

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

ORLANDO CHIARELLI NETO

EFEITOS DA LUZ UVA E VISÍVEL EM CÉLULAS DA PELE E NO
CABELO

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

15/08/2014

ORLANDO CHIARELLI NETO

**EFEITOS DA LUZ UVA E VISÍVEL EM CÉLULAS DA PELE E NO
CABELO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP) para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Chiarelli Neto, Orlando
C532e Efeitos da luz UVA e visível em células da pele e no cabelo /
Orlando Chiarelli Neto. -- São Paulo, 2014.
186p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Biquímica.
Orientador: Baptista, Mauricio da Silva

1. Fotobioquímica 2. Melaninas 3. Envelhecimento celular
I. T. II. Baptista, Mauricio da Silva, orientador.

574.19121 CDD

Dedicatória:

Dedico aos meus pais, Nilson Chiarelli e Rosa Maria Sperandio Chiarelli, por acreditarem que a transformação começa pela educação.

Aos meus irmãos Nilmar Chiarelli e Nilcéia A. Chiarelli pela admiração e carinho.

A Mirela, mulher maravilhosa em minha vida que me faz acreditar no amor.

Ao Professor Doutor Maurício S. Baptista, orientador e ser humano incrível. Obrigado por acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por criar a vida e por me conceber o privilégio de estar nesse meio para explicar um pouco de sua criação;

Agradeço as críticas pois sem elas não avançamos;

Agradeço muito a Waleska Martins por me ajudar nos experimentos e na elaboração da Tese. Uma amizade criada por Jesus;

Agradeço aos colegas da USP: Ana Claudia, Divino, Adjaci, Christiane, Alexandre, Felipe, Lucas, Nicole, Cleidiane, Cintia, Alex, Angélica, Florêncio, Veridiana, Gabriel, Nayra, Patrícia, Tatiana, Helena, Daniela, Isabel, Michele, Suelen, Tiago, Mariana, Melani, Renan, Alan, Daniela, Andre, Paulo, Tayana, Alessandra, Darlene, a Rosa do bandeijão, a Ilda do Yoga e o Décio por toda ajuda;

Aos meus Professores da USP, UFV e do PUPT;

Agradeço aos funcionários do IQUSP pela atenção e profissionalismo;

À FAPESP pelo financiamento da Bolsa no País (2010/08796-0) e pelos recursos e equipamentos para a pesquisa (FAPESP 2005/51598-7) bem como a Farma Service, CNPq e IQUSP.

Estamos todos conectados uns aos outros. Apenas não nos damos conta. Não existe um “lá fora” e um “aqui dentro”. É tudo um mesmo campo energético.

(John Assaraf)

Domine sua agitação! Só as criaturas calmas podem ser totalmente eficientes. A agitação cansa e produz tudo mal feito. A pressa é inimiga da perfeição. A calma é o segredo daqueles que realizam tudo bem feito. Quanto mais trabalho, maior deve ser nossa calma. Domine sua agitação, permaneça sereno, e tudo lhe sairá bem.

(C. Torres Pastorino)

Preâmbulo

Esta tese versa sobre a interação da luz visível com superfícies biológicas, especificadamente células epiteliais e cabelo. Para facilitar a leitura, nós preparamos uma introdução geral que aborda desde conhecimentos genéricos até mecanísticos/moleculares da interação das células da pele e do cabelo com a luz UV-A/visível e que justifica os objetivos de pesquisa e facilitam a discussão deste trabalho. Os resultados foram organizados em seis capítulos. Todos visam responder questões relacionadas ao tema central, mas com objetivos específicos e desenhos experimentais distintos. O primeiro e o segundo capítulos apresentam os mecanismos de fotossensibilização da melanina e o efeito em cabelo após excitação com luz visível. O terceiro descreve os efeitos destas reações de fotossensibilização da melanina em células epiteliais e o quarto aborda uma estratégia de proteção das células epiteliais contra estas mesmas reações. No quinto capítulo descrevemos os mecanismos da fotossensibilização UV-A que levam à formação de lipofuscina e ativam mecanismos de foto-oxidação no visível. O sexto capítulo relaciona a liberação de citocinas pró-inflamatórias com as doses UV-A. Na conclusão agregamos os novos conhecimentos visando contribuir para o melhor entendimento da interação da luz com as superfícies biológicas.

RESUMO

Chiarelli-Neto, O. **Efeitos da luz UV-A e visível em células da pele e no cabelo.** 2014. 186p.

Tese de doutorado – Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica).
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

A luz solar apresenta ondas eletromagnéticas em ampla faixa espectral, incluindo as regiões do ultravioleta (UV-C, UV-B, UV-A), visível e infravermelho. Cada região interage com a pele de forma dependente da fotofísica e da fotoquímica dos seus respectivos compostos absorvedores. A luz UV-A causa a geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (EROs e ERNs) através da fotossensibilização de moléculas endógenas (co-enzimas de flavina, porfirinas, melaninas). Quando fotossensibilizadores produzem quantidades de EROs e ERNs maiores do que a capacidade celular de supressão destas espécies, caracteriza-se um quadro de desbalanço redox, que causa lesão em biomoléculas como os ácidos nucleicos, lipídeos e as proteínas. Essas lesões podem levar à morte celular ou a outras transformações fenotípicas e genotípicas e também estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Com a finalidade de melhor compreender a dinâmica dos mecanismos de resposta celular após exposição ao UV-A e ao visível, nós caracterizamos inicialmente as propriedades fotofísicas da melanina e detectamos a produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pela fotossensibilização no visível e a supressão desta espécie excitada pela reação do oxigênio singlete com a dupla ligação reativa dos grupos indóis presentes na melanina. Estes processos também foram observados no cabelo e levaram-nos a propor um modelo que explica o efeito da luz visível na estrutura e cor dos cabelos. Demonstramos também que a feomelanina produz mais (30%) $^1\text{O}_2$ do que a eumelanina, que sofre maior modificação na sua estrutura por fotodegradação. O efeito destes processos na pele foi estudado a nível celular. Demonstramos que células epiteliais com maior teor de melanina apresentaram maior geração de $^1\text{O}_2$ que causa lesão no DNA e morte necro-apoptótica após irradiação com luz visível. A foto-oxidação da melanina pela luz visível nos motivou a estudar um pigmento que fosse foto-protetor não somente contra luz UV-B mas também contra luz visível. A pigmentação com Acetil-Tirosina se mostrou atóxica e protetora contra luz UV-B e visível ao contrário do pigmento com tirosina, que se mostrou protetor do UV-B mas tóxico no visível. Este efeito foi relacionado com a localização celular do polímero e não com a estrutura do mesmo. A luz UV-A, por sua vez, promove o acúmulo de lipofuscina dentro dos vacúolos autofágicos de queratinócitos da pele e que também ativa a fototoxicidade pela luz visível. A lipofuscina dentro dos vacúolos autofágicos é foto-oxidada pela luz visível, causando lesão no DNA e morte celular programada tipo II. Doses UV-A que desencadeiam a liberação de citocinas também foram caracterizados.

Palavras-chave: UV-A, visível, EROs, Sinalização, Morte Celular.

