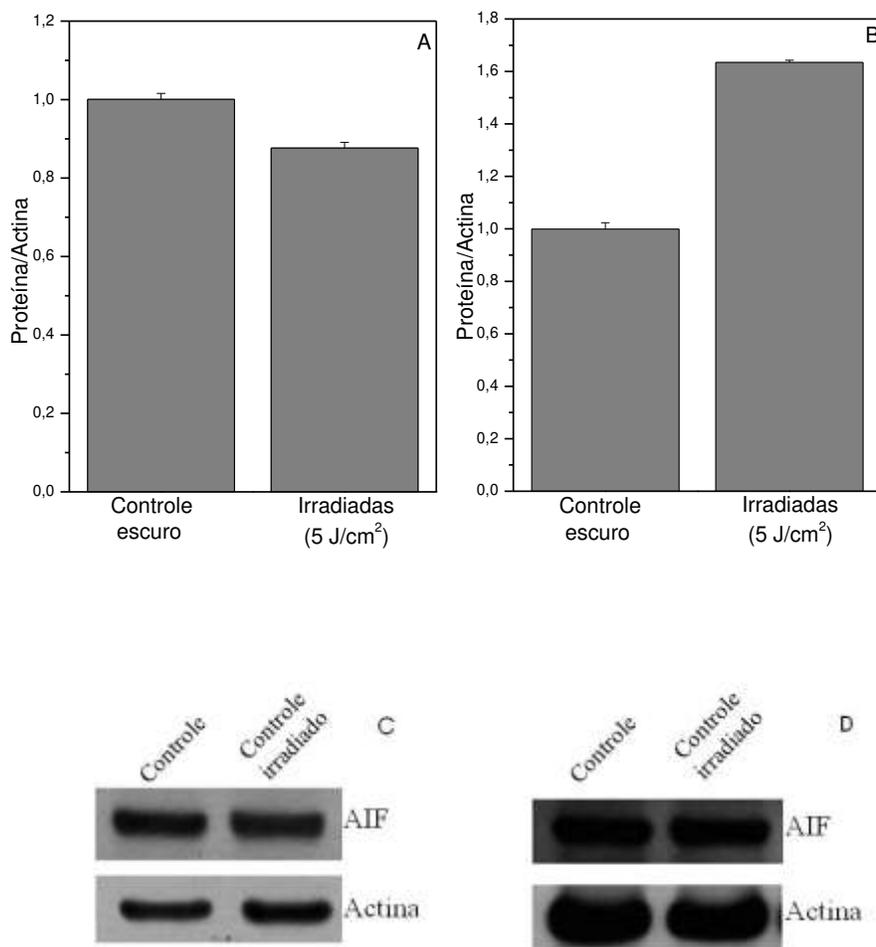
Outro fator que pode estar contribuindo para ativação da caspase 3 são as proteínas que translocam da mitocôndria para o citoplasma. A radiação pode estar ativando vias que afetam a permeabilidade da membrana mitocondrial e clivam esta caspase, tornando-a ativa para desencadear a apoptose. Neste sentido, Frank e colaboradores (2004) reportaram que a exposição de fibroblastos humanos à radiação infravermelha (dose de 1620 kJ/cm<sup>2</sup>), leva à translocação de citocromo c e SMAC/Diablo da mitocôndria para o citoplasma demonstrando, assim, que a radiação subtóxica leva à alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial.

Na irradiação das células HaCaT (Figura 11B) com UVA na dose de 5,0 J/cm<sup>2</sup>, foi observado que a caspase 8 (iniciadora) se mostrou mais ativa que a caspase 3 (efetora). Tais resultados foram opostos aos apresentados por Shimuzi e colaboradores (1999) e por El-Mahdy e colaboradores (2008). Os dois grupos de pesquisadores observaram que a irradiação de células HaCaT com luz UVB aumenta as atividades de caspases 1 e 3 no primeiro trabalho e caspases 3, 8 e 9 no segundo trabalho, sendo que a caspase 3 (efetora) mostrou-se mais ativa que as demais (1, 8 e 9) que são iniciadoras indicando que a via intrínseca pode estar mais ativa que a via extrínseca. Contudo, em nosso estudo, observamos que nas células HaCaT irradiadas com UVA, a via extrínseca de indução de apoptose parece estar levemente mais ativa que a intrínseca, embora, não seja notada redução significativa na viabilidade celular (menor que 15%).

Além da atividade das caspases, outro indicativo de indução de apoptose por via intrínseca é a liberação do fator de indução de apoptose (AIF). Yuan e colaboradores (2004) mostraram que nas células Raj (linfócitos B humanos) a indução de apoptose pela

radiação UVA é dependente de caspase e AIF. Assim, para esclarecer qual a via de indução de apoptose é predominante, foi analisada a proteína AIF como mostrado na Figura 12.

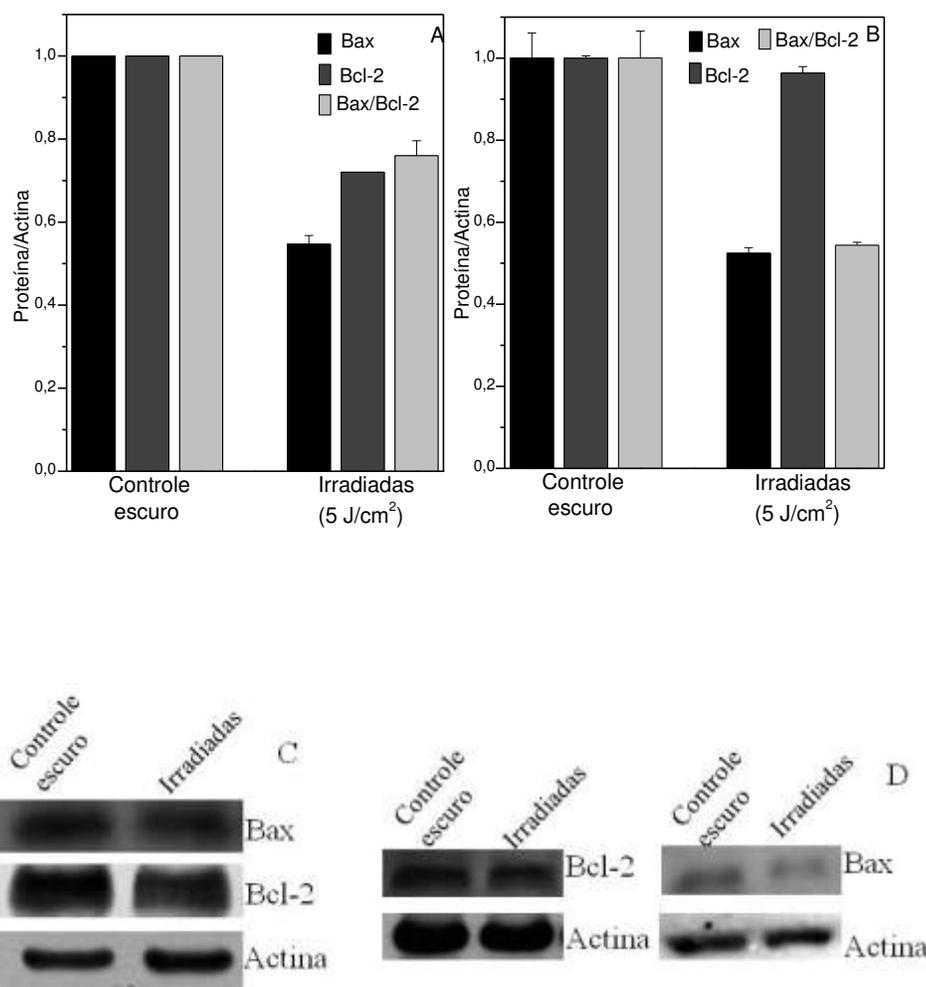
O perfil de expressão da proteína AIF em ambas as células foi diferente (Figura 12 A e B). Nas células BALB/c 3T3 houve leve diminuição na expressão da proteína AIF enquanto nas células HaCaT houve aumento, quando as células foram expostas a radiação UVA. A pequena redução no nível de AIF, observada na Figura 12A, indica que esta espécie não está contribuindo para a indução de morte apoptótica, nas células BALB/c 3T3, na dose de radiação UVA aplicada. Talvez, essa dose seja insuficiente para afetar a permeabilidade da membrana mitocondrial, uma vez que Frank e colaboradores (2004) observaram resposta semelhante ao irradiar células de fibroblastos humanos, com luz infravermelha. Estes autores não observaram alteração nos níveis de AIF em doses de 1620 kJ/cm<sup>2</sup> após 6 e 18 h de recuperação. Então, pode-se supor que a dose aplicada não afetou de forma significativa a permeabilidade da membrana mitocondrial, evitando a translocação de AIF da mitocôndria para o citoplasma. Na HaCaT (Figura 12B) os níveis de AIF aumentaram quando as células foram irradiadas. Neste caso, provavelmente a dose aplicada de UVA foi suficiente para afetar a permeabilidade da membrana mitocondrial permitindo que o AIF se translocasse para o citoplasma, aumentando a ativação de vias de morte apoptótica. Concordando com nossos resultados, Chinnathambi e colaboradores (2008) demonstraram em cultura primária de queratinócitos de pele humana que em condição de exposição das células à situação de estresse oxidativo os níveis de AIF aumentam após 18 h do tratamento.



**Figura 12:** Efeito da radiação UVA na atividade relativa da proteína AIF: Células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou mantidas no escuro por 50 minutos (controle). Os valores foram expressos da análise densitométrica em relação ao ensaio controle, onde as células foram mantidas no escuro. A actina foi utilizada como controle interno da concentração da mostra aplicada no gel. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75 µg de proteína. Expressão de AIF detectada por immunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA ou mantidas no escuro.

Outro parâmetro de avaliação de indução de apoptose é a expressão de Bax e Bcl-2. A liberação de citocromo c no citoplasma é um fator que conduz à morte celular, sendo Bax uma proteína envolvida na formação de poros que permitem tal liberação, e Bcl-2 uma inibidora de Bax. Assim, a razão Bax/Bcl-2 pode ser utilizada como outro parâmetro para a

avaliação da indução de apoptose por via intrínseca. A Figura 13 apresenta a expressão de proteína pró-apoptótica (Bax) e anti-apoptótica (Bcl-2) e a razão entre elas. Tanto nas células BALB/c 3T3 (Figura 13A) quanto nas células HaCaT (Figura 13B) a irradiação leva a redução de aproximadamente 40% e 50%, respectivamente, na proteína pró-apoptótica Bax. Isso sugere que a proteína pró-apoptótica não foi ativada com a dose subcitotóxica de radiação UVA. A proteína anti-apoptótica Bcl-2 apresentou redução de 25% nos fibroblastos enquanto nos queratinócitos não apresentou diferença estatística quando as células foram irradiadas. Na literatura podem-se encontrar resultados semelhantes, de ausência de alteração ou redução de Bax e Bcl-2 quando células são submetidas a estresse oxidativo induzido por radiação ou agentes oxidantes. Chen e colaboradores (2000) reportaram que em fibroblastos humanos IMR-90 tratados por 2 h com 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$ , a expressão de Bcl-2 não apresenta aumento após 14 e 21 h. Sua elevação somente foi observada após 27 h do tratamento. Quando os mesmos autores estudaram a expressão de Bax nessas condições, não houve aumento em nenhum dos tempos de recuperação estudados. El-Mahdy e colaboradores (2008) demonstraram que nas células HaCaT a expressão de Bax diminui e Bcl-2 permanece próxima ao controle quando as células HaCaT são expostas a uma dose de 15  $mJ/cm^2$  de radiação UVB por 30 min.



**Figura 13:** Efeito da radiação UVA na atividade relativa das proteínas Bax e Bcl-2: Células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou mantidas no escuro por 50 minutos (controle). Os valores foram expressos da análise densitométrica em relação ao ensaio controle, onde as células foram mantidas no escuro. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,005) e para todas as amostras foram aplicados 75 µg de proteína. Expressão de Bax e Bcl-2 detectada por imunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA ou mantidas no escuro.

A partir dos resultados encontrados neste trabalho foi possível verificar que a dose de 5 J/cm<sup>2</sup> de radiação UVA foi capaz de ativar as vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas e de alterar a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas nas linhagens de fibroblastos e queratinócitos. Contudo, nas células BALB/c 3T3 a via extrínseca está mais ativa que a

intrínseca o que foi comprovada pela ativação das caspases. A membrana mitocondrial não foi tão afetada uma vez que as concentrações de AIF e a relação de Bax/Bcl-2 não aumentaram com a exposição à radiação UVA. Nas células HaCaT a via intrínseca está mais ativa que a extrínseca e a permeabilidade da membrana mitocondrial foi aumentada uma vez que os níveis de AIF aumentaram, embora a relação Bax/Bcl-2 não tenha aumentado com a exposição da dose de radiação UVA aplicada.

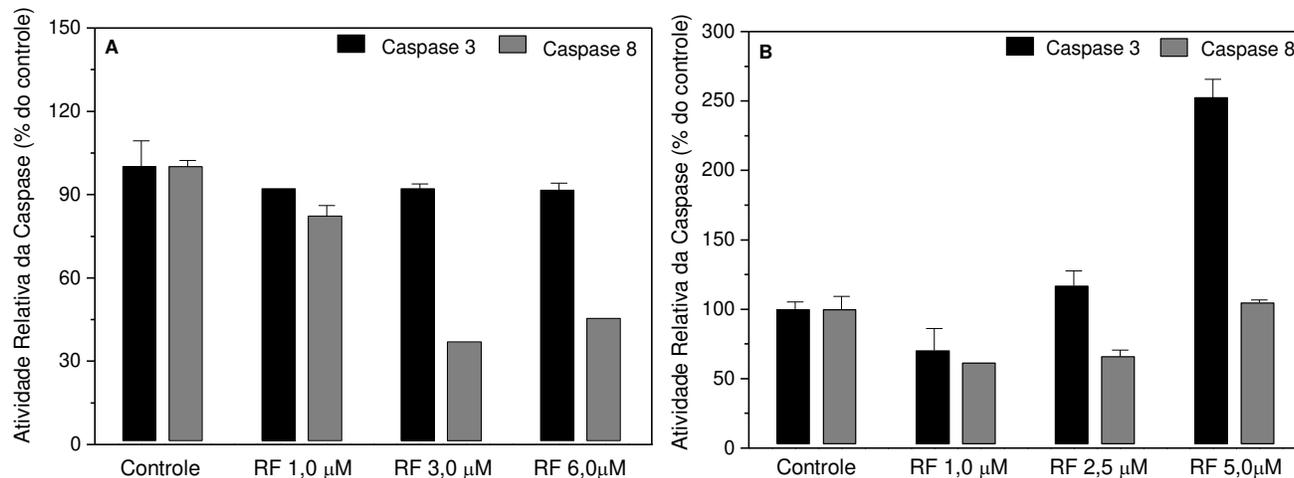
#### **4.5.1.2 Efeito da riboflavina sobre as células *versus* marcadores moleculares de apoptose.**

O tratamento das células com a RF e subsequente exposição à radiação UVA, levaram a resultados distintos nas linhagens, em relação às caspases, como mostra a Figura 14. Nessa comparação os valores foram calculados considerando como 100% a atividade nas células expostas à radiação UVA, porém não tratadas com RF, ou seja, observou-se apenas o efeito da RF irradiada.

As células BALB/c 3T3 (Figura 14A) apresentaram redução na atividade da caspase 8 na presença de RF, sendo que na concentração de IC<sub>50</sub> (6,0 µM) a atividade foi cerca de 50% menor que o controle. Assim, a RF pode estar reduzindo ativação da via apoptótica extrínseca, uma vez que esta caspase é iniciadora. Por outro lado, a atividade da caspase 3 permaneceu em níveis próximos aos das células controle que foram expostas à radiação. Esse comportamento indica que a caspase 3 está sendo ativada pela radiação, sendo pouco afetada pela RF durante a irradiação. Assim pode-se sugerir através destes dados que a ativação da caspase 3 esteja ocorrendo através da via intrínseca, uma vez que a caspase 8 apresentou baixa atividade nesta condição. Desta forma, como o nível de caspase 3 do

controle e da concentração de  $IC_{50}$  da RF não apresentou diferença, não é possível afirmar que a redução da viabilidade celular observada no  $IC_{50}$  seja induzida exclusiva e/ou predominantemente por apoptose.

Nas células HaCaT (Figura 14B), a RF na concentração de  $1,0 \mu\text{M}$  causou uma redução de aproximadamente 30 e 40% em relação ao controle, nas atividades relativas das caspases 3 e 8, respectivamente. Tal comportamento sugere um efeito protetor da RF nas células HaCaT, contra a radiação UVA. Na concentração de  $2,5 \mu\text{M}$  de RF, a caspase 8 apresentou redução de 35% na atividade, de forma análoga à redução observada na concentração de  $1,0 \mu\text{M}$  de RF (Figura 14B). Enquanto, a caspase 3 sofreu aumento em torno de 25% em relação ao controle. Esse efeito indica a ativação da via de morte por apoptose e ainda, sugere a predominância da via intrínseca. Na concentração de  $IC_{50}$  da RF ( $5,0 \mu\text{M}$ ), a atividade da caspase 8 se apresentou próxima ao controle, enquanto a atividade da caspase 3 sofreu aumento de 1,5 vezes em relação ao controle. Esse resultado indica a indução de morte por apoptose, tanto por via extrínseca quanto pela intrínseca.



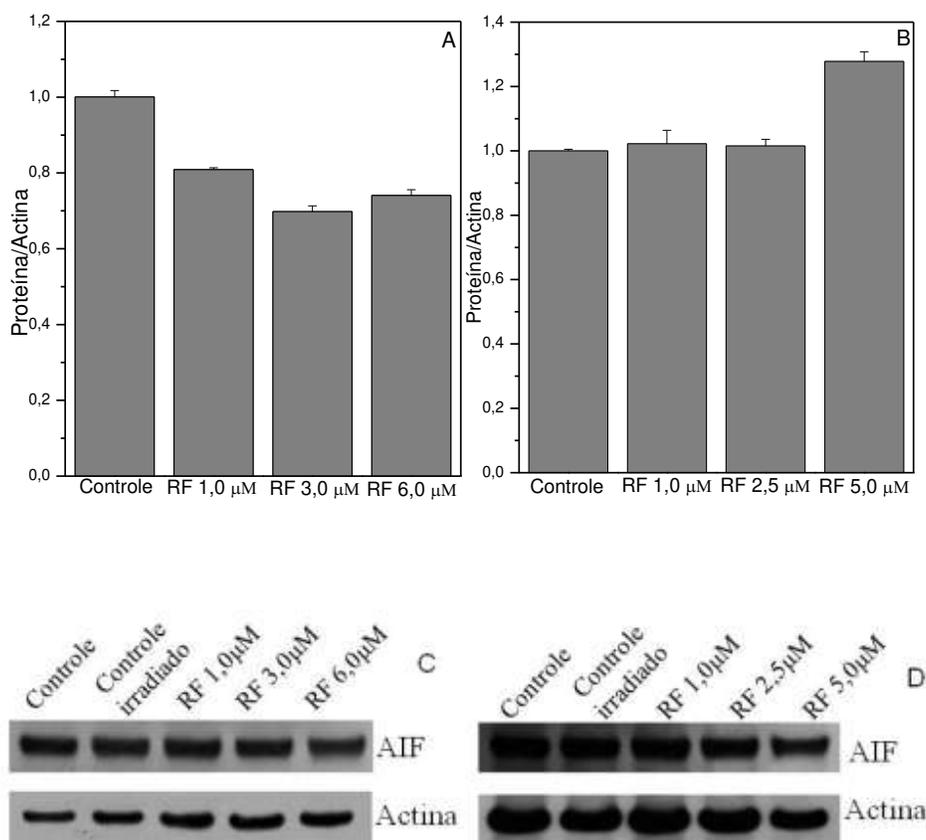
**Figura 14:** Efeito da RF nas atividades das caspases 3 e 8 das células expostas a radiação UVA: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram incubadas com RF em diferentes concentrações e irradiadas por 50 minutos (dose de  $5 \text{ J/cm}^2$ ). As células não tratadas com RF e expostas à radiação UVA foram consideradas 100%. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

Na literatura podem-se encontrar vários exemplos de agentes protetores contra o estresse oxidativo causado pela radiação. Pacheco-Palenchó e colaboradores (2008) observaram que em fibroblasto humanos, SKU-1064, o tratamento com extrato de Pomegranato reduz a níveis basais a atividade de caspase 3, que havia sido aumentada pela radiação UVB. El- Mahdy e colaboradores (2008) reportaram que nas células HaCaT após irradiação com UVB (dose  $30 \text{ mJ/cm}^2$ ), o tratamento das células com narigina, um flavonóide, provocou diminuição na atividade das caspases 3, 9 e 8, além da diminuição dos níveis dos substratos clivados por estas caspases. Svobodová e colaboradores (2007) mostraram que silibina, um composto extraído de *Silybum marianum*, diminui a atividade de caspase 3 nas células HaCaT após a irradiação UVA, na dose de  $20 \text{ J/cm}^2$ . Fischer e colaboradores (2008) demonstraram que o pré-tratamento de células HaCaT com melatonina leva à redução da ativação da caspase 3, ativadas por exposição ao UVB. Todos estes efeitos protetores que levam a redução da ativação de caspases foram atribuídos à

ação antioxidante dos compostos utilizados. De forma análoga, sabe-se que a RF pode tanto contribuir quanto inibir o estresse oxidativo através da sua dupla habilidade de produzir superóxido e, ao mesmo tempo, poder estar envolvida na redução de hidroperóxidos (Massey, 2000). Assim, a RF pode estar atuando como antioxidante nos fibroblastos auxiliando na redução da ativação da caspase 8 e não causando aumento da caspase 3. Nos queratinócitos a RF, em baixas concentrações, parece atuar sobre as duas caspases estudadas no sentido de evitar sua ativação pela radiação UVA. Outra hipótese seria que a RF possa simplesmente estar atuando como filtro de UVA, nas concentrações mais baixas, protegendo as células nessas condições. Porém, com aumento da concentração da RF ambas aumentam mostrando que este composto age induzindo a apoptose. Portanto, a RF parece proteger contra os efeitos da radiação UVA em termos de morte apoptótica somente em baixas concentrações.