ABSTRACT

Chiarelli-Neto, O. **Effects UV-A and visible light on skin cells and hair**. 2014. 186p. Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Sunlight presents electromagnetic radiation over a wide spectral range, including the regions of ultraviolet (UV-C, UV-B, UV-A), visible and infrared. Each region interacts with skin depending on the photophysics and photochemistry of the respective absorbing compounds. UV-A light causes the generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) by photosensitization of endogenous molecules (flavin coenzymes, porphyrins, melanins). When photosensitizers produce amounts of ROS and RNS larger than the cell capacity to suppress these species, a set of redox imbalance, which damages biomolecules such as nucleic acids, lipids and proteins. This damage cause cell death and to other phenotypic and genotypic changes and also stimulates the release of proinflammatory cytokines. In order to better understand the dynamics of the mechanisms of cellular responses after exposure to UV-A and visible light, we initially characterized the photophysical properties of melanin and detected the production of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) by photosensitization in the visible, as well as the suppression of these excited species by reaction of singlet oxygen with the double bonds of the reactive groups presented in the melanin indols. These processes were also observed in hair and led us to propose a model that explains the effects of visible light on the structure and color of hair. We also demonstrated that pheomelanin produces more (30%) $^1\text{O}_2$ than eumelanin, which undergoes a quick change on its structure by photodegradation. The effect of these processes in the skin was studied at the cellular level. We demonstrated that epithelial cells with larger melanin content have stronger generation of $^1\text{O}_2$, which causes DNA damage and necro-apoptotic death after irradiation with visible light. The photo-oxidation of melanin by visible light has motivated us to study a pigment that was not only able to protect against UV-B but also against visible. Pigmentation with Acetyl-Tyrosine proved nontoxic and protective against UV-B and visible light instead of pigmentation with Tyrosine, which shielded against UV-B but showed toxicity in the visible. This effect was associated with the polymer, cell location and not with its structure. UV-A light, in turn, promotes the accumulation of lipofuscin, within autophagic vacuoles of keratinocytes also enabling phototoxicity in the visible light. The lipofuscin within the autophagic vacuoles is fotooxidized by visible light, causing DNA damage and programmed cell death type II. Linear dose of UV-A that trigger the release of cytokines were also characterized.

Keywords: UV-A, Visible, Melanin, ROS, Signaling, Cell death.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A pele	17
1.2 Função fisiológica e doenças	22
1.3 Melanina	24
1.4 Espectro da luz solar	28
1.5 Fotossensibilização	32
1.6 Resposta celular frente a fotossensibilização	35
1.7 Resposta inflamatória frente a fotossensibilização	41
2 OBJETIVO	44
2.1 Objetivos específicos	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Materiais	45
3.2 Equipamentos	47
3.2.1 Equipamentos de Espectroscopia	47
3.2.2 Equipamentos de Microscopia	49
3.2.3 Equipamentos de Cultura Celular	49
3.2.4 Equipamentos de Irradiação	49
3.2.5 Equipamentos de Separação Analítica	53
3.3 Métodos	53
3.3.1 Cultura celular	53
3.3.2 Melanogênese	54
3.3.3 Espalhamento de luz e espectro de massas das melaninas M ⁺ e UM ⁺ extraídas	55
3.3.4 Condições de irradiação	55
3.3.5 Desbalanço redox	56
3.3.5.1 Quantificação da geração de oxigênio singlete em soluções de melanina, amostras de cabelo e em células B16-F10	56
3.3.5.2 Análise de formação de EROs por H ₂ DCFDA	57
3.3.5.3 Quantificação de Glutathione	57
3.3.6 Análise de estresse oxidativo mitocondrial	58
3.3.7 Viabilidade celular	59
3.3.8 Mecanismo de morte celular	61
3.3.8.1 Comprometimento de lisossomos e autofagia	61
3.3.8.2 Comprometimento da mitocôndria e indução de apoptose	65
3.3.9 Dano no DNA genômico de células melano-competentes (M ⁺ e UM ⁺) segundo irradiação sob luz visível	68

3.3.10 Dano no DNA de células após fotossensibilização da lipofuscina gerada por UV-A em células HaCaT	69
3.3.11 Efeitos da foto-ativação da Tarf-Me por luz UV-A	69
3.3.12 Viabilidade celular após foto-ativação da Tarf-Me	71
3.3.13 Citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinase 1	71
3.3.14 Análise estatística	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 Fotossensibilização no visível da melanina em solução	73
4.2 Fotossensibilização no visível da melanina em cabelo	81
4.3 Fotossensibilização no visível da melanina em células epiteliais: Geração de $^1\text{O}_2$ e seus efeitos biológicos	89
4.4 Pigmentação de células B16-F10 sem causar fototoxicidade pela luz visível	103
4.5 Efeitos e mecanismos da luz UV-A em células da pele.	116
4.5.1 Homeostase celular e $^1\text{O}_2$	116
4.5.2 Mecanismo de morte celular	126
4.6 Liberação de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases	147
5 CONCLUSÕES	154
6 REFERÊNCIAS	156
7 CURRICULUM VITAE	179
8 ATIVIDADES DIDÁTICAS	180
9 APRESENTAÇÕES ORAIS	180
10 PRÊMIOS E TÍTULOS	183
11 PUBLICAÇÕES	183
12 ANEXO 1	186

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da pele humana.	17
Figura 2: Representação esquemática dos melanócitos.	19
Figura 3: Representação esquemática do cabelo.	22
Figura 4: Representação esquemática das melaninas. Estruturas da eumelanina e da feomelanina [24].	25
Figura 5: Esquema adaptado para a síntese do grânulo de eumelanina e feomelanina. DQ representa Dopaquinona [27].	27
Figura 6: Espectro da luz solar. Intensidade da irradiação solar e da irradiação que atinge a superfície da terra (www.who.int/uv/publications/UVEffectEffects.pdf) [39].	29
Figura 7: Representação esquemática dos mecanismos de fotossensibilização tipo I e tipo II.	34
Figura 8: Tipos de morte celular.	39
Figura 9: Imagens do gerador UV-A com controle de temperatura e umidade.	51
Figura 10: Espectro de luz visível.	52
Figura 11: Estrutura molecular da riboflavin (A) e do seu acetilado e metilado (B).	70
Figura 12: Espectro de absorção e emissão da melanina SA.	74
Figura 13: Fotodegradação da melanina e geração de oxigênio singlete.	75
Figura 14: Foto-oxidação da melanina.	76
Figura 15: Área do gráfico de emissão de 1O_2 de amostras de melanina (M) em NaOH, H_2O_2 e Uréia.	77
Figura 16: Intensidade de emissão de oxigênio singlete da eumelanina e da feomelanina após irradiação sob a luz visível.	80
Figura 17: Propriedades microscópicas e espectroscópicas de cabelos loiros e pretos.	82
Figura 18: Absorção e propriedades emissivas de fios de cabelo (loiros e pretos) antes e depois de 2 h de irradiação na lâmpada halógena (Figura 10A).	85
Figura 19: Emissão de 1O_2 de amostras de cabelos loiros e pretos excitados a 532 nm.	87
Figura 20: Processos fotofísicos e fotoquímicos em um fio de cabelo sob irradiação que mostra a produção de oxigênio singlete (1O_2) por fotossensibilização após a irradiação com luz visível.	88
Figura 21: Efeito de UV-B e luz visível sobre a viabilidade celular.	90
Figura 22: Pigmentação de células B16-F10.	91
Figura 23: Efeitos da luz UV-B e visível na viabilidade de Melanócitos humano e melanoma de camundongo.	93
Figura 24: Tipos de morte causada pela luz visível em células B16-F10 pigmentadas.	96
Figura 25: Produção de melanina e sua relação com a geração de oxigênio singlete e a fototoxicidade.	97
Figura 26: Ensaio cometa das células B16-F10. O gráfico mostra a OTM das células B16-F10 em função dos tratamentos.	99
Figura 27: Ensaio cometa de bases oxidadas.	101

Figura 28: Pigmentação distinta das células B16-F10.....	104
Figura 29: Melanina UM ⁺ protege as células B16-F10 da irradiação UV-B e visível.....	105
Figura 30: Efeitos da luz visível em células B16-F10 pigmentadas com diferentes protocolos.	107
Figura 31: Ensaio cometa: O gráfico mostra a quantificação da fragmentação do DNA (Olive TailMoment) em células B16-F10 em condições de A a F.	108
Figura 32: Geração de ¹ O ₂ das melaninas M ⁺ e UM ⁺ extraídas das células B16-F10.....	109
Figura 33: Quantificação de melanina, oxigênio singlete e sobrevida celular.	111
Figura 34: Espalhamento de luz ressonante das melaninas M ⁺ e UM ⁺ extraídas das células B16-F10.....	112
Figura 35: Espectro de massa das melaninas M ⁺ e UM ⁺ extraídas das células B16-F10.....	113
Figura 36: Morfologia das células B16-F10 controle e pigmentadas. As imagens mostram as células controle e a pigmentadas (M ⁺ e UM ⁺) em aumento de 100x.	114
Figura 37: Representação esquemática da produção de melanina M ⁺ e de melanina UM ⁺	115
Figura 38: Estrutura e espectro da lipofuscina.....	116
Figura 39: Luz UV-A afeta a sobrevida de células J774 e HaCaT.	118
Figura 40: Efeitos da Luz UV-A na geração de EROs em células HaCaT e J774.	120
Figura 41: Incorporação do derivado da riboflavina Tarf-Me pelas células J774.	122
Figura 42: Luz UV-A é absorvida por moléculas endógenas das células J774.....	124
Figura 43: Luz UV-A é absorvida por moléculas endógenas das células HaCaT.	125
Figura 44: Luz UV-A induz danos em células J774 e HaCaT.....	127
Figura 45: Luz UV-A induz Apoptose em células HaCaT.	129
Figura 46: Luz UV-A induz Autofagia e Necro-autofagia em células HaCaT.	131
Figura 47: Luz UV-A bloqueia o fluxo autofágico em células HaCaT.....	133
Figura 48: Luz UV-A induz mitofagia em células HaCaT.....	136
Figura 49: Luz UV-A e fotossensibilizadores endógenos aumentam a produção de lipofuscina em células HaCaT.....	138
Figura 50: Luz UV-A (6J/cm ²) aumenta a produção de lipofuscina em células HaCaT em presença de Tar-Me.	140
Figura 51: Luz UV-A aumenta a produção de lipofuscina em células HaCaT.....	142
Figura 52: Lipofuscina causa fotodano na sobrevida e no DNA das células HaCaT.	144
Figura 53: Representação esquemática da resposta celular frente as energias UV-A e visível.	146
Figura 54: Luz UV-A induz liberação de Citocinas IL6 e Enzima MMP1 em células HaCaT. ...	149
Figura 55: Liberação de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos J774 murinos irradiados nas doses UV-A.	151
Figura 56: Luz UV-A induz liberação de Citocinas TNF-α e Enzima MMP1 em macrófagos THP1 humanos irradiados nas doses UV-A.	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem das amostras de melanina utilizadas neste estudo.	46
Tabela 2: Raio hidrodinâmico obtido por espalhamento de luz dinâmico de grânulos de melaninas produzidos nos protocolos M ⁺ e UM ⁺	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs – Absorbância

AO – Laranjado de Acridina

ATP – Adenosina Trifosfato

λ – Comprimento de onda

Δ – Calor

DAPI – Dihidrocloreto 4',6'-diamidino-2-fenilindole

DCF – 2', 7'- diclorofluoresceína

IC₅₀ – Índice de Citotoxicidade 50%

DMSO – Dimetilsulfóxido

DHI-5,6-dihydroxyindole

DHICA- 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid

DQ-Dopaquinona

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

FAD – Dinucleotídeo de flavina e adenina

FADH₂ – Forma reduzida da flavina-adenina dinucleotídeo

FMN – Mononucleotídeo de flavina

FS – Fotossensibilizador

¹FS* – Fotossensibilizador em estado eletronicamente excitado singlete

³FS* – Fotossensibilizador em estado eletronicamente excitado triplete

GSH- Glutathiona reduzida

GSSG- Glutathiona oxidada

GPx- Glutathione peroxidase

H₂DCFDA – 2', 7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato

IL1 – Interleucina 1

IP – Iodeto de Propídeo

L DOPA - L-3,4-dihydroxyphenylalanine

LPS- Lipopolissacarídeo

LYS – Lysotracker Green

MTT – Brometo de 3-(4,5,-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NADH – Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PBS – Tampão fosfato de sódio

PUPT – Projeto Universidade Para Todos

SFB – Soro Fetal Bovino

PDT – Photodynamic Therapy

ϕ_{Δ} – Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete

ϕ_T – Rendimento quântico de Triplete

REB – Reparo de Excisão de Base

REN - Reparo de Excisão de Nucleotídeos

RF – Riboflavina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

Tarf-Me – 2,3,4,5-tetraacetil-N(3)-metil riboflavina

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

UFV – Universidade Federal de Viçosa

USP – Universidade de São Paulo

UV – Luz ultravioleta

UV-A – Luz ultravioleta com comprimento de onda entre 320-400 nm

UV-B– Luz ultravioleta com comprimento de onda entre 280-315 nm

UV-C– Luz ultravioleta com comprimento de onda entre 200-280 nm

visível– Luz visível com comprimento de onda entre 400-700 nm

1 INTRODUÇÃO

1.1 A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo histologicamente classificada em três camadas: epiderme, derme e hipoderme [1,2] (Figura 1). Estas camadas possuem células e estruturas extracelulares específicas, que são importantes para a estética e para a defesa do organismo contra microorganismos e contra a irradiação solar [3].

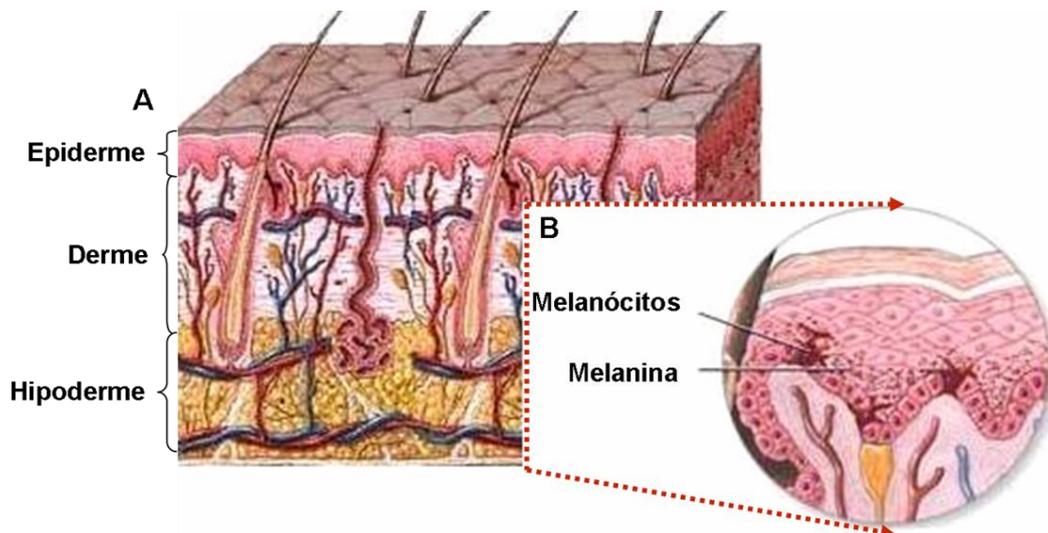


Figura 1: Representação esquemática da pele humana.

Esquema das principais estruturas da Epiderme, Derme e Hipoderme da pele (A). Esquema ampliado da interface derme-epiderme mostrando a membrana basal e os melanócitos produtores de melanina (B). Adaptação de Medline Plus, Medical encyclopedia (2004).

A epiderme é a camada mais externa da pele com espessura média de 0,05 a 1,5 mm. É constituída por um revestimento queratinizado, composto por camadas de células epiteliais estratificadas denominados queratinócitos, os quais se diferenciam a corneócitos anucleados e sem organelas e com citoplasma amplamente queratinizado [4]. Por isso a epiderme é continuamente

renovada pela diferenciação dos queratinócitos a corneócitos, diferenciação esta que envolve também programas específicos de morte celular [5].