O mesmo estudo foi feito com as proteínas AIF, Bax e Bcl-2 para evidenciar o efeito da RF irradiada, isto é, as células tratadas com a RF e expostas à radiação UVA. Nessa comparação, os valores foram calculados considerando como 100% a atividade nas células expostas à radiação UVA, porém não tratadas com RF.

Na Figura 15 pode-se observar a expressão da proteína AIF quando a RF é irradiada. Nas células BALB/c 3T3 (Figura 15A e 15C) verificou-se leve diminuição na expressão da proteína em todas as concentrações testadas, inclusive no IC<sub>50</sub>, mostrando que a morte apoptótica não é exclusivamente intrínseca. Nessa figura também é possível observar que a expressão de AIF praticamente não se altera nas diferentes concentrações de RF testadas. De forma análoga ao resultado das caspases, não se pode afirmar que na concentração de IC<sub>50</sub>, a redução da viabilidade celular observada seja exclusiva e/ou predominantemente devida a apoptose.

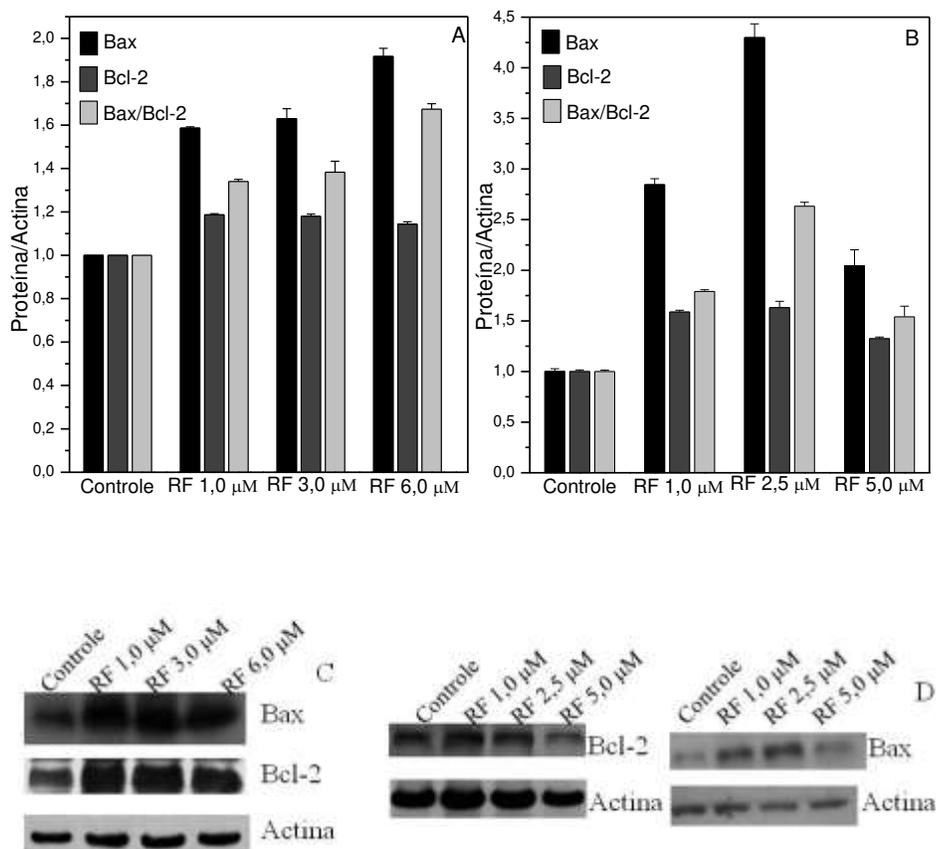


**Figura 15:** Análise densitométrica do efeito da RF na expressão da proteína AIF das células expostas à radiação UVA: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram incubadas com RF em diferentes concentrações e irradiadas por 50 minutos (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>). As células não tratadas com RF e expostas à radiação UVA foram consideradas controle. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75  $\mu$ g de proteína. Expressão de AIF detectada por immunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA na presença ou ausência de RF.

Na linhagem HaCaT (Figura 15B e 15D) observa-se o resultado oposto aos fibroblastos. Nas duas primeiras concentrações do composto (RF 1,0 e 2,5  $\mu$ M) a expressão do AIF não é significativamente diferente do controle, porém na concentração 5,0  $\mu$ M (IC<sub>50</sub>) houve aumento de 40% quando comparado com o controle irradiado. Este resultado somado à atividade das caspases 3 e 8 (Figura 14B) indica que a morte por apoptose, tanto pela via intrínseca como pela extrínseca, está ativa na concentração do IC<sub>50</sub>.

A partir destes resultados e os apresentados sobre as caspases é possível sugerir que a RF deve estar atuando na alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial de diferentes formas nas duas linhagens, uma vez que nos fibroblastos a via intrínseca não está tão ativa quanto nos queratinócitos. Contudo, o efeito da RF nas proteínas pró-apoptótica (Bax) e anti-apoptótica (Bcl-2) para as linhagens estudadas apresentou perfil semelhante (Figura 16). A expressão tanto da proteína Bax quanto da Bcl-2 e a relação entre elas apresentaram aumento em relação ao controle. Isso sugere que ocorra formação de poros na membrana da mitocôndria e conseqüentemente, ativação da morte apoptótica intrínseca, pois as proteínas estudadas estão correlacionadas com a saída do citocromo c da mitocôndria.

Nas células BALB/c 3T3 (Figura 16 A e 16C) verifica-se aumento da relação Bax/Bcl2 e da proteína Bax com aumento da concentração de RF. Porém, nas células HaCaT (Figura 16B e 16D) não se observou tal característica, uma vez que na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  houve uma redução de Bax e na relação Bax/Bcl-2 quando comparada com a concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  de RF. Os níveis de Bcl-2 aumentaram nas células HaCaT na presença da RF, porém, este aumento não foi afetado pela alteração da concentração de RF presente.



**Figura 16:** Análise densitométrica do efeito da RF na expressão das proteínas Bax e Bcl-2 das células expostas à radiação UVA: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram incubadas com RF em diferentes concentrações e irradiadas por 50 minutos (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>). As células não tratadas com RF e expostas à radiação UVA foram consideradas controle. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75  $\mu\text{g}$  de proteína. Expressão de Bax e Bcl-2 detectada por imunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA na ausência ou presença RF.

Os resultados encontrados demonstram que a presença da RF irradiada não altera a atividade da caspase 3, mesmo com redução da caspase 8, indicando a ativação de apoptose por via intrínseca, nas células BALB/c 3T3. Embora a expressão de AIF esteja reduzida, indicando manutenção da integridade da membrana, o aumento nos níveis de Bax indica indução de formação de poros na membrana mitocondrial. Assim, a apoptose nos fibroblastos pode estar ocorrendo via liberação do citocromo c (via intrínseca de indução de

apoptose) e não devido ao fator de indução de apoptose (AIF). Para essa linhagem celular a RF parece estar atuando como agente potencializador do estresse oxidativo causado pela irradiação com UVA.

Os resultados nas células HaCaT indicam que a RF irradiada atuou na membrana mitocondrial facilitando a possível formação de poros, visto que houve aumento da expressão de Bax. Esse atua na formação de poros na membrana mitocondrial para a saída do citocromo c, culminando na ativação da caspase 3. Além disso, ocorreu aumento da expressão de AIF, sendo que todos culminam na ativação de morte por apoptose ativada pela via intrínseca. Outro fator que auxilia na morte apoptótica é o aumento da atividade da caspase 8 com aumento da concentração de RF. Em baixas concentrações, a RF pode estar evitando a apoptose ativada pela via extrínseca, favorecendo as vias de sobrevivência. No entanto, com o aumento da concentração de RF a apoptose é a resposta celular predominante.

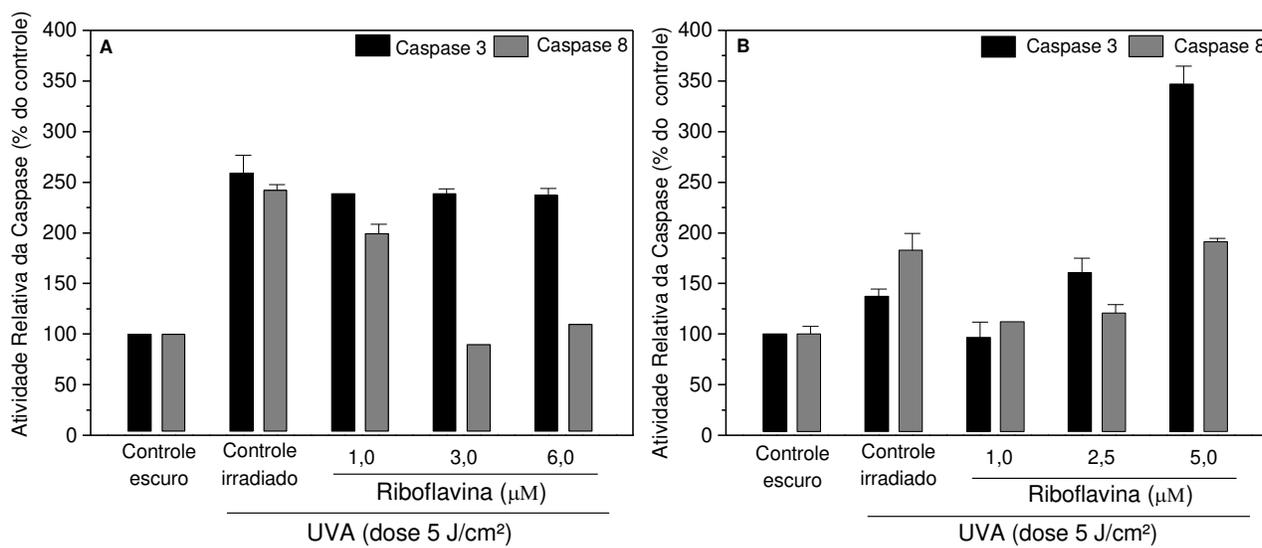
#### **4.5.1.3. Efeito da radiação e riboflavina sobre as células *versus* marcadores moleculares de apoptose**

Uma segunda comparação foi feita considerando como 100%, a atividade das caspases e expressão das proteínas em células que não foram expostas à RF e foram mantidas no escuro. Esta comparação permitiu a observação do efeito da radiação UVA somada ao efeito da RF irradiada.

A Figura 17A mostra que nas células BALB/c 3T3, a atividade da caspase 3 é semelhante à do controle irradiado, não alterando sua atividade, mesmo na presença de RF. Enquanto a atividade da caspase 8 é reduzida na presença da RF até níveis próximos ao controle no escuro. Na Figura 18A pode-se observar diminuição da expressão da proteína

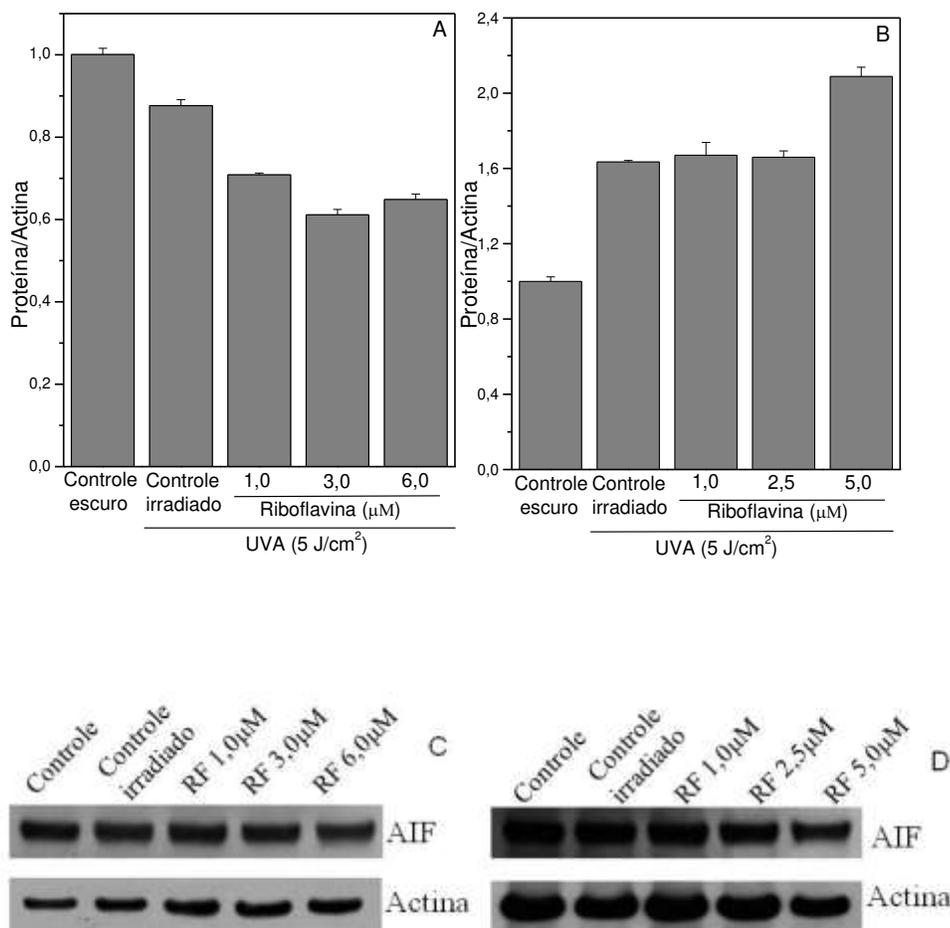
AIF na linhagem BALB/C 3T3, abaixo dos níveis do controle no escuro. O comportamento observado nessas figuras sugere que o aumento na atividade das caspases 3 e 8 e diminuição da expressão de AIF induzida pela radiação UVA, e na presença de RF na concentração de 1,0  $\mu\text{M}$ , pode levar à morte por apoptose tanto por via extrínseca como intrínseca. No controle irradiado e RF 1,0  $\mu\text{M}$  não foi observada redução significativa da viabilidade celular indicando talvez, que embora as vias de morte estejam ativas, as vias de sobrevivência devem prevalecer nesses casos. Ainda na Figura 17A pode-se sugerir que nas concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$  de RF a indução de apoptose ocorra via intrínseca, devido aos níveis de atividade da caspase 8 serem próximos ao controle no escuro e a atividade da caspase 3 não se alterar com relação ao controle irradiado. A Figura 18A mostra diminuição na expressão da proteína AIF em concentrações altas de RF, quando comparadas com o controle no escuro. Esse comportamento pode ser entendido como redução dos danos causados pela radiação UVA em termos de membrana mitocondrial, uma vez que aparentemente a RF irradiada não permite a saída de AIF da mitocôndria.

Nas células HaCaT (Figura 17B) pode-se sugerir efeito protetor da RF na concentração de 1,0  $\mu\text{M}$  RF frente à radiação UVA. A ativação da caspase 8 na concentração de  $\text{IC}_{50}$  (5,0  $\mu\text{M}$ ) pode ser devido à radiação, uma vez que o nível de ativação é semelhante ao do controle irradiado. Por fim, pode-se inferir que a ativação da caspase 3 pode estar ocorrendo por via intrínseca. Além desta evidência, pode-se observar na Figura 18B que a expressão de AIF está aumentada na concentração do  $\text{IC}_{50}$ , o que corrobora com hipótese da morte estar ocorrendo por apoptose com prevalência da via intrínseca.



**Figura 17:** Efeito da RF nas atividades das caspases 3 e 8 das células expostas a radiação UVA: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram tratadas durante 1 h com RF e irradiadas por 50 minutos (dose 5 J/cm<sup>2</sup>). As células não tratadas com RF e não expostas à radiação UVA foram consideradas 100%. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

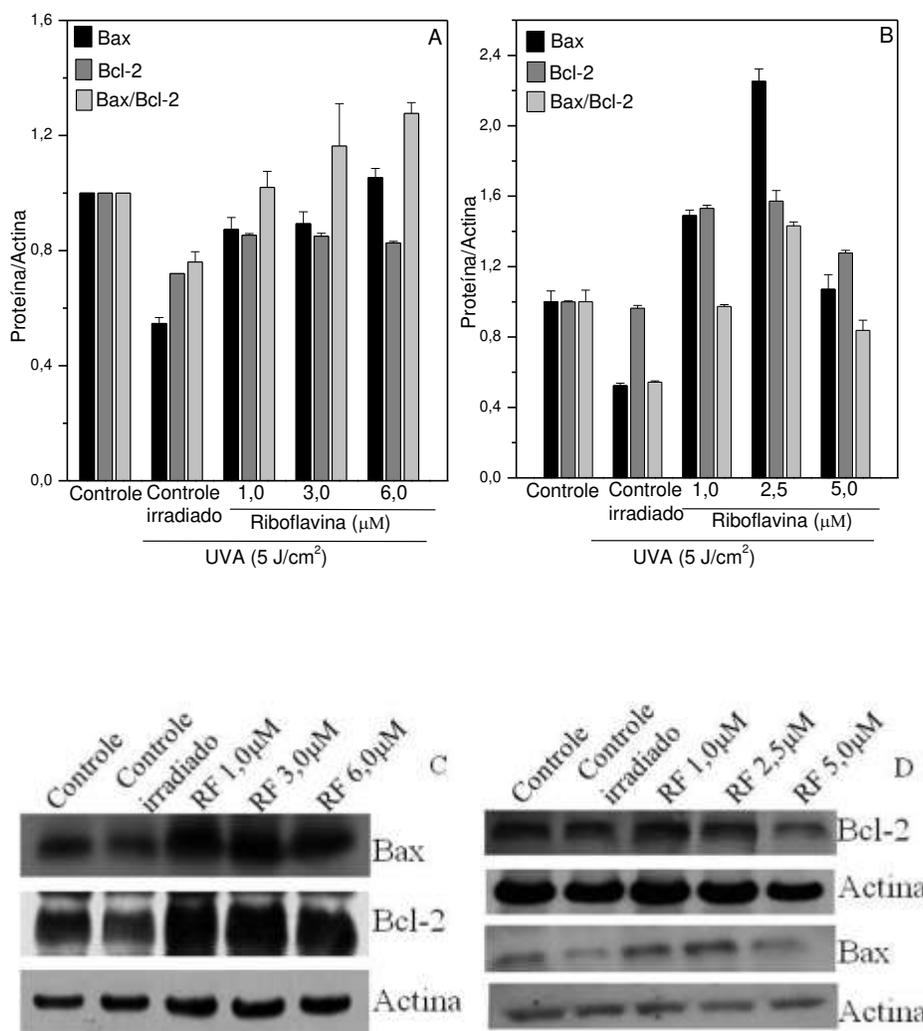
Pode-se observar também na Figura 18B, que a expressão de AIF na linhagem HaCaT não se altera quando comparado o controle irradiado com as tratadas com RF nas concentrações 1,0 e 2,5 μM. Isso sugere que o aumento observado deva ser decorrente apenas da irradiação e não da presença de RF em baixas concentrações. Comportamento semelhante foi observado por Svobodová e colaboradores (2008), os quais expuseram células HaCaT à radiação UVA e as trataram com o composto 2-3 deidrosibilina, um antioxidante extraído de *Silybum marianum*. Estes autores observaram redução na atividade da caspase 3 em baixas concentrações, até 25 μM/L, e a partir de 50 μM/L a atividade da caspase 3 retornou aos valores próximos do controle irradiado. Este comportamento foi atribuído à capacidade deste composto em baixa concentração de diminuir a produção de ROS quando as células são expostas a radiação UVA.



**Figura 18:** Análise densitométrica do efeito da RF na expressão da proteína AIF das células expostas a radiação UVA: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram incubadas com RF em diferentes concentrações e irradiadas por 50 minutos (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>). As células não tratadas com RF e não expostas à radiação UVA foram consideradas controle. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75 μg de proteína. Expressão de AIF detectada por immunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA na presença ou ausência RF ou mantidas no escuro sem RF.

A expressão das proteínas Bax e Bcl-2 apresentadas na Figura 19A, mostra diminuição nas células BALB/c 3T3 quando foram expostas à radiação e tratadas com RF. A exceção ocorreu na concentração do IC<sub>50</sub>, onde a proteína Bax apresentou valor próximo ao do controle no escuro. O oposto foi observado nas células HaCaT (Figura 19B), que

apresentaram aumento nestas proteínas quando comparadas com o controle no escuro, com exceção do Bax na concentração de 5,0 $\mu$ M de RF que não demonstrou alteração.



**Figura 19:** Análise densitométrica do efeito da RF na expressão das proteínas Bax e Bcl-2 das células expostas a radiação UVA: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram incubadas com RF em diferentes concentrações e irradiadas por 50 minutos (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>). As células não tratadas com RF e não expostas à radiação UVA foram consideradas controle. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75  $\mu$ g de proteína. Expressão de Bax e Bcl-2 detectada por imunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA na presença ou ausência RF ou mantidas no escuro sem RF.

Esse comportamento pode ser entendido como um efeito de proteção da RF frente à radiação UVA. El-Mahdy e colaboradores (2008) mostraram que o tratamento com o flavonóide narigina após a exposição das células HaCaT à radiação UVB (dose de 30 mJ/cm<sup>2</sup>), causa aumento na expressão de Bcl-2 enquanto a de Bax foi reduzida, retornando aos valores próximos do controle, mostrando que este flavonóide protege as células contra a radiação. Sugerimos assim, que a RF pode estar atuando também nesse sentido.

Contudo, quando é analisada a relação de Bax/Bcl-2 (Figura 19) a menor concentração testada não apresentou alteração quando comparada com as células no escuro, nas duas linhagens estudadas. Além disso, nas concentrações de IC<sub>50</sub> foram observadas situações opostas nas duas linhagens. A Figura 19A mostra que nas células BALB/c 3T3 houve aumento da relação Bax/Bcl-2, favorecendo a morte por apoptose induzida pela via intrínseca, devido à formação de poros pelo Bax e saída de citocromo c. Porém, nas células HaCaT (Figura 19B) esta relação diminuiu. Nessa situação, talvez a morte celular observada seja devido ao aumento de AIF.

Assim, é possível afirmar que a RF leva à diminuição da ativação da caspase 8 nos fibroblastos em níveis do controle no escuro, sendo que a atividade da caspase 3 se mantém semelhante ao controle irradiado. Além disto, o AIF diminuiu em presença da RF e a relação Bax/Bcl-2 só é significativamente maior que o controle na concentração de IC<sub>50</sub> (6,0 µM) de RF. Assim, a RF deve estar atuando impedindo a ativação da caspase 8 através da via extrínseca e mantendo a integridade da membrana mitocondrial impedindo que o AIF transloque da mitocôndria para o citoplasma.

Nos queratinócitos a associação RF e radiação demonstraram que RF na concentração 5,0 µM favorece a morte por apoptose. A RF na concentração de 1,0 µM,

pode estar revertendo o processo de apoptose causado pela radiação UVA numa tentativa de evitar/prevenir a morte por apoptose.

#### **4.5.2. Irradiação com luz UVA em células *versus* marcadores moleculares de inflamação**

Sabe-se que a irradiação com luz UV aumenta a produção de citocinas inflamatórias. Nesse contexto, o NFκB apresenta um papel central na transdução de sinal que culmina na resposta inflamatória.

Nas vias clássicas associadas às citocinas pró-inflamatórias (TNFα, IL1β) o complexo IKK é ativado. Neste complexo estão presentes as quinases IKKα e IKKβ associadas ao modulador essencial da proteína “*scaffold*” NFκB (denominada NEMO), também chamada de IKKγ (Habraken e Piette, 2006; Yamaoka *et al.*, 1998). O dímero clássico NFκB formado pelas subunidades p50 e p65, é mantido no citoplasma pela associação com a proteína inibitória IκBα (Sée, 2004). O NFκB pode ser ativado por muitos estímulos, incluindo luz UV (UVC). A irradiação leva à fosforilação de IκB nos resíduos N terminal de Ser-32 e Ser-38, tornando-o alvo de ubiquitinação e posterior degradação pelo proteassoma. O NFκB livre transloca-se para o núcleo e atua como fator de transcrição de genes específicos. Portanto, a expressão de p-IKKα/β é uma medida indireta da translocação do NFκB para o núcleo. Essa espécie é responsável pela marcação do IκBα que será ubiquitinado e liberará o NFκB, para se translocar para o núcleo. Assim, neste trabalho foi selecionada a expressão do NFκB e p-IKKα/β como marcadores, para a avaliação do efeito da radiação UVA e da RF na inflamação.

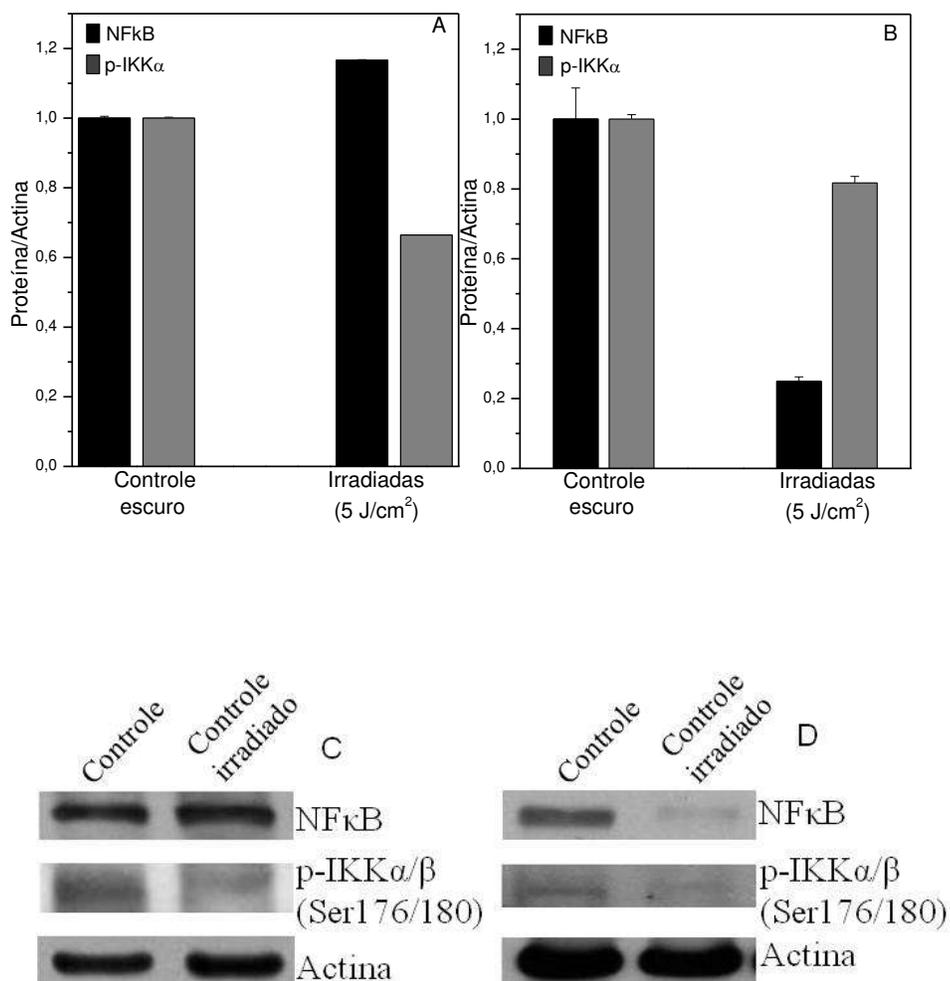
#### **4.5.2.1. Efeito da radiação UVA em células *versus* marcadores moleculares de inflamação**

O estudo do efeito da dose de 5 J/cm<sup>2</sup> de radiação UVA nas células de fibroblastos (BALB/c 3T3) e queratinócitos (HaCaT), foi realizado comparando as células expostas à radiação com as células mantidas no escuro. Os níveis de proteínas envolvidas na ativação do NFκB foram analisados por Western blotting.

A Figura 20 mostra a expressão das proteínas NFκB e p-IKKα/β quando as células foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) por 50 min. Nas células BALB/c 3T3 (Figura 20A e 20C) pode-se observar leve aumento na expressão do NFκB de aproximadamente 20%, enquanto a p-IKKα/β mostrou-se reduzida em aproximadamente 30%, quando expostas à radiação. Neste sentido, Bender e colaboradores (1998) demonstraram que em células de fibroblasto humano, a irradiação com luz UVC seguida de recuperação por 24 h, leva à ativação de NFκB, sendo observada a maior expressão na dose de 30 J/m<sup>2</sup>. Contudo, estes autores observaram que o p-IKKα/β, uma quinase pró-inflamatória ativada por MAPKs, se apresentava diminuída na mesma situação. Assim, tais pesquisadores sugeriram que a dose aplicada não era suficiente para levar à fosforilação de IκBα concluindo, neste caso, que o nível de NFκB ativo por esta via não deveria ser alto. De forma similar ao estudo desses pesquisadores, podemos concluir que para as células BALB/c 3T3 o nível de NFκB ativo deve ser baixo, uma vez que foi observado aumento de 75% na relação NFκB/p-IKKα/β, ou seja, a expressão de p-IKKα/β se mostrou baixa e, portanto, não deve haver altas concentrações de NFκB ativo. Isto leva a crer que o NFκB não se transloca para o núcleo, uma vez que este deve ainda estar ligado ao IκB. Assim,

provavelmente para os fibroblastos, a dose aplicada não induz inflamação de forma significativa.

Nas células HaCaT (Figura 20B e 20D) a irradiação levou à redução de 80 e 15% na expressão de NFκB e p-IKKα/β, respectivamente. A redução de NFκB deveria estar relacionada a um aumento de p-IKKα/β, o que estaria indicando a translocação do NFκB ao núcleo. Esta constatação foi o oposto do esperado, tendo em vista que a literatura em geral mostra um aumento nos marcadores de inflamação quando ocorre a exposição à radiação UV. Contudo, Adachi e colaboradores (2003) demonstraram que as radiações UVB e UVC podem ativar a via da JNK envolvida na ativação de NFκB, em queratinócitos de pele humana. No entanto, os níveis de NFκB ativo só se alteraram com as radiações UVB e UVC, não sendo observada tal alteração mesmo com doses altas de radiação UVA. Isso mostra que talvez a resposta do NFκB à radiação dependa de características inerentes das linhagens celulares.



**Figura 20:** Efeito da radiação UVA na atividade relativa das proteínas NFκB e p-IKKα/β: Células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou mantidas no escuro por 50 minutos (controle). Os valores foram expressos da análise densitométrica em relação ao ensaio controle, onde as células foram mantidas no escuro. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75 μg de proteína. Expressão de NFκB e p-IKKα/β detectada por immunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA ou mantidas no escuro.

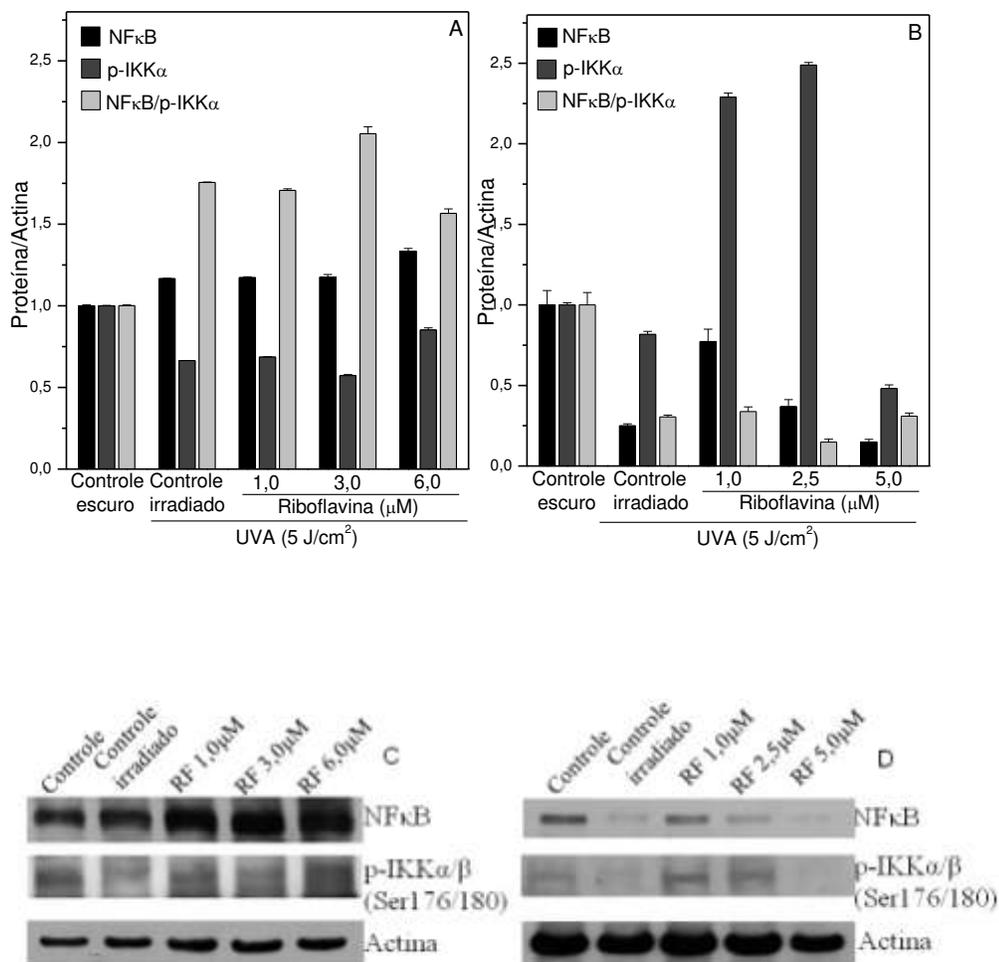
#### **4.5.2.2. Efeito da radiação e riboflavina sobre as células *versus* marcadores moleculares de inflamação.**

Para o estudo do efeito da RF em combinação com a radiação utilizou-se como controle as células que não foram expostas nem a radiação e nem a RF.

Na Figura 21 é avaliada a expressão das proteínas sobre a ação somada da radiação UVA com a RF nos fibroblastos. Nas células BALB/c 3T3 (Figura 21A e 21C) nota-se que tanto o aumento da expressão de NFκB como a redução de p-IKKα/β ocorrido no controle irradiado é semelhante ao apresentado nas concentrações de 1,0 e 3,0 μM de RF. Sugerindo que esse comportamento não é dependente da dose. Portanto nos fibroblastos a ativação do NFκB não depende da concentração de RF e nem da via que o p-IKKα/β leva a ubiquinação do p-IκBα. A relação NFκB/p-IKKα/β aumentou com a irradiação e em concentrações baixas de RF. Somente na concentração de RF de 6,0 μM a relação NFκB/p-IKKα/β mostrou-se reduzida, sendo que nesse caso, o NFκB deve estar sendo translocado para o núcleo. Assim, pode-se concluir que a RF não exerce efeito significativo no processo inflamatório induzido pela radiação UVA, nas células BALB/c 3T3.

Na Figura 21B nota-se que nas células HaCaT a expressão de NFκB está 75% menor com a exposição à radiação UVA. Esse comportamento indica que para essa linhagem celular a radiação talvez não esteja induzindo o processo inflamatório. Ainda, tal expressão se mostra aumentada quando as células são tratadas com a RF na concentração de 1,0 μM. Com o aumento da concentração da RF a concentração de NFκB diminuiu proporcionalmente. Por outro lado, observa-se que na presença de 1,0 e 2,5 μM de RF ocorre aumento de mais de duas vezes na concentração de p-IKKα/β. Isto indica que a p-IKKα/β deve estar fosforilando o IκBα e assim, o NFκB deve estar sendo ativado no

citoplasma para translocar-se para o núcleo. Tal translocamento concorda com redução de NF $\kappa$ B observada nesses dois casos. Portanto, nas células HaCaT pode-se sugerir que a RF está causando aumento no processo inflamatório, provavelmente pela geração de ROS, exceto para a concentração 5,0  $\mu$ M RF.



**Figura 21:** Análise densitométrica do efeito da RF na expressão das proteínas NF $\kappa$ B e p-IKK $\alpha/\beta$  das células expostas à radiação UVA: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram incubadas com RF em diferentes concentrações e irradiadas por 50 minutos (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>). As células não tratadas com RF e não expostas à radiação UVA foram consideradas controle. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75  $\mu$ g de proteína. Expressão de NF $\kappa$ B e p-IKK $\alpha/\beta$  detectada por imunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA na presença ou ausência RF ou mantidas no escuro sem RF.

### **4.5.3. Irradiação com luz UVA em células *versus* marcadores moleculares de senescência**

Uma das manifestações de senescência é o acúmulo de danos celular e tecidual. Estes danos são iniciados por estímulos endógenos e exógenos, sendo o estresse celular um exemplo de indução prematura da senescência celular. Condições de estresse *in vitro* podem ser geradas pela exposição ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Chen e Ames, 1994; Fripiat *et al.*, 2001), radiação UV (Rodemann *et al.*, 1989) e quando as células estão numa mesma passagem por um longo período em cultura (Thomas *et al.*, 1997). Nesta etapa do trabalho foram avaliadas as expressões da caveolina, p-21, o status de fosforilação da caveolina e atividade das MMP-2 e MMP-9 como marcadores moleculares de senescência.

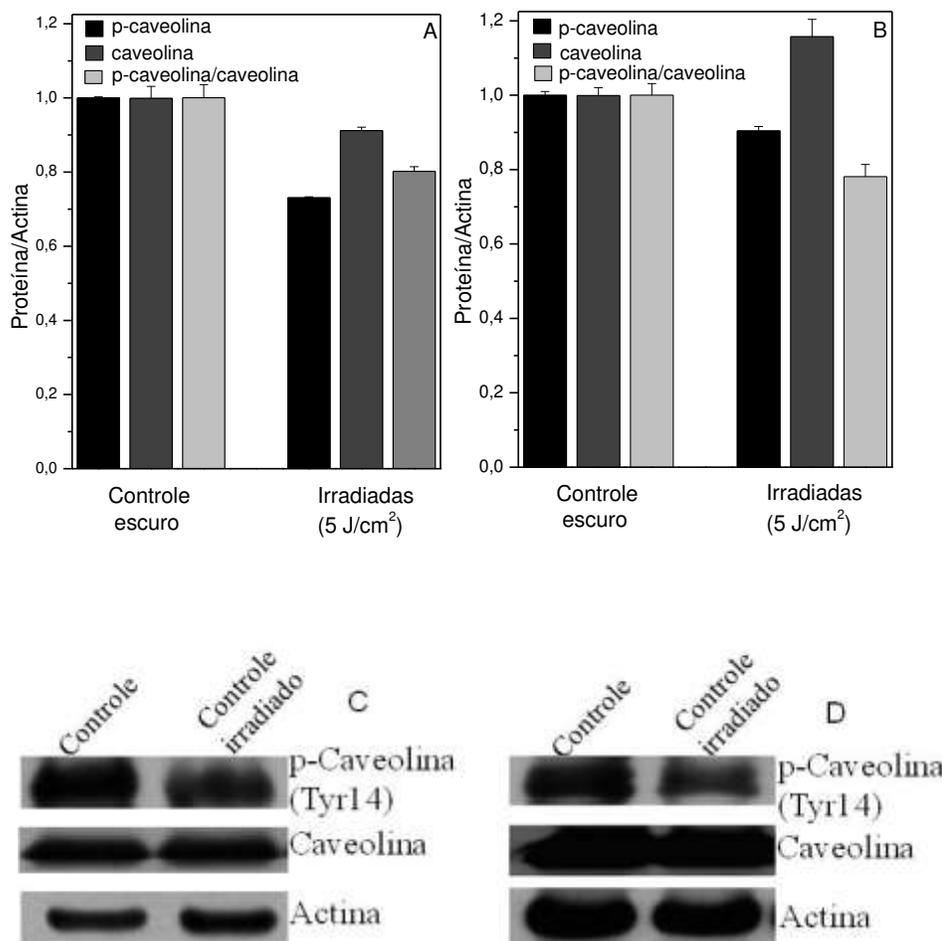
#### **4.5.3.1. Efeito da radiação em células *versus* marcadores moleculares de senescência**

A Figura 22 mostra a expressão das proteínas caveolina e p-caveolina (fosforilada no resíduo Tyr 14) nas linhagens celulares BALB/c 3T3 (Figura 22A e 22C) e HaCaT (Figura 22B e 22D) frente à radiação UVA.

Nota-se que nas células BALB/c 3T3 tanto a caveolina total quanto a p-caveolina (Tyr14) estão expressas em menor concentração quando comparados ao controle não irradiado e com o irradiado. Nas células HaCaT irradiadas ocorreu aumento na expressão da caveolina total, porém redução na p-caveolina (Tyr 14) quando comparados o controle não irradiado com o irradiado.

Nas Figuras 22A e 22B é possível verificar que a razão p-caveolina (Tyr 14): caveolina total nas células irradiadas se encontra em níveis menores que as células mantidas no escuro. Isto indica que a atividade da caveolina é reduzida quando as células são expostas à radiação UVA. Embora fosse esperado aumento na expressão/ atividade da

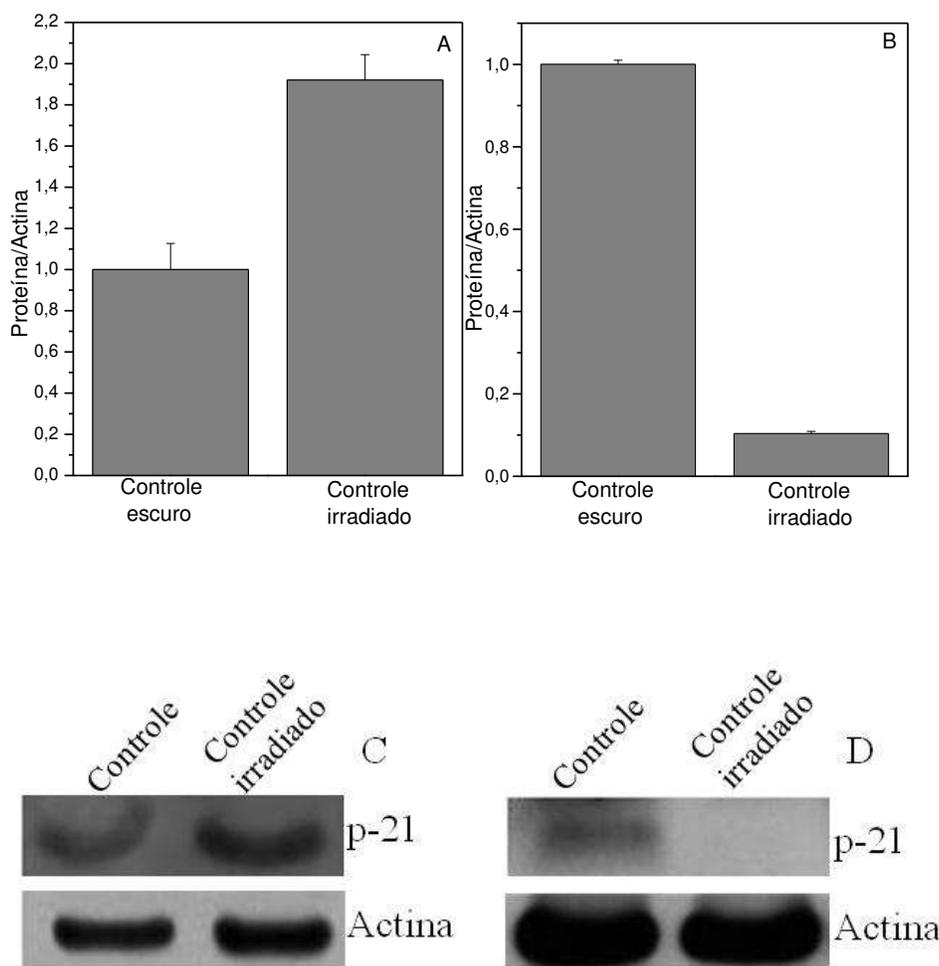
caveolina sob radiação UVA, uma vez que é sabido que tal exposição induz à senescência celular, não foi possível essa constatação em nosso modelo. Talvez esse fato seja devido ao tempo de recuperação que dura aproximadamente um ciclo celular, o que levaria a redução da expressão dessa proteína. Dados de nosso grupo utilizando o modelo de indução de estresse por peróxido de hidrogênio em células HaCaT, sem tempo de recuperação mostraram que a expressão de p-caveolina é aumentada nesta condição. No entanto, esse efeito necessita ser melhor elucidado.