As células da epiderme também secretam uma grande variedade de lipídios, peptídeos e proteínas que a protegem contra a invasão de parasitas, injúrias mecânicas e fotoinduzidas. A manutenção e renovação da epiderme depende da fisiologia da derme e da hipoderme (Figura 1), que possuem elementos estruturais e celulares importantes para as funções de proteção estrutural (elastina, colágeno), físico-química (estímulos nervosos), metabólica (vitamina D) e imunológica (apresentação de antígeno) [3,5].

A derme é composta por macrófagos e mastócitos que protegem a pele dos agentes invasores e por fibroblastos, que são células que promovem a síntese e a degradação da matrix extracelular (colágeno e elastina). Bioquimicamente esta camada da pele é composta por glicoproteínas, proteoglicanos, dermatan sulfato, queratan sulfato, heparan sulfato. Estes proteoglicanos estão envolvidos em diversos processos celulares como adesão, migração e diferenciação celular. A derme também possui glândulas secretoras, como as glândulas sebáceas que secretam triglicerídeos e colesterol que agem como lubrificantes e evitam a perda de água da pele [6].

A hipoderme, que é a camada mais profunda da pele, apresenta os adipócitos como tipo celular principal desse tecido e que se arranjam entre os músculos e os ossos encontrados abaixo da pele [1,4]. Além dos adipócitos a hipoderme é composta por um tecido conjuntivo frouxo constituído por fibras colágenas, elásticas e reticulares que preenchem espaços acelulares, apoia e nutre células epiteliais, envolve nervos, músculos, vasos sanguíneos e linfáticos.

Além do revestimento queratinizado, há também na pele humana os melanócitos, que estão presentes na epiderme e nos folículos pilosos (Figura 2).

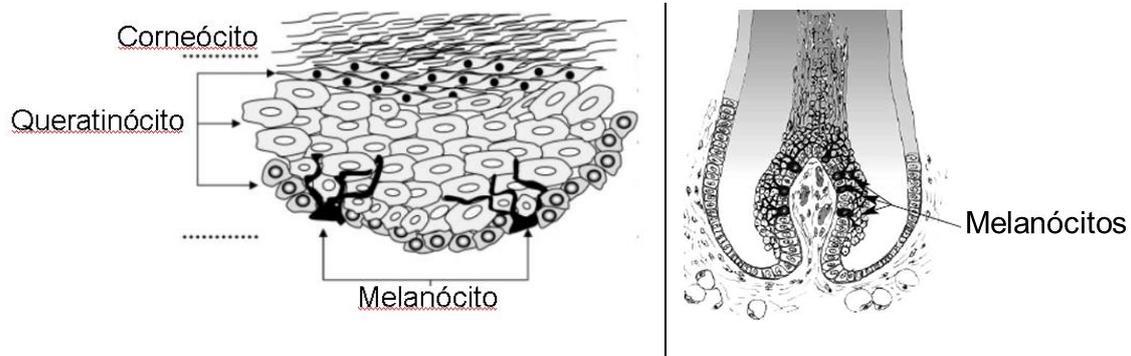


Figura 2: Representação esquemática dos melanócitos.

Melanina produzida pelos melanócitos da epiderme (esquerda) e melanócitos do folículo piloso (direita) [6].

As características básicas dessas células são a capacidade de produção de melanina. O ciclo de vida dos melanócitos é composto de várias etapas, incluindo a diferenciação de melanócitos da crista neural, migração e proliferação de melanoblastos, diferenciação de melanoblastos em melanócitos, proliferação e maturação dos melanócitos nos locais alvo e eventual morte celular (melanócitos de cabelo). A maturação dos melanócitos envolve a ativação de enzimas melanogênicas, estruturação dos melanossomos e finalmente síntese de melanina e transporte para os queratinócitos. Os melanócitos da epiderme e do folículo do cabelo são células que compartilham algumas características comuns, mas, em geral, formam diferentes populações que vivem em nichos exclusivos da pele [7].

A melanina, após ser sintetizada pelos melanócitos, é exportada para regiões superficiais da pele e cabelo, tornando-se visualmente presente. A produção de melanina ocorre em organelas específicas dos melanócitos chamadas de melanossomas. Os melanossomos possuem prolongamentos citoplasmáticos que produzem melanina em quatro estágios distintos de maturação (I, II, III, IV) de acordo com a estrutura, quantidade, qualidade e arranjo da melanina produzida [8,9]. Melanossomos nascentes estão organizados na periferia do núcleo e próximo ao complexo de Golgi que promovem a glicosilação das enzimas dos melanossomas. Os melanossomos em estágio I são esféricos e sem atividade enzimática. No estágio II há atividade da enzima tirosinase com pequena produção de melanina [9]. No estágio III a melanina é arranjada de forma uniforme e no estágio IV o grânulo de melanina é formado e é exportado em grandes quantidades para os queratinócitos da pele [6] e nas estruturas do cabelo.

O caminho bioquímico de formação do pigmento em melanossomas da epiderme e do folículo são similares, mas os melanócitos do folículo de cabelo são mais sensíveis às influências de envelhecimento do que melanócitos epidérmicos, o que resulta em cabelos grisalhos [10]. Parece que esses mecanismos estão relacionados a fatores de crescimento envolvidos com a proliferação de queratinócitos e de crescimento do cabelo [11]. Melanócitos epidérmicos são células de vida longa, enquanto que os melanócitos de cabelos morrem no final do ciclo do cabelo, que tem a duração de 3-8 anos [12].

No cabelo, o processo de melanogênese ocorre apenas durante a fase anágena (fase de crescimento) do ciclo de crescimento do cabelo; formação de

pigmento é desligado na fase catágena (fase de regressão) e ausente na fase telógena (fase repouso) [12]. Além disso, durante a catágena, melanócitos bulbares completamente diferenciados morrem por apoptose, mas novos melanócitos desenvolvem a partir de melanoblastos residentes no cabelo [13,14].

A formação do grânulo de melanina no cabelo começa no folículo podendo ser produzidos também em melanócitos das glândulas sebáceas, e endereçado até o córtex do fio, onde é acumulado em quantidades proporcionais de eumelanina marrom-escura e feomelanina amarelo-vermelho [7]. De maneira geral, os pelos claros e os escuros são compostos por cutícula, córtex e medula. A cutícula de todos os fenótipos de cabelo é constituída principalmente por lipídeos e está localizada na periferia do fio [15]. O córtex e a medula são formados bioquimicamente por microfibrilas de proteína α -queratina constituída por cadeias polipeptídicas com alto teor de pontes de dissulfeto (S-S) provenientes do aminoácido cisteína. Estas pontes formam uma rede tridimensional com alta densidade de ligações cruzadas, proporcionando ao cabelo alta resistência aos danos químicos e mecânicos [16]. Além da α -queratina, é no córtex que os grânulos de melanina são abundantes, cujo tamanho e o tipo caracteriza a cor dos cabelos [17] (Figura 3).

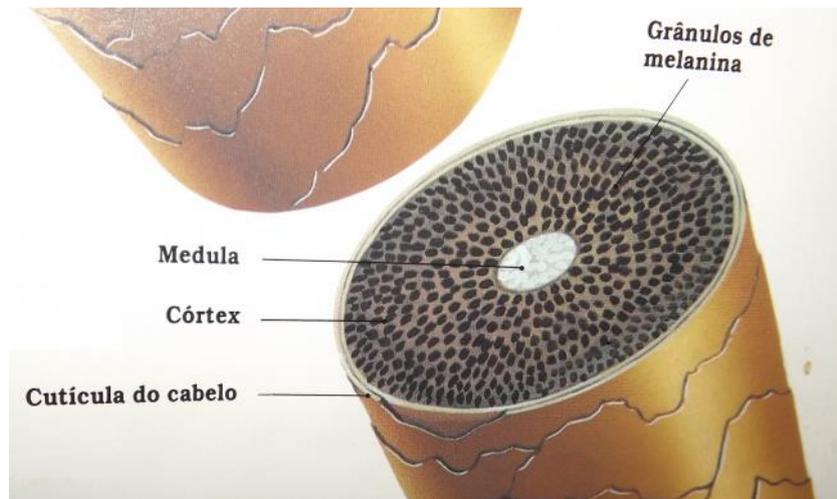


Figura 3: Representação esquemática do cabelo.