**Figura 22:** Efeito da radiação UVA na atividade relativa das proteínas p-caveolina e caveolina: Células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou mantidas no escuro por 50 minutos (controle). Os valores foram expressos da análise densitométrica em relação ao ensaio controle, onde as células foram mantidas no escuro. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75 µg de proteína. Expressão de caveolina e p-caveolina detectada por immunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA ou mantidas no escuro.

Outro marcador de senescência avaliado nesse trabalho foi a proteína p21, que é uma importante proteína regulatória do ciclo celular. A p21 é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKI), que se liga a complexos “ciclina-CDK” causando a parada do ciclo celular na fase G1/S (Mattock *et al.*, 2001).

Nas Figuras 23A e 23C pode-se verificar que o nível de p21 nos fibroblastos praticamente dobrou quando comparadas às células mantidas no escuro com as expostas à radiação UVA. Iovine e colaboradores (2008) demonstraram em células de fibroblasto humano, IMR-90, que os níveis de p21 aumentaram em doses de 5 e 10 J/cm<sup>2</sup>. Porém, esses pesquisadores observaram que o parâmetro de senescência, SA  $\beta$ -gal (atividade da  $\beta$ -galactosidase associada à senescência), não apresentou aumento nesses níveis de radiação UVA. Ainda, Chen e colaboradores (2000) observaram que em células de fibroblasto de pele humana (IMR-90) tratadas com 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2 h e com tempo de recuperação de 20 h, apresentaram aumento dramático de p21. Além disto, os mesmos autores mostraram que nessas mesmas condições, características morfológicas de células em senescência surgiram apenas após uma semana. Assim, mesmo que tenhamos observado o aumento de p21, com o tempo de recuperação de 22 h talvez não seja possível observar o parâmetro de senescência aumentado. Esses estudos concordam com nossos resultados, onde observamos o aumento de p21 porém, o parâmetro de senescência utilizado p-caveolina/caveolina mostrou-se reduzido. Assim, podemos concluir que para o nosso modelo de células BALB/c 3T3, a radiação UVA ativa a cascata de sinalização para a parada do ciclo celular, mas não induz senescência.



**Figura 23:** Efeito da radiação UVA na atividade relativa da proteína p-21: Células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou mantidas no escuro por 50 minutos (controle). Os valores foram expressos da análise densitométrica em relação ao ensaio controle, onde as células foram mantidas no escuro. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,001) e para todas as amostras foram aplicados 75 µg de proteína. Expressão de p-21 detectada por imunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA ou mantidas no escuro.

Por outro lado, nos queratinócitos (Figura 23B e 23D), o nível de p21 diminuiu significativamente, quando comparadas às células expostas à UVA com as células mantidas no escuro. Talvez esse fato seja devido ao tempo de recuperação, que dura

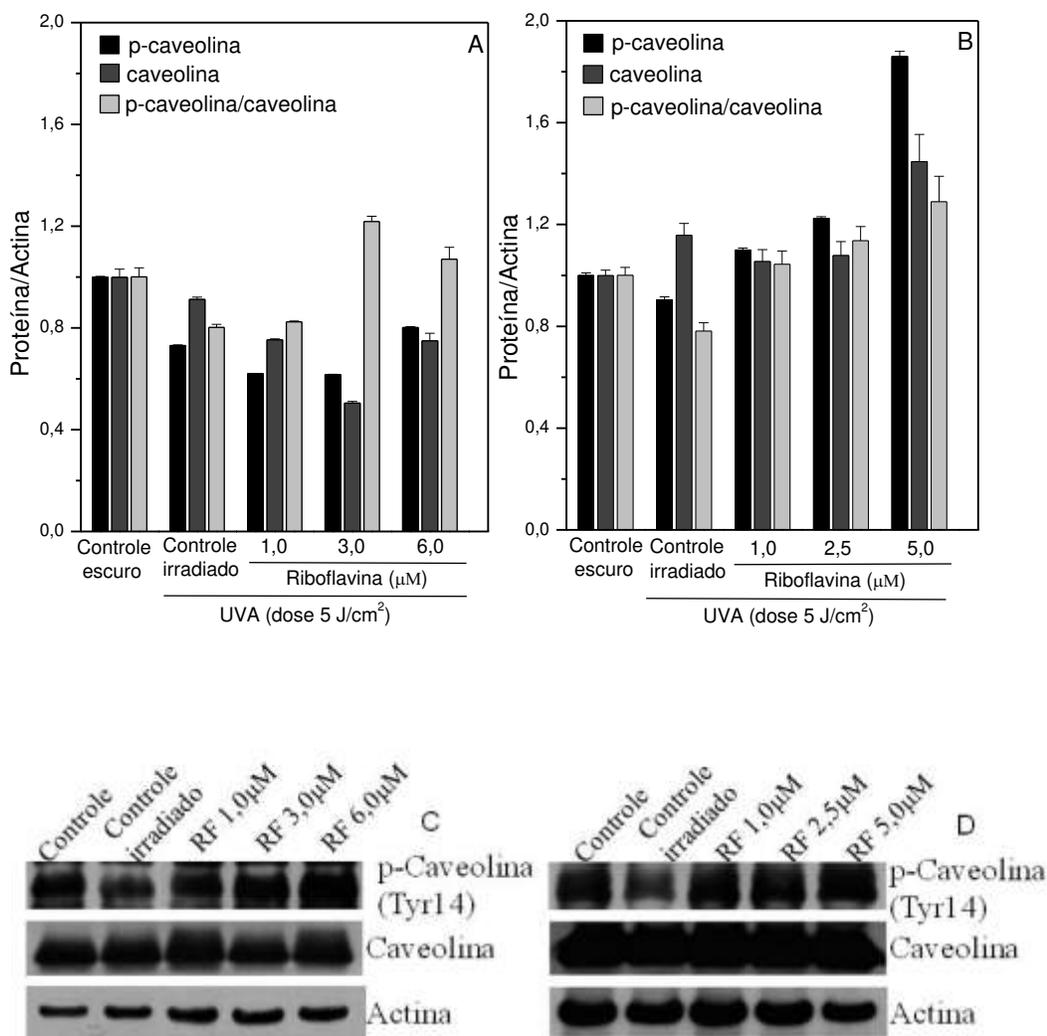
aproximadamente um ciclo celular, pois segundo alguns pesquisadores, p21 é degradada após a irradiação com luz UV (Soria *et al.*, 2008).

Lee e colaboradores (2006) demonstraram que em células epiteliais da retina, RPE, o aumento do tempo de recuperação após irradiação como UV, o p21 é reduzido drasticamente nesta linhagem. Ainda, Lewis e colaboradores (2008) constataram que em cultura primária de queratinócitos humanos, sem o receptor de insulina do tipo fator de crescimento 1 (IGF-1R), a expressão de p21 decresce com aumento do tempo de recuperação, quando utilizada uma dose de 400 J/m<sup>2</sup> de radiação UVB. Outro dado obtido pelo nosso grupo, mostrou que em modelo de estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio, utilizando células HaCaT, sem o tempo de recuperação, os níveis de p21 se mostraram aumentados. Assim, podemos concluir que a redução de p21 após a irradiação pode ser devida à sua degradação nesta linhagem celular.

#### **4.5.3.2. Efeito da riboflavina e radiação UVA sobre as células *versus* marcadores moleculares de senescência**

As Figuras 24A e 24C mostram uma comparação da ação da RF sob radiação UVA nas células BALB/c 3T3. Na concentração de 1,0 µM observa-se que os níveis de caveolina e p-caveolina diminuem tanto em relação ao controle irradiado como ao controle no escuro, sugerindo uma ação protetora nessa concentração. Volonte e colaboradores (2002) demonstraram que 300 µM de quercetina ou de vitamina E (ambos com propriedades antioxidantes), previnem, com sucesso, a indução de estresse oxidativo. Esses pesquisadores utilizaram células NIH3T3 e induziram o estresse através de incubação com 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por 2 h. Eles detectaram senescência prematura nas células, sendo que a expressão de caveolina só foi observada a partir do terceiro dia de recuperação.

Nota-se ainda, nas Figuras 24A e 24C que ocorreu aumento no nível da razão p-caveolina:caveolina, em concentrações mais altas de RF, superando os níveis do controle no escuro. O aumento na atividade da caveolina sugere que a partir da concentração de 3,0  $\mu\text{M}$ , a RF pode estar auxiliando no processo de senescência prematura nos fibroblastos.

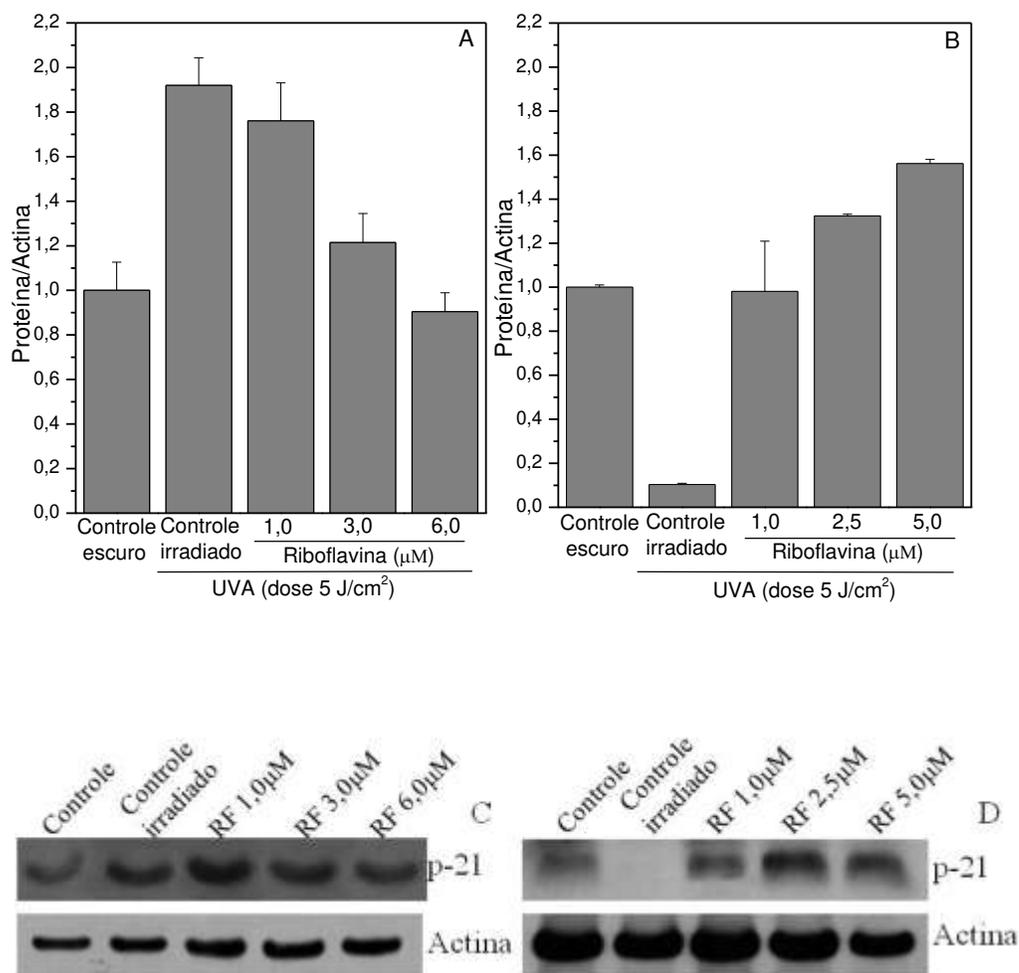


**Figura 24:** Efeito da RF na expressão das proteínas caveolina e p-caveolina das células expostas à radiação UVA: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram incubadas com RF em diferentes concentrações e irradiadas por 50 minutos (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>). As células não tratadas com RF e expostas à radiação UVA foram consideradas controle. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75  $\mu\text{g}$  de proteína. Expressão de p-caveolina e caveolina detectada por imunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA na ausência ou presença RF.

Nas células HaCaT (Figura 24B e 24D) os níveis de caveolina permaneceram constantes nas concentrações mais baixas, aumentando somente na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de RF ( $\text{IC}_{50}$ ). Os níveis de p-caveolina e da razão p-caveolina/caveolina estão aumentados em todas as amostras que foram tratadas com RF quando comparadas ao controle irradiado. Ainda, na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ , o nível de p-caveolina/caveolina se mostrou significativamente maior do que o controle no escuro. Isto indica que a RF irradiada com UVA nas células HaCaT induz senescência nessas células mesmo em concentração mais baixa.

As Figuras 25A e 25C mostram que nas células BALB/c 3T3, os níveis de p21 diminuem com aumento da concentração de RF, retornando a valores próximos ao do controle no escuro na maior concentração de RF (6,0  $\mu\text{M}$ ). Volonte e colaboradores (2002) demonstraram em células de fibroblastos de embrião de rato, que uma alta expressão de caveolina leva à parada do ciclo celular na fase  $G_0/G_1$ . Tal processo ocorre através da ativação da via p53/p21, indicando a importância da caveolina na parada do crescimento celular. Portanto, uma vez que, tanto os níveis de caveolina (Figura 24A) como os de p21 (Figura 25A) se encontram abaixo do controle, para a concentração de RF de 1,0  $\mu\text{M}$ , pode-se sugerir que a RF neste caso pode estar protegendo os fibroblastos da senescência prematura.

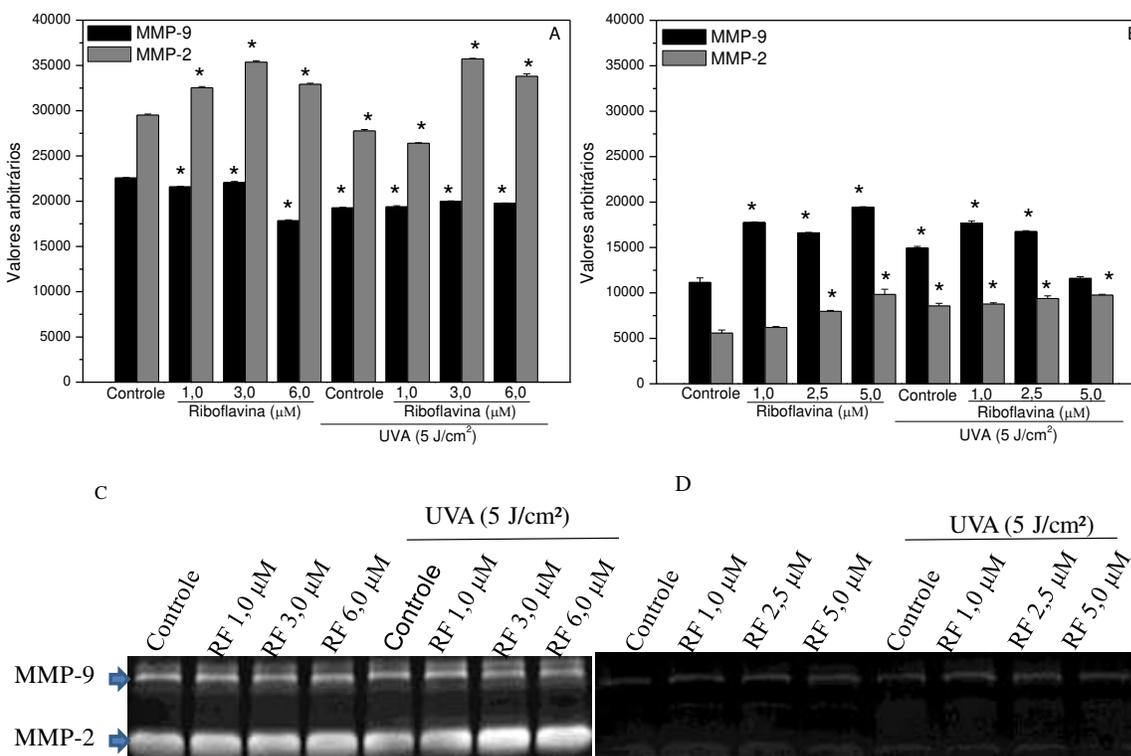
Nas células HaCaT ocorre o oposto dos fibroblastos, como mostrado nas Figuras 25B e 25D. A irradiação com UVA leva à redução de p21 e a exposição à RF causa aumento de p21 dependente da dose. Esta informação indica que para os queratinócitos a presença da RF em doses subcitotóxica, quando os mesmos são irradiados, leva à senescência prematura.



**Figura 25:** Análise densitométrica do efeito da RF na expressão da proteína p-21 das células expostas à radiação UVA: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram incubadas com RF em diferentes concentrações e irradiadas por 50 minutos (dose de 5 J/cm<sup>2</sup>). As células não tratadas com RF e expostas à radiação UVA foram consideradas controle. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\* P < 0,05) e para todas as amostras foram aplicados 75 μg de proteína. Expressão de p-21 detectada por imunoblotting dos extratos obtidos das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT expostas à radiação UVA na ausência ou presença RF.

Para finalizar o estudo da senescência, as MMP foram estudadas. As MMPs fazem parte de uma família de endopeptidases dependentes de zinco e são capazes de degradar componentes da matriz extracelular como colágeno, gelatina e fibronectina, levando ao envelhecimento da pele.

A MMP-2 de massa molar próxima a 72 kDa e a MMP-9 a 92 kDa foram analisadas através de zimografia. Na Figura 26 foi feita comparação entre as células que foram expostas a RF e mantidas no escuro com células expostas a RF e irradiadas com luz UVA. De forma geral, é possível observar que nos fibroblastos (Figura 26C) a atividade da MMP-2 é maior que da MMP-9, enquanto nos queratinócitos (Figura 26D) nota-se o oposto. Este comportamento indica que existe uma diferença inerente entre as linhagens, independente do tratamento a que foram submetidas. A dose de radiação UVA aplicada nas células BALB/c 3T3 causou leve aumento de MMP-2 e pequena redução de MMP-9. No caso das HaCaT observa-se leve aumento nas duas MMPs, como esperado. Rittie e Fisher (2002) observaram em pele humana *in vivo*, que a radiação UV induz a expressão de MMP-1, MMP-3 e MMP-9. Steinbrenner e colaboradores (2003) mostraram, através de Western blotting e zimografia, que em queratinócitos humanos, NHEK, a atividade de MMP-2 e MMP-9, após 24 h de recuperação, são dependentes da dose de radiação UVA, sendo que o aumento da atividade das MMPs é inversamente proporcional ao aumento da dose de irradiação UVA. Os mesmos autores estudaram o efeito da radiação UVA em queratinócitos HaCaT, utilizando zimografia, e observaram atividade da MMP-2 porém, a atividade não é afetada com aumento da dose de radiação UVA aplicada. Xiao-Young e Zhi-Gang (2006) demonstraram que a radiação UVB, nas células HaCaT, aumentou a expressão de MMP-1. Ainda, estes pesquisadores detectaram que paralelamente ao aumento da MMP-1 ocorre aumento da MMP-9, uma vez que esta degrada fragmentos de colágenos gerados pelas colagenase (MMP-1), caracterizando uma relação direta entre as MMPs



**Figura 26:** Efeito da RF nas metaloproteínas 2 e 9 das células expostas a radiação UVA ou mantidas no escuro: As linhagens (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram incubadas com RF em diferentes concentrações por 1 h e irradiadas (dose de  $5 \text{ J/cm}^2$ ) ou mantidas no escuro por 50 minutos. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento (\*  $P < 0,05$ ). A imagem obtida dos géis demonstrando a expressão das MMP-2 e MMP-9 detectada pelo meio completo das células (C) BALB/c 3T3 e (D) HaCaT após 22 h de recuperação.

Nas células BALB/c 3T3 (Figuras 26A e 26C), a radiação UVA não apresentou atividade aumentada da MMP-2 quando comparada com o controle. Isto vem de encontro com o resultado observado por Oh e colaboradores (2004), onde a atividade da MMP-2 mostrou-se aumentada apenas em doses acima de  $10 \text{ J/cm}^2$  de radiação UVA, em fibroblastos humanos. Assim, podemos concluir que, nas células BALB/c 3T3 a dose de radiação UVA utilizada não induz o aumento na atividade das MMPs, enquanto nas células HaCaT, foi observado tal aumento.

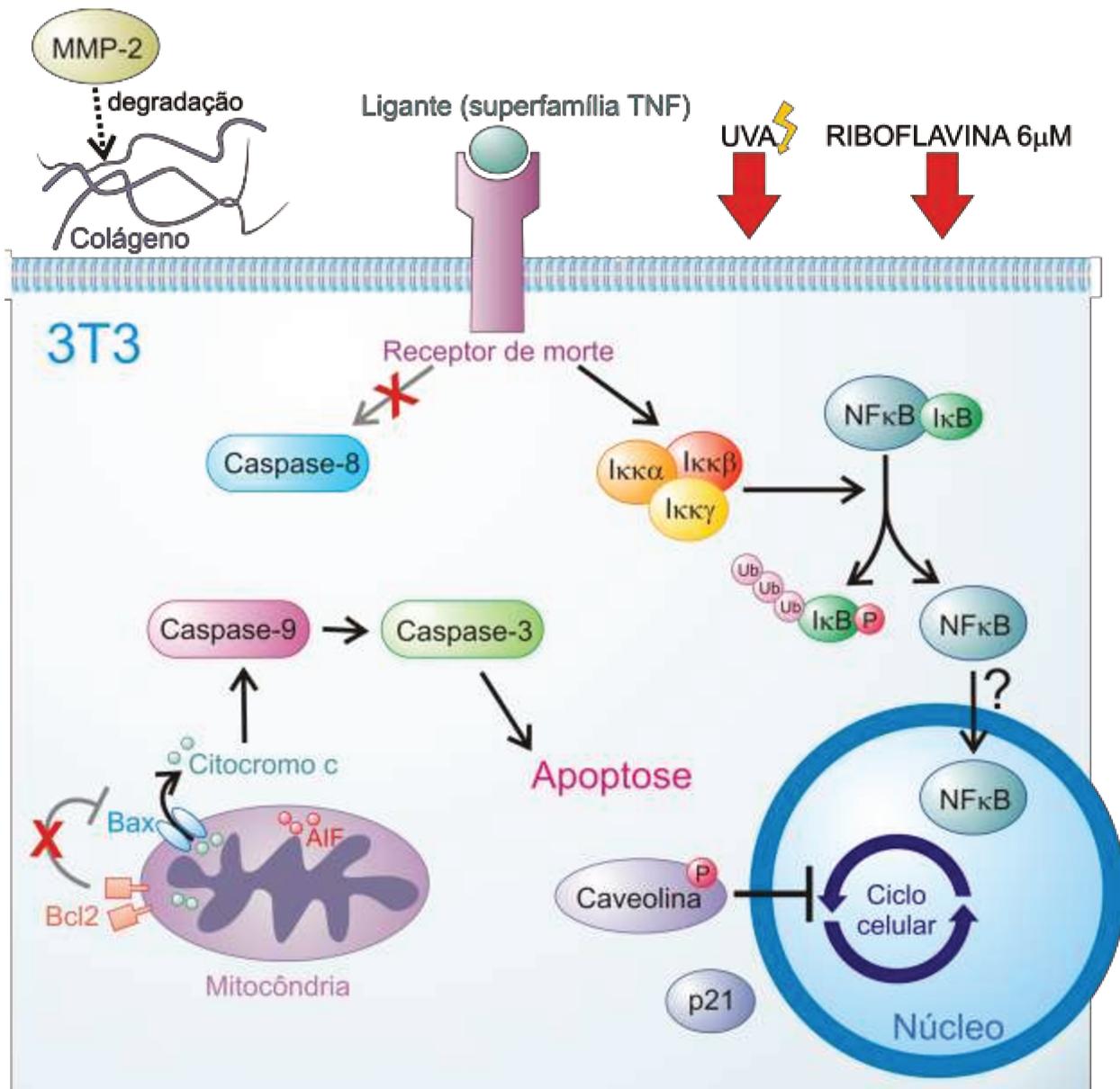
A riboflavina não causou efeito significativo na atividade de MMP-2 nas células de queratinócitos e MMP-9 nas células de fibroblastos quando comparadas com o controle irradiado. Tal constatação significa que a atividade das MMPs apresentadas se deve somente ao efeito da radiação e não da RF. Por outro lado, a MMP-9 na HaCaT e MMP-2 na BALB/c 3T3 apresentaram aumento com a exposição das células à RF, com exceção da concentração do IC<sub>50</sub> nos queratinócitos.

Ao comparar a ação da RF somada à radiação em relação às células mantidas no escuro, pode-se notar que nas células BALB/c 3T3, a atividade das MMP-9 foi reduzida sugerindo novamente, ação protetora em baixa concentração de RF. Hantke e colaboradores (2002) demonstraram que a vitamina E promove diminuição da atividade de MMPs, após a exposição à radiação UVA em células de fibroblastos originadas de pele humanas (HDF). Os mesmos autores demonstraram uma redução da MMP-1 e MMP-2 quando as HDF foram expostas à radiação UVA e vitamina C. Pacheco-Palencia e colaboradores (2008) relataram que em fibroblastos de pele humana, SKU-1064 exposto à radiação UVB com dose de 60 mJ por 1 min, e posteriormente tratadas com extrato de Pomegranata (*Punica granatum L.*) levou a diminuição na expressão de MMPs, MMP-1 e MMP-13, sendo essa resposta dependente de dose. Assim, quanto maior a concentração do extrato, menor a expressão destas MMPs apresentando comportamento protetor contra a senescência. Assim, estes resultados unidos ao resultado do efeito de redução da atividade da caveolina, nas concentrações mais baixas de RF, sugerem efeito antioxidante da RF nessas condições.

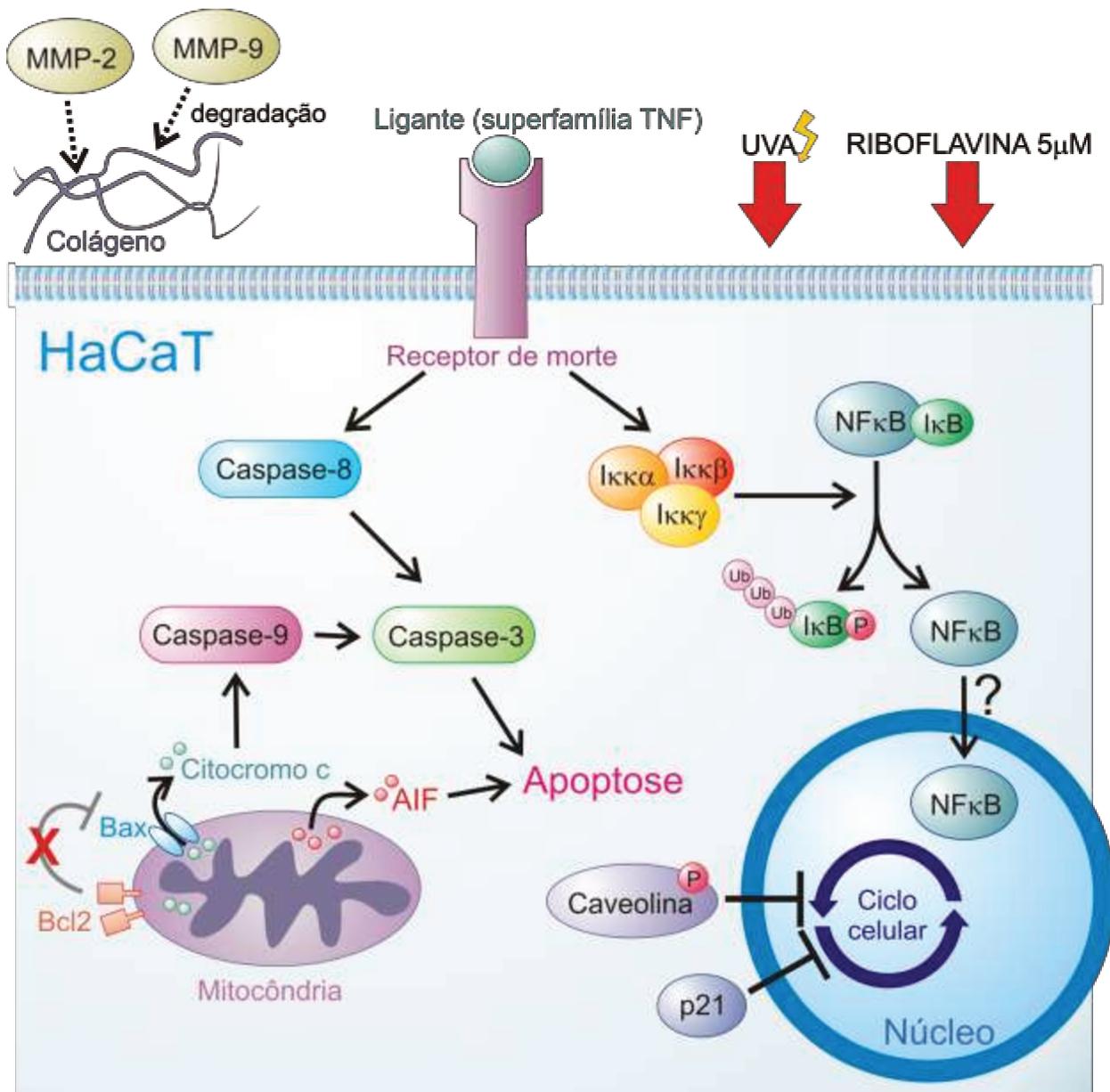
Nos queratinócitos a atividade das MMPs está aumentada quando a riboflavina foi irradiada, com exceção da concentração de 5,0 µM de RF, onde a MMP-9 retorna aos valores de atividade próximos ao controle. A MMP-2 apresentou-se com valores muito próximos aos valores obtidos com a irradiação, independente da presença da RF. Portanto,

a presença desta vitamina parece não alterar a atividade desta MMP. A presença da RF causou aumento na atividade da MMP-9, em baixas concentrações, sendo observado retorno aos valores próximos do controle na maior concentração estudada. Steinbrenner e colaboradores (2003) demonstraram que nas células de queratinócitos humanos, NHEK, a atividade MMP-9 e MMP-2 diminuíram quando 50 mM de azida de sódio durante a irradiação UVA.

Os esquemas 4 (BALB/c 3T3) e 5 (HaCaT) mostram de forma ilustrativa as respostas que as linhagens apresentaram quando foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) somada à doses de IC<sub>50</sub> da RF.



**Esquema 4:** Efeito da RF 6,0 μM associado a dose de 5 J/cm<sup>2</sup> de radiação UVA nas células BALB/c 3T3. Os marcadores de apoptose mostraram que a via extrínseca não está ativa, uma vez que os níveis de caspase 8 estão baixos. Contudo, a via intrínseca está ativa, relacionada aos altos níveis de caspase 3 e da relação Bax/Bcl-2, indicando uma alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial. Apesar desta característica, o AIF não está presente em níveis maiores no citoplasma quando comparado com o controle. Os marcadores de senescência indicam um aumento de p-caveolina que pode estar associado com a parada do ciclo celular. A MMP-2 se mostrou com atividade alta indicando degradação de colágeno, apesar da MMP-9 e p-21 não apresentarem alteração nas condições experimentais, indicando um processo de senescência precoce. Os marcadores de inflamação indicam que o aumento do processo inflamatório induzido pela radiação UVA não é significativamente afetada pela presença de RF.



**Esquema 5:** Efeito da RF 5,0 µM associado a dose de 5 J/cm<sup>2</sup> de radiação UVA nas células HaCaT. Os marcadores de apoptose demonstraram que a via extrínseca e intrínseca estão ativas, uma vez que os níveis de capase-8, -3, relação Bax/Bcl-2 e AIF estão aumentados. Os marcadores de senescência indicam um aumento de p-caveolina e p21 que estão associados com a parada do ciclo celular. As MMPs-2 e -9 se mostraram com atividade alta indicando degradação de colágeno, situações que indicam um processo de senescência precoce. Os marcadores de inflamação indicam um aumento nos níveis de p-IKKα/β que leva a fosforilação de IκB liberando o NFκB que diminui os seus níveis no citoplasma sendo provavelmente translocado para o núcleo onde atuará como fator de transcrição gênica.

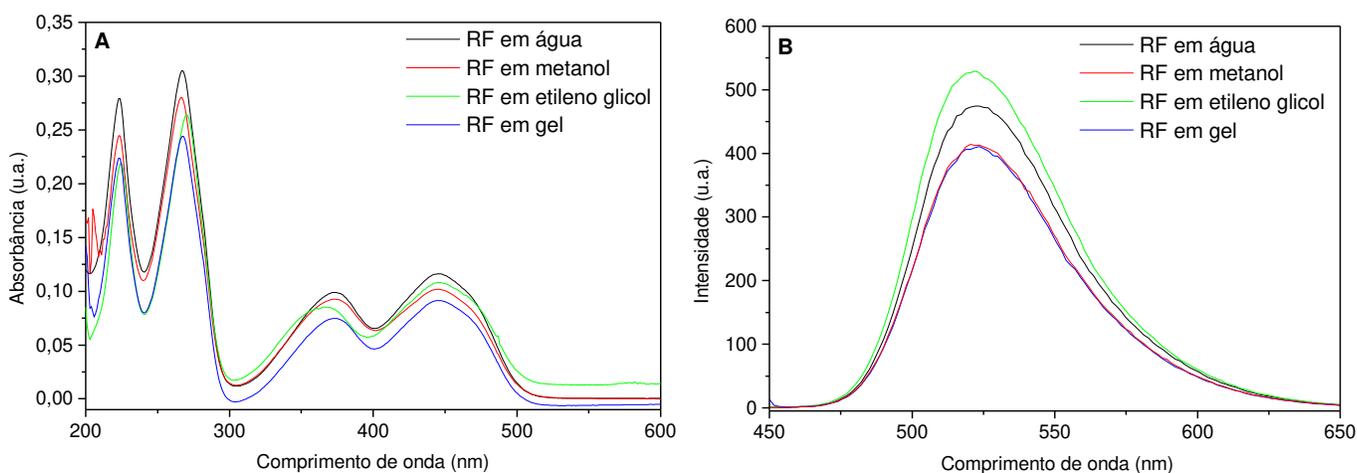
#### **4.6. Incorporação e liberação da riboflavina a partir dos hidrogéis de F-127.**

Hidrogéis do copolímero em bloco F-127 apresentam transição de estado sol $\leftrightarrow$ gel reversível, o que permite que uma solução fria flua sobre a pele recobrando-a perfeitamente e produzindo um gel não-oclusivo à temperatura corpórea. Estes hidrogéis absorvem a secreção de glândulas sudoríparas e apresentam boa tolerância local mesmo no tratamento de queimaduras (Dumortier *et al.*, 2006). Essas propriedades tornam interessante o uso desses hidrogéis em formulações para uso tópico.

A incorporação da RF foi feita por simples mistura da solução contendo RF com soluções contendo o copolímero em bloco F-127 em baixa temperatura (cerca de 2°C), para manutenção de sua forma líquida. A transição sol $\leftrightarrow$ gel ocorre entre 27 e 37 °C dependendo da concentração do F-127. A formação de hidrogéis de F-127 se baseia na propriedade de auto-associação que este surfactante apresenta. As unidades de óxido de etileno (OE) apresentam alta solubilidade em água enquanto as unidades de óxido de propileno (OP) mostram-se praticamente insolúveis (Hvidt, 1996). Assim, ocorre formação de micelas com interior hidrofóbico composto por unidades OP e uma coroa hidrofílica composta por unidades de OE. Essas micelas podem se organizar formando estrutura cúbica (Wanka *et al.*, 1994) com as micelas nos vértices do cubo, formando entre as micelas “canais de água” onde o microambiente dever ser mais próximo ao da água (Gilbert *et al.*, 1986). Nas nossas condições experimentais a concentração do F-127 foi variada de 20 a 35 % m/m. De acordo com as propriedades do hidrogel, espera-se que a RF se localize nos canais de água e seja liberada por simples difusão através do hidrogel.

A confirmação da localização da RF foi feita por espectro de absorção no UV/Vis. Na literatura, a descrição do espectro de absorção da RF atribui todas as bandas a transição

$\pi \rightarrow \pi^*$  porém, Heelis (1982) relata que a banda em  $\lambda_{\text{máx}}$  em 374 nm não foi prevista por cálculos de orbitais moleculares e cálculos por método semi-empírico sugerem alguma mistura com a transição  $n \rightarrow \pi^*$ . Essa transição permitiria que essa banda fosse sensível a alterações de polaridade do solvente. De fato, a Figura 27 mostra que a RF em etileno glicol apresenta deslocamento de cerca de 10 nm na banda na região de 374 nm, em comparação com a RF dissolvida em água. A comparação entre os espectros em alguns solventes com polaridades diferentes mostra que a RF no hidrogel não apresentou deslocamento da banda em 374 nm nem alteração no espectro de fluorescência, confirmando que a RF se localiza na porção aquosa do hidrogel.



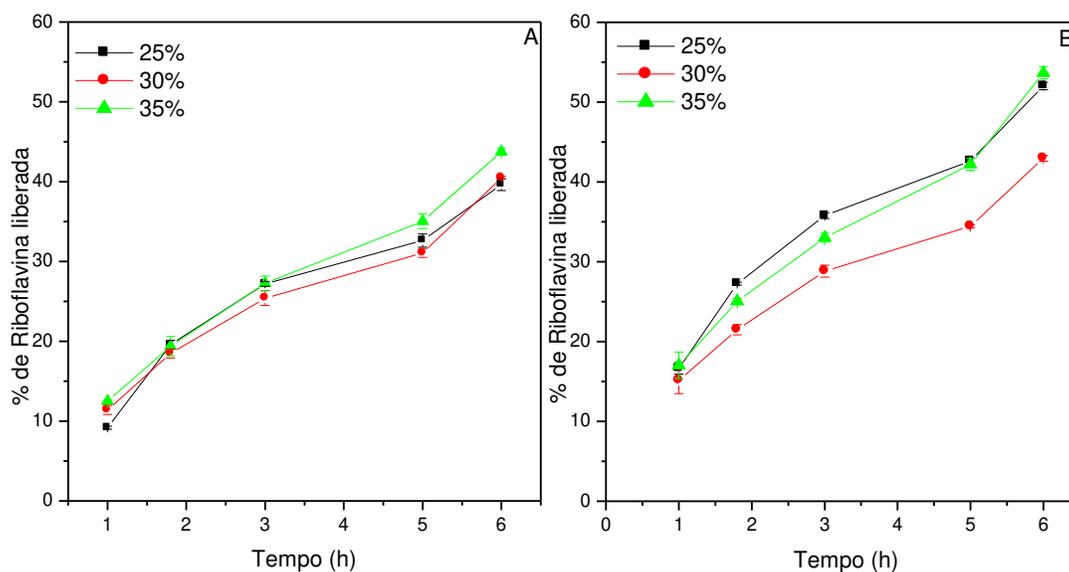
**Figura 27:** Espectro de absorção (A) e fluorescência da riboflavina (B) dissolvida em solventes de polaridades diferentes. A RF foi excitada com luz em 444 nm.

A caracterização espectral no UV/Vis foi feita em diferentes concentrações de RF e do F-127 e a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) foi calculada de acordo com a Lei de Beer-Lambert ( $A=\epsilon bC$ ), como mostrado na tabela 3.

**Tabela 3:** Absorbitividade molar da RF e do F-127

Composto	Comprimento de onda (nm)	Absortividade molar (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
F-127	209	1,1
	277	1,768 x 10 <sup>2</sup>
Riboflavina	266	2,223 x 10 <sup>2</sup>
	374	7,633 x 10 <sup>3</sup>
	446	9,347 x 10 <sup>3</sup>

Posteriormente, foram feitos testes de liberação de RF *in vitro* utilizando o modelo sem membrana a 37°C, a partir de formulações contendo 1 e 10 µM de RF (Figuras 28A e 28B, respectivamente) e F-127 variando de 25, 30 e 35% m/m. Os acompanhamentos da liberação de RF foram realizados a cada uma hora durante as 6 primeiras horas, utilizando espectrofotômetro no UV/Vis.

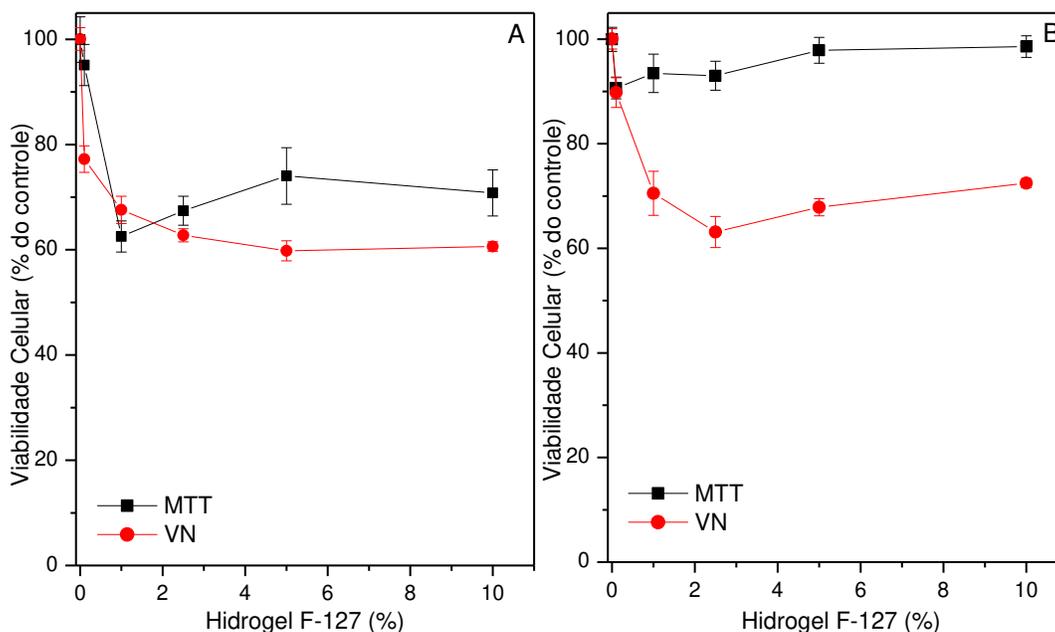


**Figura 28:** Perfil de liberação da RF: A riboflavina liberada nas diferentes concentrações da formulação contendo riboflavina na concentração de 1  $\mu\text{M}$  (A) e 10  $\mu\text{M}$  (B). A RF foi liberada em 1,0 mL de PBS à 37°C, em cada tempo foi retirada toda a solução e substituída por 1,0 mL de tampão PBS novo. Experimentos foram realizados em triplicata e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

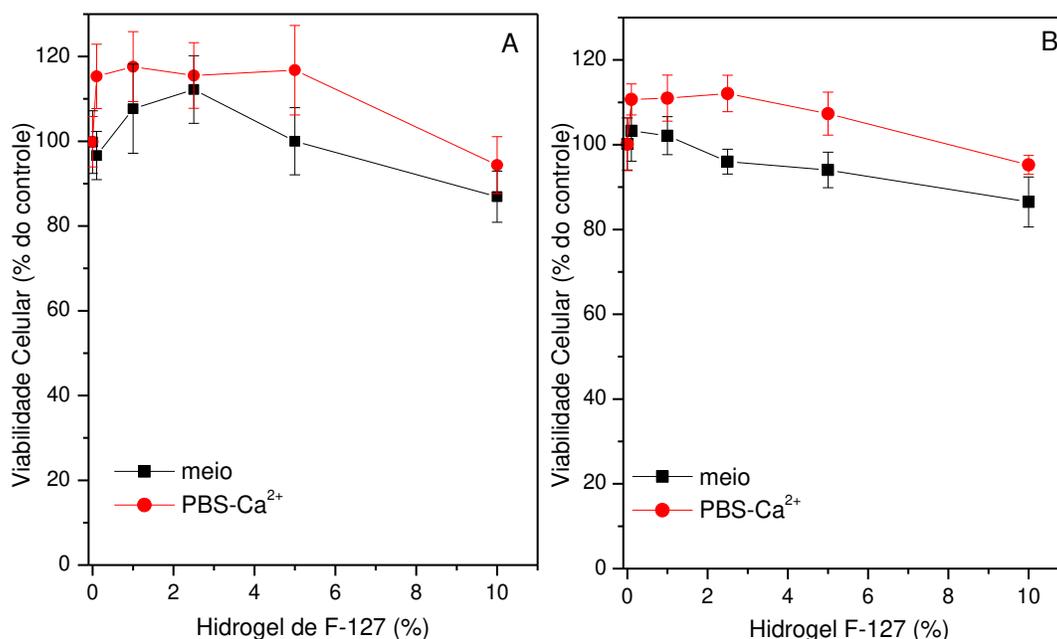
Nas Figuras 28A e 28B, pode-se observar que as porcentagens de RF liberada variando-se a concentração dos hidrogéis apresentam perfis semelhantes. A riboflavina liberada após 6 h foi de aproximadamente 40% para as formulações com 1,0  $\mu\text{M}$  de RF e 50% para as de 10,0  $\mu\text{M}$ . No tempo experimental de fototoxicidade de 1h 50min, a concentração de RF liberada foi de aproximadamente 2,5 $\mu\text{M}$  para as formulações contendo 10 $\mu\text{M}$  de riboflavina. Assim, a formulação ideal de riboflavina em hidrogel de F-127, para os próximos experimentos foi determinada em função da concentração necessária para que se obtenha uma concentração de riboflavina livre subletal, com potencial de uso terapêutico. Portanto, foi escolhido o gel de 25% pois as concentrações escolhidas variam de 1,0 a 6,0  $\mu\text{M}$  no intervalo de tempo de 1 h e 50 min, correspondente ao tempo de tratamento do teste de fototoxicidade.