Corte transversal de um fio de cabelo humano com a cutícula, córtex, medula e grânulos de melanina. Ciência & Natureza; Corpo humano: pg 47 (1995).

1.2 Função fisiológica e doenças

Embora a pele seja geralmente estruturada em Epiderme, Derme, Hipoderme e seus anexos, todas as três camadas são fundamentalmente importantes para a saúde da pele, por exemplo, realizando a reserva de nutrientes, funções metabólicas (Vitamina D) e sensitivas (terminações nervosas) para proteger os tecidos subjacentes contra agregações biológicas (microorganismos patogênicos) e contra ameaças externas físicas (temperatura e irradiação solar) [3].

Por isso a pele é um importante órgão na clínica de várias doenças ou condições benignas que afetam a ela própria (principalmente), mas também a outros órgãos. Uma das doenças de caráter imunológico que afeta grande parte da população é a Acne - inflamação dos folículos pilosos devido a infecção pela bactéria *Propionibacterium acnes*; A Verruga - lesão neoplásica benigna causada por infecção com *papilomavirus* e o Vitiligo - doença autoimune da pele faz com que determinadas regiões do corpo (começando

geralmente nas extremidades) sofram despigmentação, ficando muito mais clara que a pele normal. Outra doença relacionada a pigmentação é o Melasma - escurecimento da pele devido a hormônios femininos que ocorre sobretudo na gravidez.

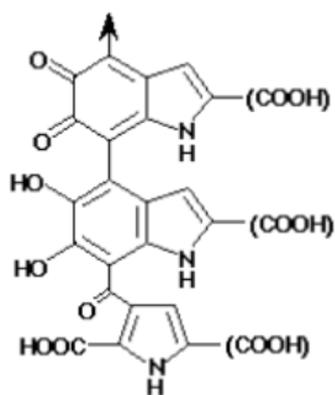
Grande parte das doenças da pele tem relação com o excesso ou falta de exposição ao sol. O melanoma cutâneo é um tumor dos melanócitos da pele que se desenvolve geralmente devido à instabilidade genômica causada pela irradiação UV (irradiação esta que será mais detalhada no tópico a seguir – Espectro da luz solar). Por exemplo, em Portugal surgem, anualmente, cerca de 700 novos casos de melanoma cutâneo e a frequência de melanoma tem aumentado ano após ano nos países ocidentais. No Brasil, além do crescimento da incidência, verifica-se também aumento da mortalidade, mais evidenciado em determinadas subpopulações que o compõem. Melanomas cutâneos mais que triplicaram sua incidência na população do Rio Grande do Sul; as mulheres de Porto Alegre têm tido incidência estimada de 10,32/100.000 habitantes, pouco abaixo das mulheres inglesas, que tem sido 11,2/100.000 [18].

Muito embora esses dados já apontem para a importância dos melanomas cutâneos no cenário dos cânceres no país, a real magnitude do problema não é conhecida, devido sobretudo à ausência de notificação compulsória, à falta de registro central para a neoplasia e à pouca atenção dada, em certos locais, decorrente da baixa incidência da neoplasia em determinadas áreas geográficas com predomínio de indivíduos de pele mais escura [18].

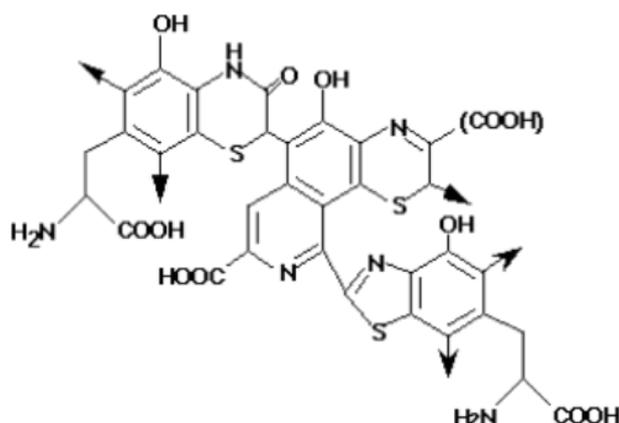
Nota-se que os registros são predominantes nas populações com características de pele tipo I e II (pele clara) [18]. No entanto, a pouca atenção dada a neoplasia em regiões com indivíduos de pele escura pode ser um risco uma vez que estudos têm mostrado que indivíduos com pele tipo IV (pele escura) são estimulados à síntese de melanina sob luz UV-A e luz visível [19–21]. Isso demonstra sobretudo, a necessidade de se investigar não só as respostas das células submetidas à irradiação UV e visível mas também investigar detalhes da identidade estrutural da melanina em sua síntese pelos melanócitos.

1.3 Melanina

A melanina é um polímero derivado do aminoácido L-tirosina, que genericamente é subdividida em dois tipos: eumelanina e feomelanina [21,22]. A eumelanina tem uma coloração tendendo ao marrom escuro até preto e caracteriza a cor escura da pele e dos cabelos. Já a feomelanina é um polímero com coloração avermelhada que fica evidente na pele e cabelo em indivíduos com pouco conteúdo de eumelanina. Ambas melaninas são estruturas ricas em dupla ligações conjugadas e por isso absorvem luz no UV e no visível, atuando como o principal filtro protetor da pele, protegendo especialmente contra os efeitos do UV-B [23] (Figura 4).



Eumelanina



Feomelanina

Figura 4: Representação esquemática das melaninas. Estruturas da eumelanina e da feomelanina [24].

A primeira etapa da síntese da melanina acontece a partir do aminoácido L-tirosina formando L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e é catalizada pela enzima tirosinase [25]. L-DOPA é convertida em Dopaquinona (DQ), etapa que também é catalizada pela tirosinase. DQ é o intermediário comum para as vias eumelanogênicas e feomelanogênicas. Na feomelanogênese a Dopaquinona é conjugada com cisteína e glutatona para produzir Cisteinildopa seguida de Benzotiazinilalanina, para enfim se transformar em Feomelanina (Figura 5). A eumelanogênese envolve a transformação da Dopaquinona a Leucodopacromo, seguido de uma série de reações de oxidorredução com a produção dos intermediários 5-6-dihidroxiindol (DHI) e 5-6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA), que são polimerizados para formar eumelanina [26] (Figura 5).

Existe ainda controvérsia na literatura com relação aos mecanismos de controle na síntese de eumelanina e feomelanina. A hipótese atualmente mais

aceita, considerando a reatividade dos intermediários, é que na ausência de cisteína a eumelanina é sintetizada, mas na presença deste aminoácido, ocorre a síntese da feomelanina. Por isso, a formação do grânulo de melanina começa pela síntese de feomelanina seguido por um envoltório de eumelanina [27] (Figura 5).