#### 4.7. Avaliação da citotoxicidade do F-127 pela redução do MTT e captação do VN.

A Figura 29 mostra a citotoxicidade do F-127 determinada pela redução do MTT e captação do VN. O tratamento foi de 24 h, com diferentes concentrações, utilizando células BALB/c 3T3 e HaCaT. A linhagem celular BALB/c 3T3 se mostrou mais sensível à presença do copolímero F-127 (Figura 29A) do que os queratinócitos (Figura 29B). Nota-se também que em ambas as linhagens ocorre redução de viabilidade de aproximadamente 40%, não atingindo um  $IC_{50}$ . Outros estudos terão que ser realizados para definir o mecanismo molecular da toxicidade do F-127.



**Figura 29:** Avaliação da citotoxicidade do hidrogel F-127 em células BALB/c 3T3 e HaCaT: As células BALB/c 3T3 (A) e HaCaT (B) foram tratadas com diferentes concentrações de hidrogel F-127 por 24 h. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT (-■-) e captação de VN (-●-) em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas ao hidrogel. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

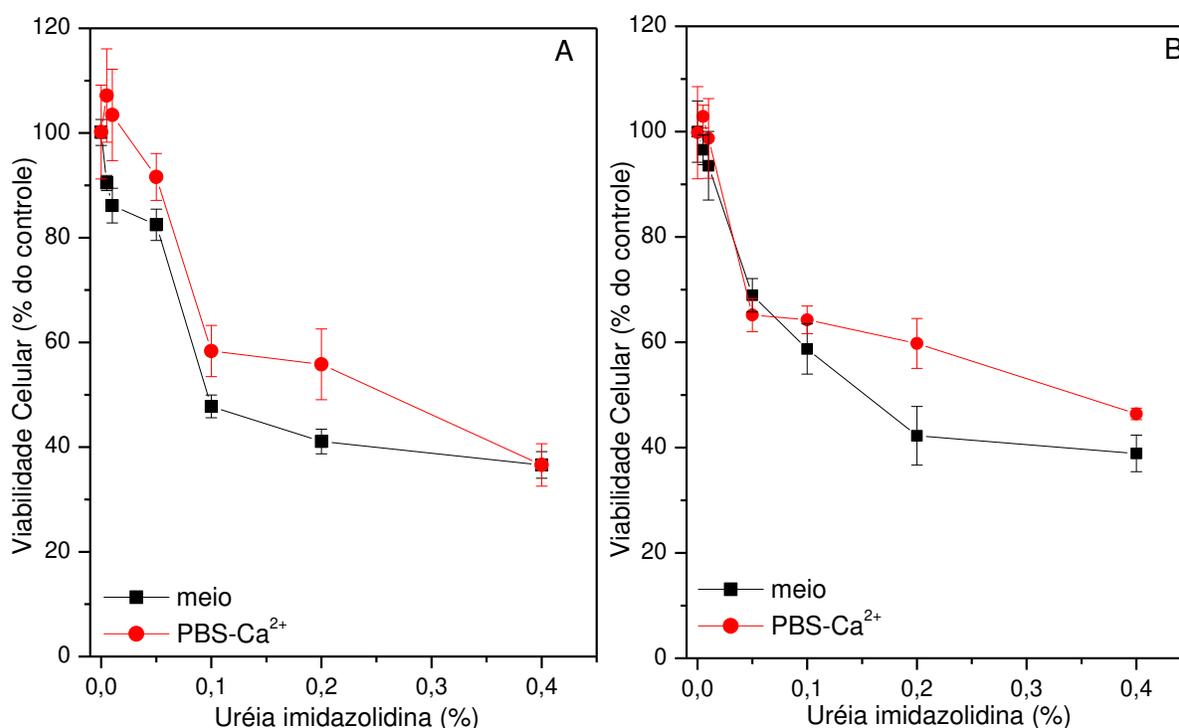


**Figura 30:** Avaliação da citotoxicidade do hidrogel F-127 em células BALB/c 3T3 e HaCaT: As células BALB/c 3T3 (A) e HaCaT (B) foram tratadas com diferentes concentrações de F-127 diluídos em meio completo (-■-) e PBS-Ca<sup>2+</sup> (-●-) por 1h50min. Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas ao hidrogel. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

Além do tempo de tratamento de 24 h, foi avaliada a citotoxicidade por captação do VN do F-127 no tempo de 1 h 50 min, uma vez que este foi o tempo de tratamento do experimento de fototoxicidade. Os ensaios foram realizados em meio completo e PBS-Ca<sup>2+</sup>, como se observa na Figura 30. Neste tempo de exposição de 1 h 50 min, não se verificou redução de viabilidade das células estudadas (Figura 30A e 30B). De fato, a literatura mostra que o copolímero F-127, nas concentrações entre 20- 35%, pode ser utilizado como sistema de transporte de fármacos oftalmológicos (Bochot et al. 1998; Desai e Blanchard, 1998), parenteral (Paavola et al. 1995; Wang e Johnson, 1995), percutâneo (Tobiyama et al.

1994; Suh *et al.*, 1997; Lee *et al.* 1997) e subcutâneo (Barichello *et al.* 1999), mostrando-se atóxico.

Além do F-127 foi verificada também, a citotoxicidade do conservante uréia imidazolidina (Figura 31), no tratamento de 1 h 50 min. Tanto as células BALB/c 3T3 como as HaCaT se mostraram sensíveis e foi observada redução de viabilidade, com o valor de  $IC_{50}$  de 0,1% em ambas as linhagens celulares.



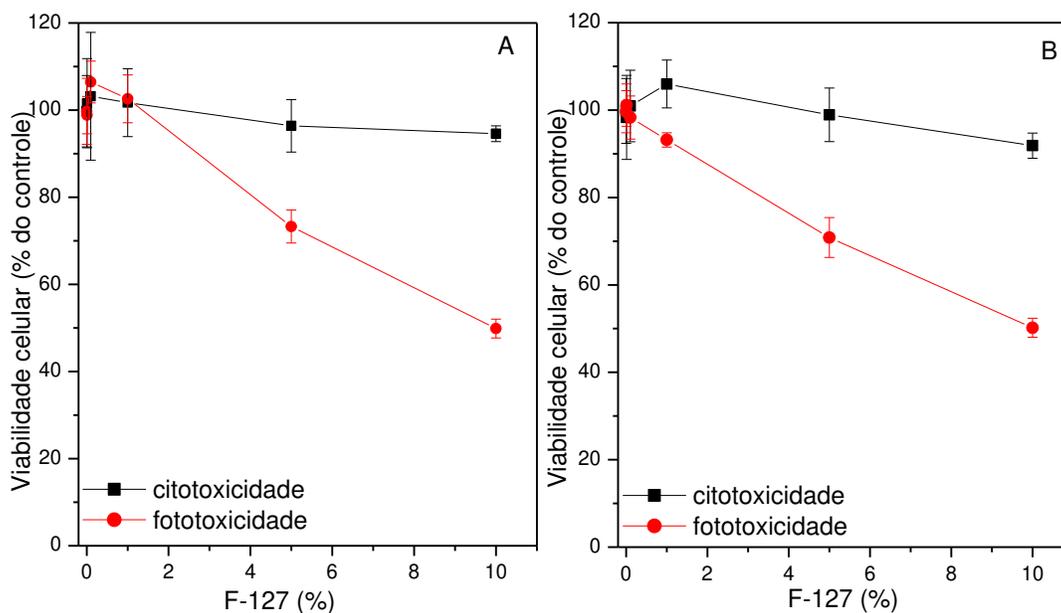
**Figura 31:** Avaliação da citotoxicidade do uréia imidazolidina em células BALB/c 3T3 e HaCaT: As células BALB/c 3T3 (A) e HaCaT (B) foram tratadas com diferentes concentrações do uréia imidazolidinila diluídos em meio completo (-■-) e PBS-Ca<sup>2+</sup> (-●-) por 1 h 50 minutos. Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas à uréia imidazolidina. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

A partir dos resultados mostrados nas Figuras 26 a 28 foi determinada a formulação de trabalho constituída de 25% de copolímero F-127 e 0,01% de conservante uréia imidazolidina.

#### **4.8. Avaliação da fototoxicidade dos hidrogéis do F-127.**

##### **4.8.1. Avaliação da fototoxicidade através da captação do VN.**

O efeito do F-127, somado à radiação UVA na viabilidade celular foi avaliada nas células BALB/c 3T3 e HaCaT, nas concentrações de 0,01 a 10%. A Figura 32 mostra que F-127 apresenta-se não citotóxico, porém, quando irradiado foi possível observar fototoxicidade. Neste caso obtiveram-se os valores de  $IC_{50}$  da curva de fototoxicidade, sendo este igual a 10% para as duas linhagens.



**Figura 32:** Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade do F-127: As células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram tratadas com concentrações diferentes de por 1h e (-●-) foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou (-■-) mantidas no escuro por 50 minutos. Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas ao F-127. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

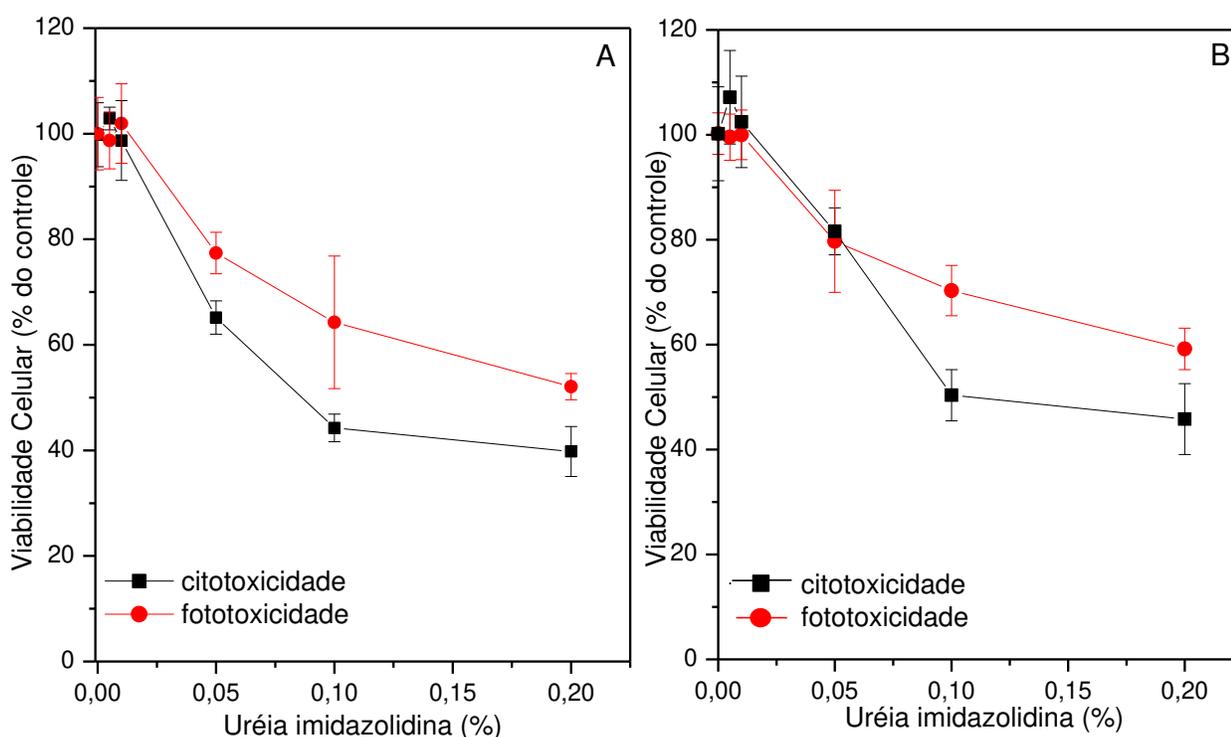
Assim o valor de PIF foi determinado de acordo com a equação 2:

$$PIF = \frac{C_{m\acute{a}x}(-UVA)}{IC_{50}(+UVA)} \text{ (equação 2)}$$

O valor do PIF para as células BALB/c 3T3 e HaCaT foi 1, sendo então considerado que o F-127 não é fototóxico ( $PIF \leq 1$ ). Apesar de ser classificado como não-fototóxico pelo PIF foi identificado o valor do  $IC_{50}$  sendo, portanto o F-127 fototóxico.

A seguir, foi realizado o teste de fototoxicidade com o conservante, uréia imidazolidina (UI) (Figura 33). Os valores de  $IC_{50}$  foram determinados para as células BALB/c 3T3,  $IC_{50}=0,08\%$  (Figura 30A) e HaCaT,  $IC_{50}=0,1\%$  (Figura 30B). Em relação à fototoxicidade, as células BALB/c 3T3 se mostraram mais sensíveis e foi determinado o

valor de  $IC_{50}=0,2\%$ . As células HaCaT se mostraram mais resistentes e até a concentração testada, não foi possível determinar o valor do  $IC_{50}$ . Poucos dados são encontrados na literatura em relação à toxicidade desse conservante. Placzek e colaboradores (2004) observaram que a UI não apresenta fotohemólise significativa. Uma vez obtidas as curvas de cito e fototoxicidade, foram feitos os cálculos de PIF. A equação 1 foi utilizada para as células BALB/c 3T3 e a equação 2 para as células HaCaT, sendo que os valores obtidos classificam o conservante como não fototóxico.



**Figura 33:** Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da UI: As células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram tratadas com concentrações diferentes do uréia imidazolidina por 1h e (-●-) foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou (-■-) mantidas no escuro por 50 minutos. Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas ao conservante. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

Assim, tanto o F-127 quanto o conservante apresentaram valor de PIF, como mostrado na tabela 4 que os classificam como não-fototóxicos. Isto representa uma característica importante para o preparo de formulações para uso terapêutico.

**Tabela 4:** Valores de IC<sub>50</sub> e PIF para o hidrogel e conservante.

Composto	BALB/c 3T3			HaCaT		
	IC <sub>50</sub> (-UVA)	IC <sub>50</sub> (+UVA)	PIF	IC <sub>50</sub> (-UVA)	IC <sub>50</sub> (+UVA)	PIF
F-127	10%	10%	1	10%	10%	1
Uréia Imidazolidina	0,1%	0,2%	2	0,1%	0,2%	2

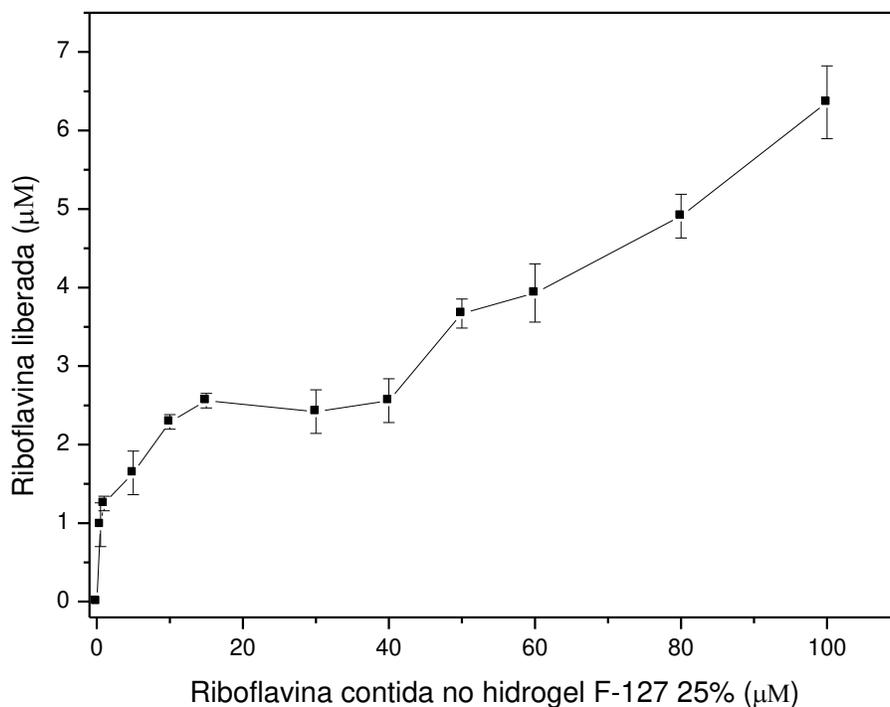
#### 4.9. Avaliação da fototoxicidade dos hidrogéis de F-127 contendo riboflavina.

Para avaliação da fototoxicidade do hidrogel contendo riboflavina frente às linhagens celulares foram utilizadas placas com “transwell” com “inserts” de 6,5mm de diâmetro, membrana de polycarbonato com poros 8,0 µm de diâmetro. Este sistema permite que ocorra liberação contínua da RF durante a 1h e 50 min, que foi o tempo de exposição padrão utilizado para os testes de fototoxicidade.

##### 4.9.1. Liberação da riboflavina a partir dos hidrogéis de F-127.

Foram feitos testes de liberação da RF *in vitro* utilizando o modelo com membrana (“transwell”), a partir de formulações contendo 0,5 a 100 µM de RF (Figura 34) e 25% m/m de F-127. Neste ensaio, a RF liberada das formulações ao final de 1 h 50 min foi determinada utilizando espectrofotômetro no UV/Vis.

A partir desse resultado e os resultados obtidos com o teste de fototoxicidade da RF, Figura 8, pôde-se selecionar as concentrações de trabalho de RF a serem estudadas no teste de fototoxicidade com o hidrogel contendo RF.

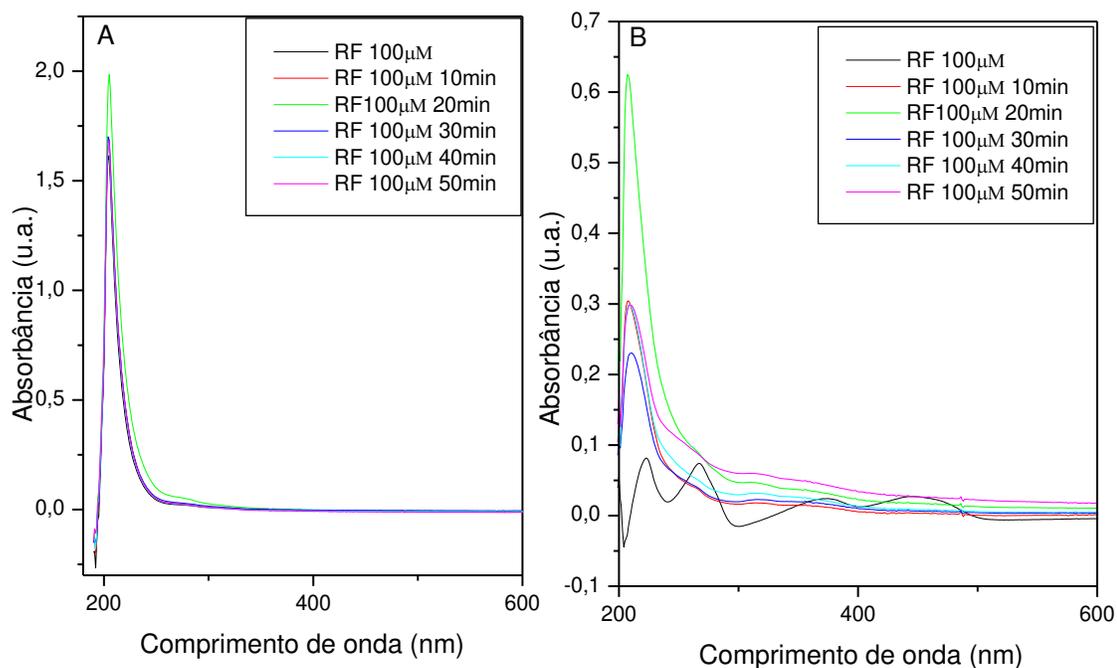


**Figura 34:** Perfil de liberação da RF na “transwell”: A riboflavina liberada no hidrogel F-127 25% contendo riboflavina na concentração de variando de 0,5 a 100 µM. A concentração de RF liberada em 1,0 mL de PBS foi determinada ao final de 1h e 50 min. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

Além da RF foi verificado também o quanto de F-127 estava sendo liberado utilizando-se a “transwell”. Assim, para a solução tampão de PBS-Ca<sup>2+</sup>, após 1h 50 min, foi liberada uma média 1,75% ± 0,08 de F-127 sendo essa uma concentração atóxica.

#### 4.9.2 Efeito da radiação UVA nas soluções contendo RF e F-127.

Para a avaliação do efeito da radiação UVA na solução liberada do hidrogel foi coletada a solução sobrenadante, onde a RF foi liberada durante 1h e 50 min e feita a irradiação dessa solução por 50 min. Os espectros foram obtidos em intervalos de 10 min (Figura 35).