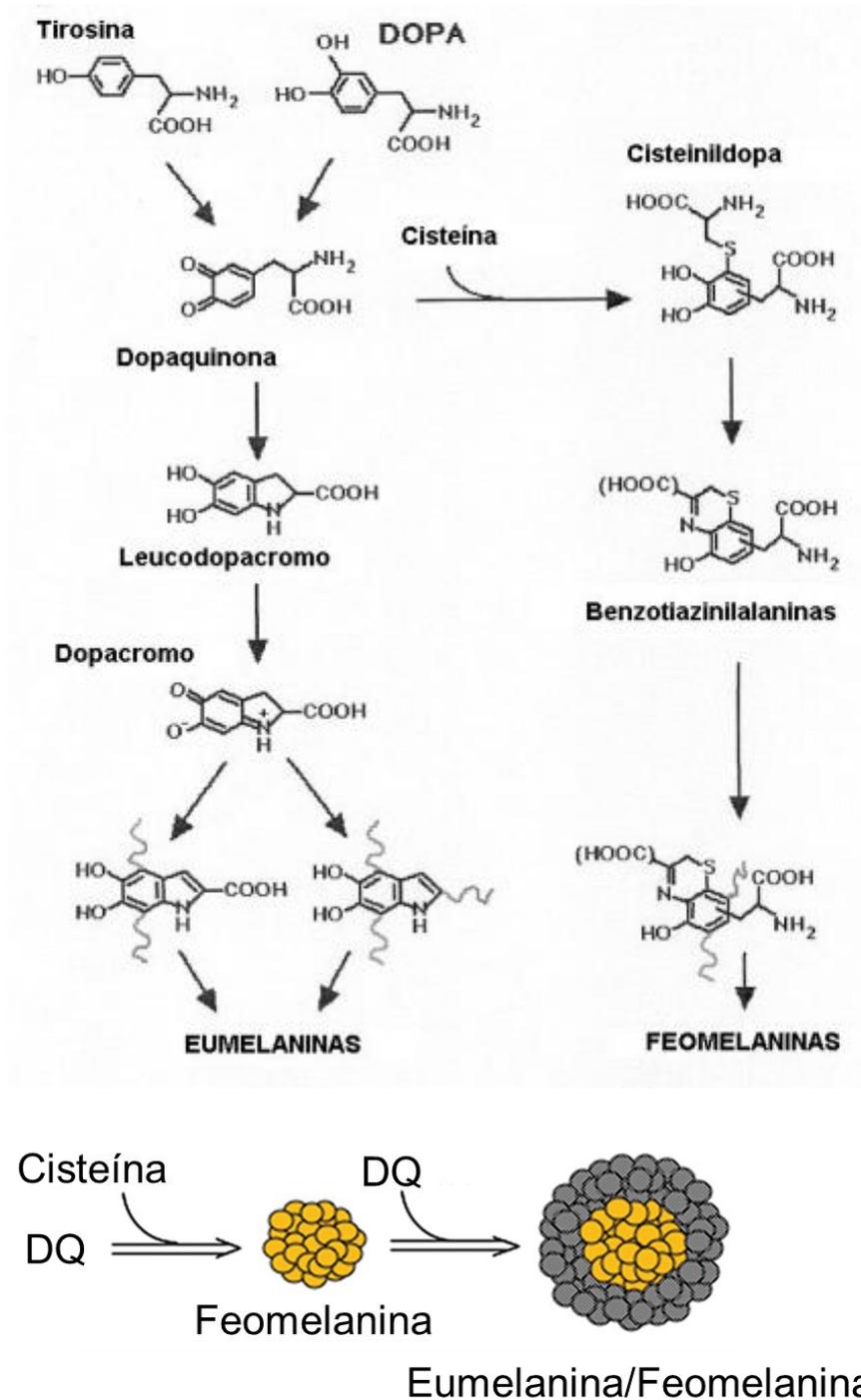


Figura 5: Esquema adaptado para a síntese do grânulo de eumelanina e feomelanina. DQ representa Dopaquinona [27].

Após sintetizada nos melanossomos, a melanina é transferida para os queratinócitos e depositada ao redor do núcleo destas células para proteger o DNA nuclear contra a luz UV-B. As melaninas agem como moléculas de sacrifício, absorvendo a luz UV-B e agindo como filtro protetor [28,29]. Ela também protege o DNA mitocondrial prevenindo a geração de superóxido pela irradiação UV-A [30]. Existe também muita controvérsia sobre os papéis protetores ou causadores de dano da feomelanina, especialmente devido a dados que mostram maior prevalência de câncer de pele em pessoas ruivas, que tem cabelos avermelhados e um balanço de eu/feomelanina que favorece a presença de feomelanina [31].

Embora a melanina seja um polímero protetor contra luz UV, ela possui componentes conhecidos por serem fotoativos. Nofsinger e colaboradores observaram a formação de EROs pela eumelanina irradiada por UV. Eles também identificaram que os grânulos de eumelanina formam agregados que produzem 10 vezes menos radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) do que oligômeros não agregados [32], indicando que moléculas intermediárias de melanina geram espécies reativas de oxigênio [33]. Sugere-se que a geração de espécies reativas por componentes intermediários da melanina estejam envolvidas em sinalização celular. Ao se estimular a pigmentação em células melano-competentes, há indução da parada do ciclo celular, devido à ativação de fatores proteicos 16INK4a e CDK4. Esses se complexam com outras proteínas provocando a perda de atividade de ligação do fator de transcrição E2F, com conseqüente parada do ciclo celular em G0. Esse mecanismo pode

representar uma forma de defesa contra a transformação maligna de melanócitos [34,35]. Assim, a presença de melanina na pele parece ser uma espada de dois gumes: protege melanócitos, bem como os queratinócitos vizinhos da pele através da sua capacidade para absorver a radiação UV, mas a sua síntese em melanócitos resulta em níveis mais elevados de EROs intracelular que pode aumentar a susceptibilidade do melanoma [36]. Isso sugere a necessidade de investigação para se entender a interação da luz com as estruturas da melanina em superfícies (células da pele e cabelo), analisando as demais regiões do espectro da luz solar, especialmente a região espectral do visível.

1.4 Espectro da luz solar

A radiação solar é composta por um espectro contínuo de radiação eletromagnética, que é usualmente dividido em radiação Ultravioleta (200 a 400 nm), visível (400 a 700 nm) e Infravermelho (700 a 900 nm) [37,38]. A Figura 6 mostra os espectros da radiação solar antes de passar pela atmosfera, bem como o espectro que atinge os seres humanos, que tem uma intensidade menor de radiação especialmente na região do ultravioleta com alta energia (UV-C).

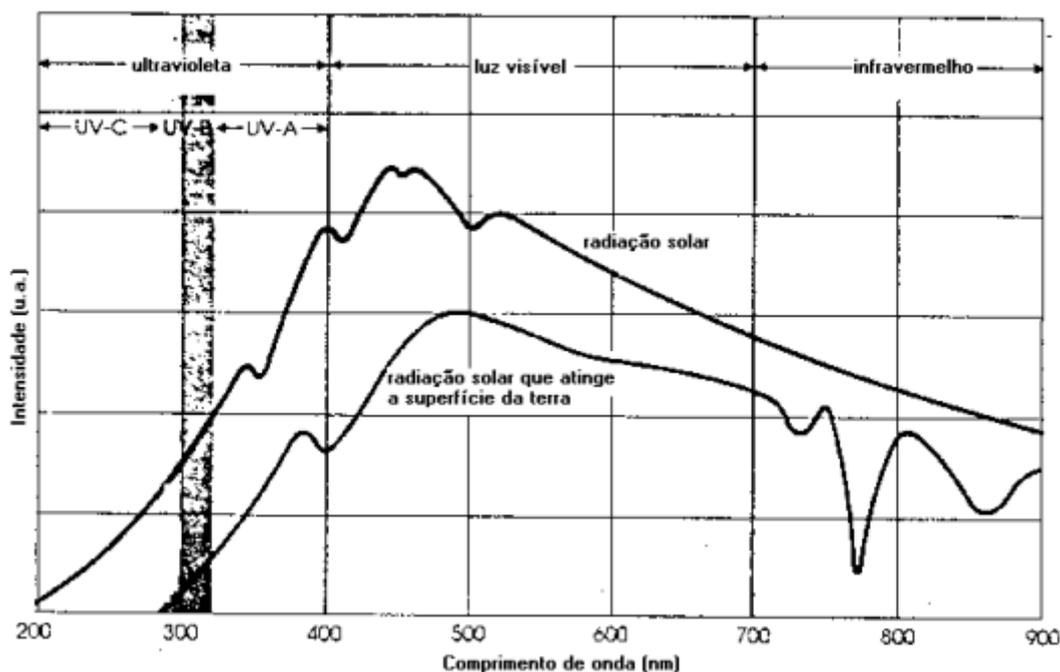


Figura 6: Espectro da luz solar. Intensidade da irradiação solar e da irradiação que atinge a superfície da terra (www.who.int/uv/publications/UVEffects.pdf) [39].