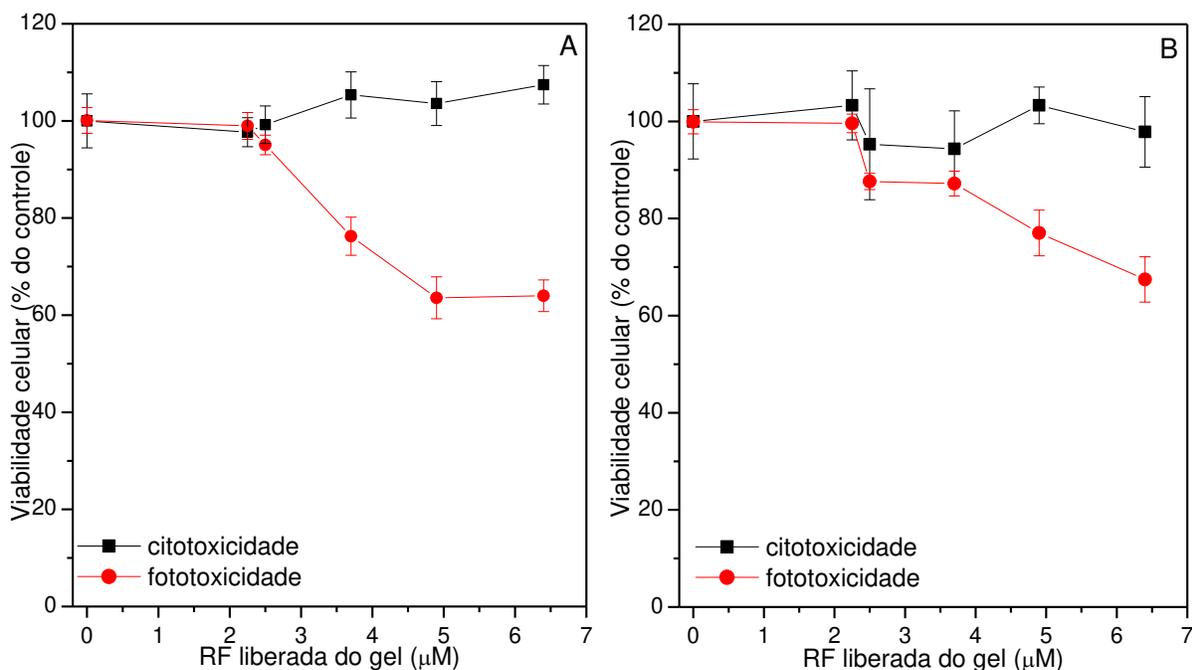
**Figura 35:** Caracterização espectral da RF liberada do hidrogel F-127 25% da “transwell” em tampão PBS-Ca<sup>2+</sup> por 1 h e 50 min sendo posteriormente irradiada e analisada a cada 10 min. (A) com o branco sendo o PBS-Ca<sup>2+</sup> e (B) o branco sendo o liberado do hidrogel F-127 25% sem RF no PBS-Ca<sup>2+</sup>.

Na Figura 35A é possível observar que irradiação com UVA causa pequena alteração no espectro do F-127, indicando que mesmo que o copolímero não apresente fototoxicidade, ocorre fotodecomposição em alguma extensão. A Figura 35B mostra que mesmo na presença do F-127 ocorre fotodecomposição da RF, como já caracterizado na

Figura 3. Inicialmente, observam-se os 4 picos característicos da RF na solução que não foi irradiada e, com a irradiação, ocorre o surgimento de um pico em 209 nm além de uma banda larga com  $\lambda_{\text{máx}}=314$  nm e um ombro discreto em  $\lambda=260$  nm. O ombro em  $\lambda=260$ nm pode estar relacionado com a formação dos fotoprodutos como se pode observar na Tabela 1 e Figura 4.

#### **4.9.3. Fototoxicidade da riboflavina liberada a partir dos hidrogéis de F-127**

Para a avaliação da fototoxicidade da RF liberada a partir dos hidrogéis de F-127 foi utilizado o sistema “transwell”. Foi verificada a fototoxicidade da solução liberada do hidrogel F-127 25% m/v em diferentes concentrações de RF através da “transwell” por 1h e 50 min conforme a Figura 36, além da fototoxicidade da formulação na “transwell” (Figura 37).



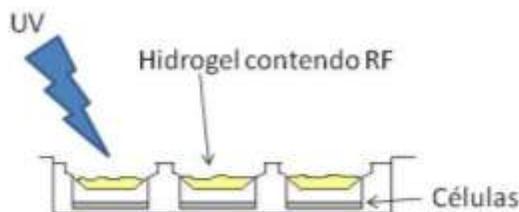
**Figura 36:** Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da solução liberada do hidrogel F-127 25% em diferentes concentrações de RF: As células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram tratadas por 1 h com a solução tampão PBS-Ca<sup>2+</sup> onde a RF contida no hidrogel F-127 25% m/m foi liberada por 1 h 50 min e (-●-) foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou (-■-) mantidas no escuro por 50 minutos. Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas ao conservante. O experimento foi realizado em placas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

Na Figura 36 foi possível verificar que a solução liberada da formulação, durante 1h e 50 min utilizando a “transwell”, não apresentou fototoxicidade nas concentrações testadas. Assim, como se pode notar, em nenhuma condição foi possível determinar o valor de IC<sub>50</sub>. Para esta situação o valor do PIF foi calculado de acordo com a equação 3, sendo considerada não fototóxica.

$$PIF = \frac{C_{máx}(-UVA)}{C_{máx}(+UVA)} = 1 \text{ (equação 3)}$$

Através da comparação entre as Figuras 8 e 36, pode-se observar que o F-127 reduz a fototoxicidade da RF, embora ocorra a formação dos fotoprodutos como observado na Figura 35. Assim, quando a RF está sozinha na solução o valor de  $IC_{50}$  foi de 6,0 e 5,0  $\mu\text{M}$  para as células BALB/c 3T3 e HaCaT respectivamente, enquanto a RF liberada da formulação não apresentou valor de  $IC_{50}$  nas condições estudadas.

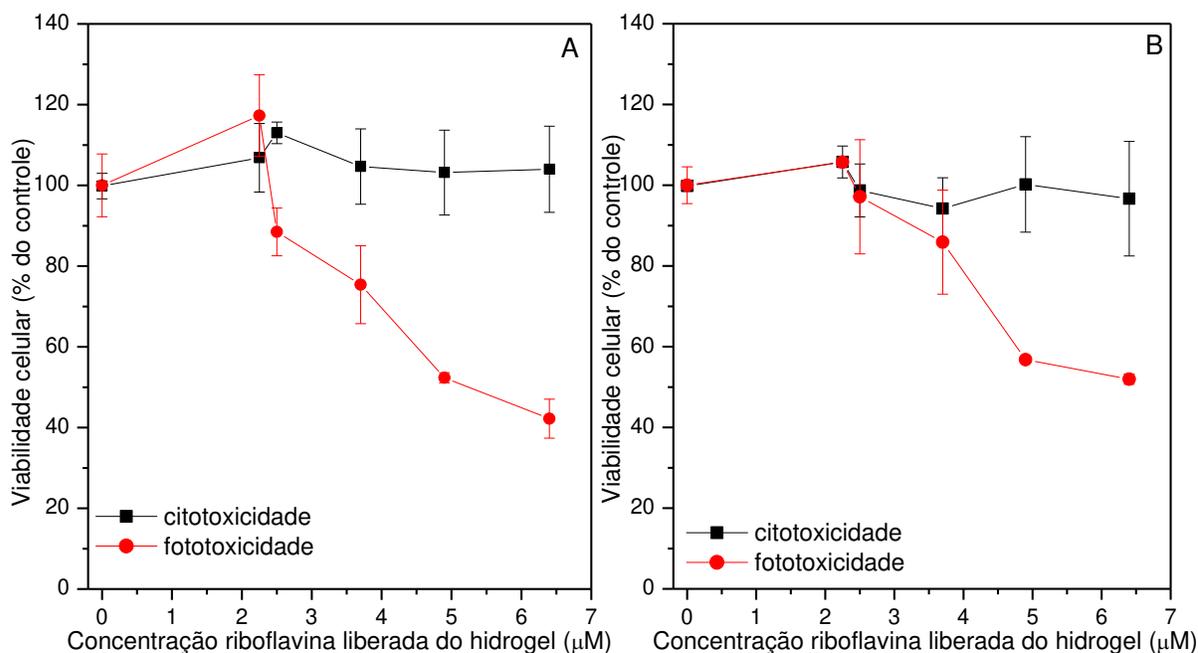
Porém, quando foi feita a irradiação do sistema completo, como mostra o esquema 3, para as diferentes concentrações de RF no hidrogel F-127 25% m/v foi verificada a fototoxicidade, como mostra a Figura 37.



**Esquema 6:** As formulações de hidrogéis contendo RF foram avaliadas utilizando placas “transwell insert”, onde as amostras serão colocadas na parte superior da placa, separadas do meio celular por uma membrana. Todo o sistema foi irradiado.

Nas células BALB/c 3T3 (Figura 37A) foi determinado o valor de  $IC_{50}$  de 5,0  $\mu\text{M}$  de RF e nos queratinócitos (Figura 37B) de 6,3  $\mu\text{M}$  de RF e não foi observada citotoxicidade. Assim o valor do PIF para esta situação foi calculado de acordo com a equação 2, sendo ambos considerados fototóxicos porque o valor do PIF foi  $>1$ .

$$PIF = \frac{C_{m\acute{a}x}(-UVA)}{IC_{50}(+UVA)}$$



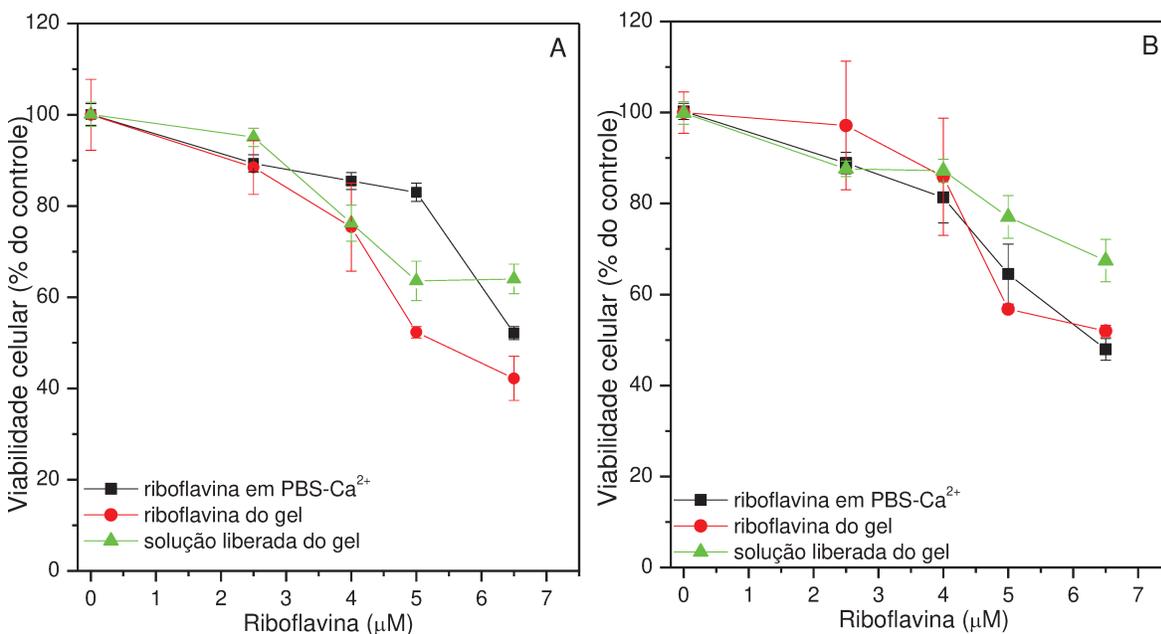
**Figura 37:** Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da solução liberada do hidrogel F-127 25% em diferentes concentrações de RF: As células (A) BALB/c 3T3 e (B) HaCaT foram tratadas com a solução tampão PBS-Ca<sup>2+</sup> onde a RF contida no hidrogel F-127 25% m/m foi liberada por 1h da “transwell” e (-●-) foram expostas à radiação UVA (dose 5 J/cm<sup>2</sup>) ou (-■-) mantidas no escuro por 50 minutos, com a “transwell”. Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas à formulação com RF. O experimento foi realizado em placas de 24 poços com transwell e os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

Na tabela 5 é possível verificar os valores de PIF da solução liberada da formulação e da formulação na “transwell”.

**Tabela 5:** Valores de IC<sub>50</sub> e PIF para a formulação.

Composto	BALB/c 3T3			HaCaT		
	IC <sub>50</sub> (-UVA)	IC <sub>50</sub> (+UVA)	PIF	IC <sub>50</sub> (-UVA)	IC <sub>50</sub> (+UVA)	PIF
Solução liberada da formulação	6,5	6,5	1	6,5	6,5	1
Formulação	6,5	5,0	1,3	6,5	6,3	1,01

Finalmente, foi feita comparação entre as curvas de fototoxicidade obtidas através da irradiação da RF em solução de PBS-Ca<sup>2+</sup>, RF liberada do hidrogel (através do sistema com membrana) e RF na presença do hidrogel (com a irradiação do sistema completo). A Figura 38 demonstra as curvas de fototoxicidade das situações estudadas. Nas células BALB/c 3T3 (Figura 38A) a curva que apresentou maior fototoxicidade foi a RF na presença do hidrogel F-127 25% m/v, enquanto que na HaCaT (Figura 38B) o perfil das condições não se alterou muito. Em nenhuma das situações foi observada citotoxicidade (ausência de radiação UVA) significativa. Contudo, quando o sistema completo foi irradiado, o valor de IC<sub>50</sub> foi próximo ao da RF com PBS-Ca<sup>2+</sup>. Ou seja, neste caso não foi possível observar o efeito do F-127. Neste caso, a geração de ROS pode ter sido maior, uma vez que, a concentração de RF no hidrogel foi bem maior (100 µM) que na solução liberada (da ordem 6,0 µM). Assim, o efeito de redução de fototoxicidade observada devido à presença de F-127 na solução não pode ser notado.



**Figura 38:** Curva de fototoxicidade: as células BALB/c 3T3 (A) e HaCaT (B) foram expostas a diferentes soluções, sendo a RF (-■-), RF liberada do hidrogel F-127 25% m/v (-●-) e solução liberada, da transwell por 1h e 50 min, da formulação RF e hidrogel F-127 25% m/v (-▲-). Para a obtenção das várias concentrações de RF liberadas do gel foram utilizadas formulações contendo 15, 60, 80 e 100 µM de RF baseado no perfil de liberação apresentado no gráfico 34. As células foram tratadas com as soluções por 1h e foram expostas a radiação UVA por 50 min. Os valores foram expressos em porcentagens de captação de VN em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas a nenhuma das situações estudadas. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

# CONCLUSÕES

## **5. Conclusões**

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A RF não apresentou citotoxicidade, porém apresentou fototoxicidade nas células BALB/c 3T3 e HaCaT. Sendo que a linhagem HaCaT também se mostrou um bom modelo para a avaliação de fototoxicidade.
- A radiação UVA causou uma pequena redução na proliferação celular, sendo que a presença de RF somada à radiação UVA acentuou tal redução de forma dependente da dose. A radiação UVA induziu inflamação e apoptose. Embora não se tenha observado aumento dos marcadores de senescência, caveolina e p-caveolina, os níveis de p21 nas células BALB/c 3T3 aumentaram indicando uma parada do ciclo celular, sendo que na HaCaT ocorreu uma redução nessa expressão.
- A RF, sob irradiação, induziu a apoptose por via intrínseca nas duas linhagens, sendo que nas células HaCaT RF 5,0  $\mu\text{M}$  causou aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial. De forma oposta, RF 1,0  $\mu\text{M}$  parece prevenir o processo de apoptose causado pela radiação UVA. A RF parece não afetar significativamente os níveis de NF $\kappa$ B nas células BALB/c 3T3. Nas células HaCaT, os resultados sugerem uma ativação de NF $\kappa$ B e possível translocação para o núcleo, resultando em processo inflamatório.
- A senescência precoce foi induzida pela RF irradiada tanto nas células BALB/c 3T3 como nas células HaCaT, quando a mesma é utilizada na concentração referente ao IC<sub>50</sub>.

- O F-127 *per si* apresentou fototoxicidade. Embora a presença de F-127 na solução induza redução da fototoxicidade da RF, a irradiação do hidrogel contendo RF pode levar ao aumento da fototoxicidade da mesma.
- A RF apresenta um potencial para uso em terapia fotodinâmica, uma vez que a ela se mostrou fototóxica quando irradiada com doses subtóxicas de radiação UVA.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## **6. Referências Bibliográficas.**

- Adachi, M.; Gazel, A.; Pintucci, G.; Shuck, A.; Shifteh, S.; Ginsburg, D.; Rao, L.S.; Kaneko, T.; Freedberg, I.M.; Tamaki, K.; Blumenberg, M. **Specificity in stress responde: epidermal keratinocytes exhibit specialized UV-responsive signal transduction pathways.** *DNA and Cell Biology* 2003; 22(10): 665-677.
- Ahmad, I.; Fasihullah, Q.; Noor, A.; Ansari, A.I.; Ali, Q.N.M. **Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study.** *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 280(1-2): 199-208.
- Ahmad, I.; Rapson, H.D.C. **Multicomponent spectrophotometric assay of riboflavine and photoproducts.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1990; 8(3): 217-223.
- Alexandridis, P.; Hatton, T.A. **Poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modelling.** *Colloids Surfaces* 1995; 96(1/2): 1-46.
- Assunção Guimarães, C.; Linden, R. **Programmed cell deaths: Apoptosis and alternative deathstyles.** *European Journal of Biochemistry* 2004; 271(9): 1638-1950.
- Augustin, C.; Collombel, C.; Damour, O. **Measurements of the protective effect of topically applied sunscreens using *in vitro* three-dimensional dermal and skin equivalents.** *Photochemistry and Photobiology* 1997; 66(6): 205-210.
- Baier, J.; Maisch, T.; Maier, M.; Engel, E.; Landthaler, M.; Baumler, W. **Singlet oxygen generation by UVA light exposure endogenous photosensitizers.** *Biophysical Journal* 2006; 91 1452-1459.
- Barichello, J.M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagai, T. **Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats.** *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 184(2): 189-198.
- Benavides, R.; Martínex, V.; Mitjans, M.; Infante, M.R.; Moran, C.; Clapés, P.; Clothier, R.; Vinardell, M.P. **Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by *in vitro* methods as alternative to the animal test.** *Toxicology* 2004; 201(1-3): 87-93.
- Bender, K.; Blattner, C.; Knebel, A.; Iordanov, M.; Herrlich, P.; Rahmsdorf, H.J. **UV-induced signal transduction.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology* 1997; 37(1-2):1-17.
- Bender, K.; Gottlicher, M.; Witeside, S.; Rahmsdorf, H.J.; Herrlich, P. **Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NFκB by UV.** *The EMBO Journal* 1998, 17(17): 5170-5181.
- Bochot, A; Fattal, E.; Grossiord, J.L.; Puisieux, F.; Couvreur, P. **Characterization of a new ocular delivery system based on a dispersion of liposomes in a thermosensitive gel.** *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 162(1-2): 119-127.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A. **A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90).** *Methods in Cell Science* 1984; 9(1): 7-9.
- Brenneisen, P; Blandschun, R.; Bernards, M.; Wenk, J.; Wlaschek, M.; Meyer-Ingold, W.; Schauen, M.; Kreg, T.; Scharffetter-Kochanek, K. **Increased temperature: a potentially important side-effect of ultraviolet radiation treatment leading to**

- induction of interstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1.** *The British Journal of Dermatology* 1998; 139(3): 537-539.
- Campbell, C.; Quinn, A.G.; Angus, B.; Farr, P.M.; Rees, J.L. **Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation.** *Cancer Research* 1993; 53(12): 2697-2699.
- Castano, A.P.; Mroz, P.; Hamblin, M.R. **Photodynamic therapy and anti-tumour immunity.** *Nature Reviews Cancer* 2006; 6(7): 535-545.
- Chen, Q.; Ames, B.N. **Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells.** *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 1994; 91(10): 4130-4134.
- Chen, Q.M.; Liu, J.; Merrett, J.B. **Apoptosis or senescence-like growth arrest : influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts.** *The Biochemical Journal* 2000; 347(2): 543-551.
- Chinnathambi, S.; Tomanek-Chalkley, T.; Bickenbach, J.R. **HSP70 end EndoG modulated cell death by heat in human skin keratinocytes in vitro.** *Cells, Tissues, Organs* 2008; 187(2): 131-140.
- Chipuk, J.E.; Green, D.R. **How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?** *Trends in Cell Biology* 2008; 18(4): 157-164.
- Cooper, S.J.; Bowden, G.T. **Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-κB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis.** *Current Cancer Drug Targets* 2007; 7(4): 325-334.
- Dasari, A.; Bartholomew, J.N.; Volonte, D.; Galbiati, F. **Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements.** *Cancer Research.* 2006; 66(22): 10805-10814.
- de Souza Queiroz, K.C.; Zambuzzi, W.F.; Santos de Souza, A.C.; da Silva, R.A.; Machado, D.; Justo, G.Z.; Carvalho, H.F.; Pappelenbosch, M.P.; Ferreira, C.V. **A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours.** *Cancer Letter* 2007; 258(1): 126-134.
- Desai, S.D.; Blanchard, J. **In vitro evaluation of Pluronic F127-based controlled-release ocular delivery system for pilocarpine.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998; 87(2): 226-230.
- Dijoux, N.; Guingand, Y.; Bourgeois, C.; Durand, S.; Fromageot, C.; Combe, C.; Ferret, P.-J. **Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay.** *Toxicology in Vitro* 2006; 20(4): 480-489.
- Dumortier, G.; Grossiord, J.L.; Agnely, F.; Chaumeil, J.C. **A review of Poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics.** *Pharmaceutical Research* 2006; 23(12): 2709-2727.
- Edwards, A.M.; Barredo, F.; Silva, E.; Deioannes, A.E. **Apoptosis induction in nonirradiated human HL-60 and murine NSO/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin.** *Photochemistry and Photobiology* 1999; 70(4): 645-649.
- Edwards, A.M.; Silva, E. **Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2001; 63(1-3): 126-31.
- Edwards, A.M.; Silva, E.; Jofré, B.; Becker, M. I., De loannes, A. E. **Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with triptophan and riboflavin.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1994; 24(3): 179-186.