A radiação UV é subdividida em três faixas: UV-C (100-290 nm), UV-B (290-320 nm) e UV-A (320-400 nm) [37]. O UV-C é o mais nocivo, pois por ser mais energético promove a formação de estados excitados mais reativos em uma gama maior de biomoléculas. Praticamente todas as moléculas orgânicas absorvem no UV-C e reagem sem especificidade definida. No entanto, essa energia é absorvida pela estratosfera e não chega à superfície da terra.

A radiação UV-B é absorvida pela melanina e por muitas duplas ligações conjugadas dos ácidos orgânicos e das cetonas contidas em estruturas de ácidos nucleicos (260 nm) e proteínas (280 nm) [40]. Bases nitrogenadas pirimidinas (citosina e timina) são os principais pontos de absorção da luz UV-B. Após excitação eletrônica, pode ocorrer reações fotoquímicas que levam principalmente à formação de dímeros de pirimidina e foto-produtos 6-4, além de outros adutos de DNA que podem ser detectados e reparados pelo sistema

de reparo de DNA. Contudo, caso não seja possível repará-los, há sinalização para senescência ou indução de apoptose [34,35,41]. Em condições de exposição crônica ao UV-B ocorre o acúmulo de mutações (transversão de Citosina para Timina) em genes de reparo (por exemplo a p53), com consequente transformação maligna de queratinócitos normais a carcinoma humano [42].

Embora a radiação UV-B aumenta os riscos de câncer de pele, ela é importante no metabolismo da vitamina D. A síntese da vitamina D começa na pele a partir do 7-dihidrocolesterol (pró-vitamina D3) que por ação da radiação UV-B é transformada na forma ativa vitamina D3 [43]. A ativação da Vitamina D3 ocorre nos queratinócitos e posteriormente é endereçada ao fígado, e por duas hidroxilações forma a vitamina D ativa [44]. A carência de vitamina D geralmente ocorre em locais de altas latitudes, onde há pequena exposição solar [28,45]. Para que haja produção suficiente de vitamina D os indivíduos que moram no hemisfério norte, próximo da latitude 60° a 70° precisam se expor ao sol de corpo inteiro três vezes ao dia [28,43,46–53]. No entanto, devido ao estilo de vida da sociedade atual com a preponderância de atividades ocupacionais e redução do contato com o ar livre, ocorre a redução significativa da exposição solar independentemente da latitude da moradia, fazendo com que a deficiência de vitamina D seja um problema crônico e difundido na sociedade atual [44].

Diferentemente do UV-B, que é diretamente absorvido pelo DNA, a irradiação UV-A atua essencialmente por fotossensibilização (vide no próximo item mais detalhes sobre os processos de fotossensibilização) e gera espécies tripletes, oxigênio singlete (1O_2) e posteriormente, outras espécies radicalares

[54,55]. O UV-A é absorvido por cromóforos naturais da pele como a melanina e as flavinas (vide detalhes no próximo item de fotossensibilização) [19–21]. Além disso, UV-A penetra mais profundamente na derme em comparação com UV-B sendo a principal responsável pelo foto envelhecimento e câncer da pele [41,56,57].

Artigos publicados na década passada atentaram-se à importância da luz UV-A para a indução de tumorigênese na pele [56,57]. No entanto, ainda não é claro a quantidade de espécies reativas geradas pelas doses de luz UV-A que sinalizam para esses efeitos. E por isso, ainda não há um entendimento completo dos mecanismos envolvidos. As doses de luz que permitem uma pele saudável sem risco de foto envelhecimento e câncer são também desconhecidas. Nesse sentido, um dos objetivos desta tese é estudar os efeitos da luz UV-A em função da dose de luz em células epiteliais.

O paradoxo de que a luz UV-A gera espécies reativas ($^1\text{O}_2$) pela excitação da melanina [58] foi mostrado em células de melanoma murino (B16-F10), as quais contêm principalmente melanina como fotossensibilizador endógeno [33].

Nesse modelo biológico, o aumento da síntese de melanina não protegeu DNA contra a irradiação UV-A. Pelo contrário, as células de melanoma B16-F10 com elevado teor de melanina acumularam duas vezes mais 8-hidroxi-dGuanosina após a irradiação UV-A, em comparação às células com baixo teor de melanina [33]. Os autores concluíram nesse estudo que a estimulação da síntese de melanina, mas provavelmente não a melanina em si, aumenta a susceptibilidade das células de melanoma murino à indução pré-mutagênica do DNA oxidado pela luz UV-A [33]. Esses estudos mostraram

também que a parte do espectro visível (azul) também traz efeitos relacionados com danos oxidativos no DNA de fibroblastos irradiados na luz visível [58,59].

Como a melanina absorve tanto na região UV quanto no visível, cabe investigar se a melanina produzida em células de melanoma irradiadas pela luz visível pode também causar danos no DNA. Qualquer composto que absorve luz formando estados eletronicamente excitados pode, a princípio, formar tripletes e outras espécies excitadas características das reações de fotossensibilização. Mesmo as plantas e outros organismos fotossintetizantes, que sobrevivem da luz, têm cromóforos nos centros de reação fotossintético que também absorvem no visível e geram EROs [60].

Em relação à pele humana, foi demonstrado que parte do espectro visível induz a pigmentação em indivíduos com pele escura, classificada como do tipo IV e V [20,21]. No entanto, ainda existem controvérsias acerca dos efeitos da luz visível sobre a pele. Provavelmente, porque não há nenhuma explicação mecanística disponível para os efeitos que foram observados [19]. Assim, outro objetivo desta tese foi estudar, com enfoque mecanístico, os efeitos da luz visível em células epiteliais.

1.5 Fotossensibilização

A fotossensibilização tem como princípio básico a excitação eletrônica de uma molécula, o fotossensibilizador (FS), que uma vez no estado excitado transfere a sua energia para outras moléculas induzindo a formação de outras espécies reativas eletronicamente excitadas e/ou radicalares (espécies reativas de nitrogênio - ERNs e oxigênio - EROs); retornando ao seu estado

fundamental (Figura 7). Dessa forma, a fotossensibilização é um processo em que as moléculas transformam energia luminosa em energia e reatividade química.

Os fotossensibilizadores (FSs) absorvem luz em um comprimento de onda ($h\nu$) específico, e transferem esta energia de excitação para moléculasceptoras através de um fotociclo específico. Inicialmente FSs passam do estado fundamental para um estado eletronicamente excitado singlete ($^1\text{FS}^*$), podendo retornar ao estado fundamental emitindo luz (fluorescência), calor (Δ) ou passar para um estado excitado triplete ($^3\text{FS}^*$), através do Cruzamento Inter-Sistemas (CIS). Por serem reativos e terem tempo de vida relativamente longos, estados tripletes são os principais envolvidos nas reações de foto-oxidação. Fotossensibilizadores no estado triplete podem reagir por dois mecanismos principais: Tipo I, que ocorre através de uma reação de transferência de elétrons com alvos biológicos, produzindo radicais iônicos que interagem com o oxigênio molecular, gerando produtos oxigenados como o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o radical peroxila ($\text{HOO}\cdot$) e o radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$). Este geralmente é formado pela reação do H_2O_2 com o Fe^{2+} através da reação de Fenton [61], gerando o radical $\cdot\text{OH}$. Fotossensibilizadores no estado triplete também reagem pelo mecanismo Tipo II, onde há uma transferência de energia para o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é altamente eletrofílico e reativo [62,63] (Figura 7). Apesar de todos serem tratados usualmente como uma só entidade, cada ERO possui características e capacidades reativas diferentes.