- El-Mahdy, M.A.; Zhu, Q.; Wang, Q.; Wani, G.; Patnaik, S.; Zhao, Q.; Arafa, E.; Barakat, B.; Mir, S.N.; Wani, A.A. **Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome.** *Photochemistry and Photobiology* 2008; 84(2): 307–316.
- Erofeev, M.V.; Kieft, I.E.; Sosnin, E.A.; Stoffels, E. **UV excimer lamp irradiation of fibroblasts: The influence on antioxidant homeostasis.** *IEEE Transactions on Plasma Science* 2006, 34 (4) 1359-1364.
- Fagot, D.; Asselineau, D.; Bernerd, F. **Matrix metalloproteinase-1 production observed after solar-simulated radiation exposure is assumed by dermal fibroblasts but involves a paracrine activation through epidermal keratinocytes.** *Photochemistry and Photobiology* 2004; 79(6): 499-505.
- Ferreira, C.V.; Bos, C.L.; Versteeg, H.H.; Zenker, G.; Duran, N.; Peppelenbosch, M.P. **Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death.** *Blood* 2004; 104(5): 1459-1464.
- Frank, S.; Oliver, L.; Lebreton-De Coster, C.; Moreau, C.; Lecabelle, M.T.; Michel, L.; Vallette, F.M.; Dubertret, L. Coulomb, B. **Infrared radiation affects the mitochondrial pathway of apoptosis in human fibroblasts.** *The Journal of Investigative Dermatology* 2004; 123(5): 823-831.
- Frippiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J., Toussaint, O. **Subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers a release of transforming growth factor- 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts.** *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(4): 2531–2537.
- Fischer, T.W.; Zmijewski, M.A.; Wortsman, J.; Slominski, A. **Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and attenuates activation of initiator (casp-9) and effector caspases (casp-3/casp-7) and PARP in UVR-exposed HaCaT keratinocytes.** *Journal of Pineal Research* 2008; 44(4): 397-407.
- Fisher, G.J.; Wang, Z.Q.; Datta, S.; Varani, J.; Kang, S.; Voorhees, J.J.; **Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light.** *The New England Journal of Medicine* 1997; 337(20): 1419–1428.
- Galbiati, F.; Razani, B.; Lisanti, M.P. **Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy.** *Trends in Molecular Medicine* 2001; 7(10): 435-441.
- Gesztesi, J.L. Tese Mestrado em Ciências Biológicas “**Ação de ésteres de sacarose em cultura de tecido**”- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 1990, 139p.
- Ghosh, S.; May, M.J.; Kopp, E.B. **NF-κB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.** *Annual Review of Immunology* 1998; 16: 225–260.
- Gilbert, J.C.; Hadgraf, J.; Bue, A.; Brookes, L.G. **Drug release from Pluronic F-127 gels.** *International Journal of Pharmaceutics* 1986; 32(2): 223-228.
- Gilmore, T.D.; Koedood, M.; Piffat, K.A.; White, D.W. **Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer.** *Oncogene* 1996; 13(7): 1367-1378.
- Gold, M.H. **Aminolevulinic acid photodynamic therapy: medical evidence for its expanded use.** *Expert Review of Medical Devices* 2006; 3(3): 357-371.
- Gottlieb, R.A. **Mitochondria: execution central.** *FEBS Letters* 2000; 482(1-2): 6-12.
- Guttman, D.E. **Complex formation influence on reaction rate. I. Effect of caffeine on riboflavin base-catalyzed degradation rate** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1962; 51: 1162-1166.

- Habraken, Y.; Piette, J. **NF- $\kappa$ B activation by double-strand breaks.** *Biochemical Pharmacology* 2006; 72(9): 1132-1141.
- Hantke, B.; Lahmann, C.; Venzke, K.; Fischer, T.; Kocourek, A.; Windsor, L.J.; Bergemann, J.; Stäb, F.; Tschesche, H. **Influence of flavonoids and vitamins on the MMP- and TIMP expression of human dermal fibroblasts after UVA irradiation.** *Photochemical & Photobiological Sciences* 2002; 1(10): 826–833.
- Hartree, E.F. **Determination of proteins: a modification of Lowry methods that give a linear photometric response.** *Analytical Biochemistry* 1972; 48(2): 422-427.
- Heelis, P.F. **The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines).** *Chemical Society Reviews* 1982; 11: 15-39.
- Helleday, T.; Arnaudeau, C.; Jenssen, D. **Effects of carcinogenic agents upon different mechanisms for intragenic recombination in mammalian cells.** *Cancerogenesis* 1998; 19(6): 973- 978.
- Henry, R.L.; Schmolka, I.R. **Burn wound coverings and the use of poloxamer preparations.** *Critical Reviews in Biocompatibility* 1989; 5: 207-220.
- Hu, Y.; Benedict, M.A.; Wu, D.; Inohara, N.; Nunez, G. **Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation.** *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America* 1998; 95(8): 4386–4391.
- Huang, T.T.; Feinberg, S.L.; Suryanarayanan, S.; Miyamoto, S. **The zinc finger domain of NEMO is selectively required for NF- $\kappa$ B activation by UV radiation and topoisomerase inhibitors.** *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22(16): 5813-5825.
- Huang, T.T.; Miyamoto, S. **Postrepression activation of NF $\kappa$ B requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I $\kappa$ B $\alpha$ .** *Molecular and Cellular Biology* 2001; 21(14): 4737–4747.
- Hussein, M.R. **Ultraviolet radiation and skin cancer: Molecular mechanisms.** *Journal of Cutaneous Pathologies* 2005; 32: 191-205.
- Hustad, S.; Ueland, P.M.; Scheneede, J. **Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection.** *Clinical Chemistry* 1999; 45(6): 862-868.
- Hvidt, S. **Pressure- and temperature-dependent micellization of a poly(ethylene oxide) - poly(propylene oxide) triblock copolymer in aqueous solutions.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1996; 112(2-3): 201-207.
- ICI Catalog, ICI Surfactantes, 1992.
- Iovine, B.; Nino, M.; Irace, C.; Bevilacqua, M.A.; Monfrecola, G. **Ultraviolet B and A irradiation induces fibromodulin expression in human fibroblasts in vitro.** *Biochimie* 2009; 91(3): 364-372.
- Israel, A. **The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B?** *Trends Cell Biology* 2000; 10(4): 129–133.
- Jagannath, C.; Sepúlveda, E.; Actos, J.K.; Luxem, F.; Emanuele, M.R.; Hunter, R.L. **Effect of poloxamer CRL-1072 on drug uptake and nitric-oxide-mediated killing of *Mycobacterium alium* by macrophages.** *Immunopharmacology* 2000; 48(2): 185-197.
- Karin, M.; Ben-Neriah, Y. **Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF $\kappa$ B activity.** *Annual Review of Immunology* 2000; 18: 621–663.
- Kaufmann, S. H.; Hengartner, M. O. **Programmed cell death: alive and well in the new millenium.** *Trends in Cell Biology* 2001; 11(12): 526-534.

- Koceva-Chyla, A.; Wieclawska, B.; Józwiak, Z.; Bryszewska, M. **Combined effect of low-power laser irradiation and anthraquinone anticancer drug aclarubicin on survival of immortalized cells: comparison with mitoxantrone.** *Cell Biology International* 2006; 30(8): 645-652.
- Koivukangas, V.; Kallioinen, M.; Autio-Harminen, H.; Oikarinen, A. **UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo.** *Acta Dermatovenereologica* 1994; 74(4): 279-282.
- Kulms, D.; Schmarz, T. **Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis.** *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 2000; 16(5): 195-201.
- La Rochette, A.; Silva, E.; Birlouez-Aragon, I.; Mancini, M.; Edwards, A. M. and Morlière, P. **Riboflavin photodegradation and photosensitizing effects are highly dependent on oxygen and ascorbate concentration.** *Photochemistry and Photobiology* 2000; 72(6): 815-20.
- Lee, B.J.; Lee, T.S.; Cha, B.J.; Kim, S.H.; Kim, W.B. **Percutaneous absorption and histopathology of a poloxamer-based formulation of capsaicin analog.** *International Journal of Pharmaceutics* 1997; 159(1): 105-114.
- Lee, B.R. **Laparoscopic total and partial nephrectomy—the new standard?** *Reviews in Urology* 2003; 5(1): 9-14.
- Lee, H., Zeng, S.X., Lu, H. **UV induces p21 rapid turnover independently of ubiquitin and Skp2.** *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(37): 26876-26883.
- Lewis, D.A.; Qiaofang, Y.; Jeffrey, B.T.; Spandau, D.F. **UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53.** *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19(4): 1346-1353.
- Li, D.; Turi, T.G.; Schuck, A.; Freedberg, I.M.; Khitrov, G.; Blumenberg, M. **Rays and arrays: the transcriptional program in the response of human epidermal keratinocytes to UVB illumination.** *FASEB Journal* 2001; 15(13): 2533-2535.
- Li, N.; Karin, M. **Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF- $\kappa$ B through two distinct mechanisms.** *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(22): 13012-13017.
- Liston, P.; Fong, W.G.; Komeluk, R.G. **The inhibitors of apoptose: there is more to life than Bcl-2.** *Oncogene* 2003; 22(53): 8568-8580.
- Marrot, L.; Meunier, J.R. **Skin DNA photodamage and its biological consequences.** *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008; 58(2): 139-148.
- Massey, V. **The chemical and biological versatility of riboflavin.** *Biochemical Society Transaction* 2000; 28(4): 283-296.
- Mattock, H.; Lane, D.P.; Warbrick, E. **Inhibition of cell proliferation by the PCNA binding region of p21 expressed as a GFP miniprotein.** *Experimental Cell Research* 2001; 265(2): 234-241.
- McConkey, D.J. **Biochemical determinants of apoptosis and necrosis.** *Toxicology Letters* 1998; 99(3): 157-168.
- Mosmann, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
- Murhammer, D.W.; Goochee, C.F. **Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors.** *Biotechnology Progress* 1990; 6(2): 142-148.

- Nocentini, S.; Guggiari, M.; Rouillard, D.; Surgis, S. **Exacerbating effect of vitamin E supplementation on DNA damage induced in cultured human normal fibroblasts by UVA radiation.** *Photochemistry and Photobiology* 2001; 73(4): 370-377.
- OECD guideline for testing of chemicals draft proposal for a new guideline – In vitro 3T3 NRU phototoxicity test.
- Oh, J.; Chung, A.S.; Steinbrenner, H.; Sies, H.; Brenneisen, P. **Thioredoxin secreted upon ultraviolet A irradiation modulates activities of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2004; 423(1): 218–226.
- Okamoto, T.; Schlegel, A.; Scherer, P.E.; Lisanti, M.P. **Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane.** *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(10): 5419–5422.
- Onoue, S.; Tsuda, Y. **Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances.** *Pharmaceutical Research* 2006; 23 (1): 156-164.
- Paavola, A.; Yliruusi, J.; Kajimoto, Y.; Kalso, E.; Washlström, T.; Rosemberg, P. **Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block.** *Pharmaceutical Research* 1995; 12(12): 1997-2002.
- Pacheco-Palencia, L.A.; Noratto, G.; Hingorani, L.; Talcott, S.T.; Mertens-Talcott, S.U. **Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56(18): 8434-8441.
- Patel, H.H.; Murray, F.; Insel, P.A. **G-protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains.** *Handbook of Experimental Pharmacology* 2008; 186: 167-184.
- Pfeifer, G.P.; You, Y.H.; Besaratinia, A. **Mutations induced by ultraviolet light.** *Mutation Research* 2005; 571(1-2):19–31.
- Placzek, M.; Krosta, I.; Gaube, S.; Eberlein-Ko Nig, B.; Przybilla, B. **Evaluation of phototoxic properties of antimicrobials used in topical preparations by a photohaemolysis test.** *Acta Dermato-Venereologica* 2005; 85(1): 13–16.
- Ridley, A.J.; Whiteside, J.R.; McMillan, T.J.; Allison, S.L. **Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis.** *International Journal of Radiation Biology* 2009; 85(3): 177-195.
- Rivlin, R.S.; Shils, M.E.; Sherlock, P. **Nutrition and cancer.** *The American Journal of Medicine* 1983; 75(5): 843-854.
- Rittié, L.; Fisher, G.J. **UV-light-induced signal cascades and skin aging.** *Ageing Research Reviews* 2002; 1(4): 705-720.
- Rodemann, H.P., Bayreuther, K., Francz, P.I., Dittmann, K., Albiez, M. **Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro.** *Experimental Cell Research* 1989; 180(1): 84–93.
- Schmolka, I.R. **Artificial skin. 1. Preparation and properties of Pluronic F-127gels for treatment of burns.** *Journal of Biomedical Materials Research* 1972; 6(6): 571-582.
- Sée, W.A. **Bicalutamide adjuvant to radical prostatectomy.** *Reviews in Urology* 2004; 6(2): 20-28.
- Shaulian, E.; Karin, M. **AP-1 in cell proliferation and survival.** *Oncogene* 2001; 20(19): 2390–2400.

- Shimizu, H.; Banno, Y.; Sumi, N.; Naganawa, T.; Kitajima, Y.; Nozawa, Y. **Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UVB-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells.** *The Journal of Investigative Dermatology* 1999; 112(5): 769-774.
- Shishido, S.M.; de Oliveira, M.G. **Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine.** *Photochemistry and Photobiology* 2000; 71(3): 273-280.
- Shishido, S.M.; Seabra, A.B.; Loh, W.; de Oliveira, M.G. **Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release.** *Biomaterial* 2003; 24(20): 3543-3553.
- Silva, E.; Ugarte, R.; Andrarde, A.; Edwards, A.M. **Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 1994; 23(1), 43-48.
- Soria, G.; Speroni, J.; Podhajcer, O.L.; prives, C.; Gottifredi, V. **p21 differentially regulates DNA replication and DNA-repair-associated processes after UV irradiation.** *Journal of Cell Science* 2008; 121(19): 3271-3282.
- Souza, A.C.S.; Cavagis, A.D.M.; Jucá, M.B.; Ferreira, C.V.; Aoyama, H.; Peppelenbosch, M.P. **Riboflavina: uma vitamina multifuncional.** *Química Nova* 2005; 28(5): 887-891.
- Souza, A.C.; Kodach, L, Gadelha, F.R., Cavagis, A.D.M.; Aoyama, H.; Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V. **A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death.** *Apoptosis* 2006; 11(10): 1761-1771.
- Souza, A.P.; Gerlach, R.F.; Line, S.R. **Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts.** *Dental Material* 2000; 16(2): 103-108.
- Steinbrenner, H.; Ramos, M.C.; Stuhlmann, D.; Sies, H.; Brenneisen, P. **UVA-mediated downregulation of MMP-2 and MMP-9 in human epidermal keratinocytes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 308(3): 486-491
- Suh, H.; Jun, H.W.; Dzimianski, M.T.; Lu, G.W. **Pharmacokinetic and local tissue disposition studies of naproxen following topical and systemic administration in dogs and rats.** *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1997; 18(7): 623-633.
- Suwa, K.; Kimura, T.; Schaap, A.P. **Reactivity of singlet molecular oxygen with cholesterol in a phospholipid membrane matrix. A model for oxidative damage of membranes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1977; 75(3): 786-792.
- Suzuki, T.; Tsuzuku, J.; Kawakami, K.; Miyasaka, T.; Yamamoto, T. **Proteasome-mediated degradation of Tob is pivotal for triggering UV-induced apoptosis.** *Oncogene* 2009; 28(3): 401-411.
- Svobodová, A.; Zdarilová, A.; Walterová, D.; Vostálová, J. **Flavonolignans from Silybum marianum moderate UVA-induced oxidative damage to HaCaT keratinocytes.** *Journal Dermatology Sciences* 2007; 48(3): 213-224.
- Tam, W.F.; Sen, R. **I $\kappa$ B family members function by different mechanisms.** *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(11): 7701-7704.
- Tobiyama, T.; Miyazaki, S.; Takada, M. **Use of Pluronic F-127 gels as a vehicle for percutaneous absorption.** *Yakuzaigaku* 1994; 54: 205-213.
- Thomas, E.; al-Baker, E.; Dropcova, S.; Denyer, S.; Ostad, N.; Lloyd, A.; Kill, I.R.; Faragher, R.G. **Different kinetics of senescence in human fibroblasts and peritoneal mesothelial cells.** *Experimental Cell Research* 1997; 236(1): 355-358.

- Treadwell, G.E.; Cairns, W.L.; Metzler, D.E. **Photochemical degradation of flavins. V. Chromatographic studies of the products of photolysis of riboflavin.** *Journal of Chromatography* 1968; 35(3): 376-388.
- Uren, A.G.; Vaux, D.L. **TRAF proteins and meprins share a conserved domain.** *Trends in Biochemical Sciences* 1996; 21(7): 244-245.
- Volonte, D.; Galbiati, F.; Pestell, R.G.; Lisante, M.P. **Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr14) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase.** *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(11): 8094-8103.
- Volonte, D.; Zhang, K.; Lisanti, M.P.; Galbiati, F. **Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts stress-induced premature senescence upregulates the expression of endogenous caveolin-1.** *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13(7), 2502-2517.
- Xiao-Young, W.; Zhi-Gang, B. **UVB-irradiated human keratinocytes and interleukin-1 $\alpha$  indirectly increase MAP kinase/AP-1 activation and MMP-1 production in UVA-irradiated dermal fibroblasts.** *Chinese Medical Journal* 2006; 119(10):827-831.
- Wang, P.L.; Johnson, T.P. **Sustained-release interleukin-2 following intramuscular injection in rats.** *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 113(1): 73-81.
- Wang, S.; El-Deiry, W. **TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors.** *Oncogene* 2003; 22(53): 8628-8633.
- Wanka, G.; Hoffmann, H.; Ulbricht, W. **Phase-diagrams and aggregation behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous-solutions.** *Macromolecules* 1994; 27: 4145-4159.
- Webster, R.P.; Gawde, M.D.; Bhattacharya, R.K. **Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repairs enzyme activity by dietary riboflavin.** *Cancer Letters* 1996; 98(2): 129-135.
- Weichenthal, M.; Schwarz, T. **Phototherapy: How does UV work?** *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 2005; 21(5): 260-266.
- Wlaschek, M.; Briviba, K.; Stricklin, G.P.; Sies, H.; Scharffetter-Kochanek, K. **Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase.** *The Journal of Investigative Dermatology.* 1995; 104(2): 194-198.
- Yamaoka, S.; Courtois, G.; Bessia, C.; Whiteside, S.T.; Weil, R.; Agou, F.; Kirk, H.E.; Kay, R.J.; Israël, A. **Complementation cloning of NEMO, a component of the I $\kappa$ B kinase complex essential for NF- $\kappa$ B activation.** *Cell* 1998; 93(7):1231-40.
- Yokoyama, M. **Block copolymers as drug carriers.** *Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems* 1992; 9(3-4): 213-248.
- Yuan, C.Q.; Li, Y.N.; Zhang, X.F. **Down-regulation of apoptosis inducing factor protein by RNA interference inhibits UVA-induced cell death.** *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2004; 314(4):1108-1113.
- Zandi, E.; Rothwarf, D.M.; Delhase, M.; Hayakawa, M.; Karin, M. **The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation.** *Cell* 1997; 91(2): 243-252.

## 7. Anexo

### Artigo publicado

**Título:** A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours.

**Autores:** Karla Cristina de Souza Queiroz, Willian Fernando Zambuzzi, Ana Carolina Santos de Souza, Rodrigo Augusto da Silva, Daisy Machado, Giselle Zenker Justo, Hernandes F. Carvalho, Maikel P. Peppelenbosch, Carmen Veríssima Ferreira.

**Revista:** Cancer Letter, 258 (1), 126-134, Dez. 2007.

### Trabalhos em Congresso

Silva R.A., **Machado D.**, Ferreira C.V., Justo G.Z. Inhibition of environmental stresses-induced keratinocytes damage by vitamin B2 and osmolyte. VI International Congress of Pharmaceutical Sciences - Cifarp, Ribeirão Preto, Brasil, 02 a 05 de setembro de 2007.

Duran N., Justo G.Z., Ferreira C.V., Silva R.A., **Machado D.**, Shishido S.M., Teixeira Z., Misset T., den Hertog J. Cellular and molecular approaches to in vitro and in vivo assessment of preliminary toxicological and biological activities of nanomaterials – ICONTOX, Lucknow, Índia, 05 a 07 de fevereiro de 2008.

Silva R.A., **Machado D.**, Souza A.C.S., Ferreira C.V., Justo G.Z.; Aoyama H. The thin line between differentiation and death in keratinocytes: Lessons from oxidative stress-recovered cells. Resumo submetido para apresentação na Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, Águas de Lindóia, Brasil, maio de 2008.

Anjos E.F., **Machado D.**, Nascimento J.M., Aoyama H., Ferreira C.V., Stephen H. Cytotoxicity of Bothrops jararacussu snake venom fractions in fibroblasts and keratinocytes. Resumo submetido para apresentação no 33<sup>rd</sup> FEBS Congress / 11<sup>th</sup> IUBMB Conference - Athenas, Grécia, 28 de junho a 02 de julho de 2008.

**Machado D.**, Silva R.A., Souza A.C.S., Justo G.Z., Aoyama H., Ferreira C.V., Shishido S.M. Mechanism of riboflavin phototoxicity based on inflammation, senescence and apoptosis markers: potential application on photodynamic therapy. Resumo submetido para apresentação na XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Águas de Lindóia, Brasil, 16 a 19 de maio de 2009.

Silva R.A., **Machado D.**, Milani R., Peppelenbosch M.P., Shishido S.M., Souza A.C.S., Ferreira C.V., Galembeck E., Justo G.Z. Phosphokinome profile of human keratinocyte metabolic reprogramming to different stressors. Resumo submetido para apresentação na XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Águas de Lindóia, Brasil, 16 a 19 de maio de 2009.

### **Premiação**

**Machado D.**, Silva R.A., Souza A.C.S., Justo G.Z., Aoyama H., Ferreira C.V., Shishido S.M. Mechanism of riboflavin phototoxicity based on inflammation, senescence and apoptosis markers: potential application on photodynamic therapy. **SBBq Award** da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Aguás de Lindóia, Brasil, 16 a 19 de maio de 2009.