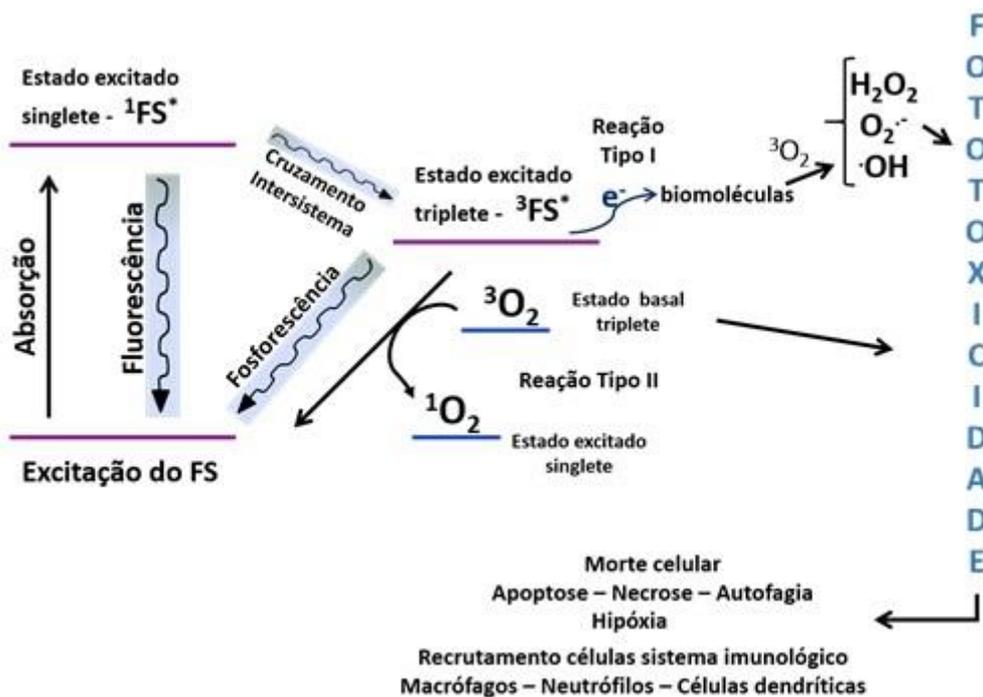


Figura 7: Representação esquemática dos mecanismos de fotossensibilização tipo I e tipo II.

Fotossensibilizadores (FS) são excitados singlete ($^1\text{FS}^*$) e retornam ao estado fundamental emitindo luz (fluorescência, $h\nu'$) ou passam para um estado excitado triplete ($^3\text{FS}^*$). Estados tripletes transferem elétrons com biomoléculas e interagem com o oxigênio molecular gerando radicais como o superóxido (O_2^-) (reação tipo I). Estados triplete transferem energia para o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (reação tipo II). As espécies reativas formadas ativam vias inflamatórias e diferentes tipos de morte celular.

Mecanismos Tipo I e Tipo II podem ocorrer simultaneamente e a relação de velocidade entre os dois processos depende tanto da quantidade e localização dos fotossensibilizadores endógenos das células ou tecido, quanto da concentração de oxigênio molecular [64–67].

Poucas moléculas biológicas absorvem na região UV-A e visível [68]. No entanto, alguns fotossensibilizadores endógenos absorvem nessa região, por exemplo as flavinas e a vitamina B2 [69–71]. Essas reações geram $^1\text{O}_2$ com elevado rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) - número de vezes que as moléculas de $^1\text{O}_2$ são geradas por 100 fótons absorvidos.

As flavinas são excelentes fotossensibilizadores endógenos, com alto rendimento triplete ($\Phi_T = 0,50$) [70]. A riboflavina é um tipo de flavina

encontrada nas células eucarióticas, que ao absorver luz UV-A e visível gera $^1\text{O}_2$ eficientemente ($\Phi_{\Delta} = 0,5$) [72,73]. Dessa forma, as flavinas são consideradas as principais responsáveis pelo efeito da luz UV-A na pele, como o foto-envelhecimento e o câncer [74,75]. No entanto, quando as flavinas são incluídas nos bolsões hidrofóbicos de proteínas, elas são inativas de tal forma que não se sabe ao certo quais flavinas são realmente fotoativas no ambiente intracelular.

A fotossensibilização estimulada pela luz UV/visível pode causar oxidação em biomoléculas (DNA, proteínas e lipídeos) pelas espécies reativas geradas. Para sinalizar uma situação de estresse relacionada à foto-oxidação, existem mecanismos de respostas celulares que utilizam a oxidação para ativar várias vias de sinalização no organismo. A dose de luz e a quantidade de espécies reativas geradas indicam a resposta celular que tentará garantir a homeostase celular.

1.6 Resposta celular frente a fotossensibilização

Muitas respostas celulares e teciduais são decorrentes da exposição ao UV-A e resultam na ativação ou inibição de vias de sinalização, que definem padrões de respostas celulares incluindo diversas alterações na homeostase celular [76–79]. A homeostase celular é mantida em estado estacionário devido a um equilíbrio entre a taxa de formação e desativação das EROs e ERNs. No entanto, se a taxa de produção de radicais livres supera a taxa de supressão dos mesmos, ocorre um desbalanço redox [80]. O desbalanço redox, por sua vez, permite que o $^1\text{O}_2$ e outros EROs/ERNs oxide os aminoácidos cisteína,

histidina, metionina, triptofano e tirosina [81–84] com alterações na atividade enzimática de proteínas envolvidas em sinalização celular [85,86].

A exposição luminosa claramente é um estímulo físico que pode levar ao de balanço redox, uma vez que a quantidade de Eros e Ernst gerada depende da quantidade de luz absorvida. O evento inicial de transformação da luz em geração de espécies reativas é uma reação de fotossensibilização, gerando tripleto e $^1\text{O}_2$, como comentado no item anterior.

As espécies reativas geradas em locais inapropriados ou em quantidade descontrolada, reagem com diversas biomoléculas diminuindo a capacidade de sobrevivência celular. Para dar exemplos, $^1\text{O}_2$ pode oxidar tanto ácidos nucleicos, quanto proteínas e membranas. Ao danificar proteínas altera a atividade das mesmas e pode iniciar processos de sinalização [76,83,84]. $^1\text{O}_2$ também oxida membranas biológicas e forma hidroperóxidos com consequente comprometimento e perda de integridade lateral das membranas celulares [87–89]. Estas mudanças alteram a capacidade da membrana citoplasmática ou de organelas em manter gradientes de concentração citosólica com consequente perda da homeostase celular. Por fim, a geração de $^1\text{O}_2$ também causa lesão no DNA genômico [90,91] por oxidar a base nitrogenada Guanina à 8-oxo-dGuanosina e provocar a substituição da base Guanina para Timina [92,93].

Logicamente, as células possuem estruturas e funções que eliminam ou atenuam os danos causados pelas espécies reativas geradas na fotossensibilização. Esse controle redox é necessário para que as células, ao ativar os processos de sinalização celular, controlem os mecanismos de morte celular de forma programada. De fato, as respostas celulares estimuladas pelas EROs e ERNs são diversas incluindo a modulação da expressão de citocinas e

de fatores de crescimento; alteração no transporte iônico das células; expressão de diversas proteínas de reparo e de indução de apoptose [94].

Para neutralizar o efeito oxidante dessas espécies, as células em seu processo evolutivo desenvolveram diversos sistemas de defesa que podem ser divididos em: (a) prevenção da formação de oxidantes ativos, (b) seqüestro, supressão e remoção de oxidantes ativos, (c) reparo do dano e excreção dos produtos tóxicos de oxidação e (d) respostas adaptativas [95]. As principais enzimas endógenas de defesa antioxidante são: superóxido-dismutase; catalase; glutathione-peroxidase (GSH-Px) e glutathione-redutase (GSH-Red). As peroxiredoxinas (Prx) por exemplo, são uma família de enzimas antioxidantes que se destacam na degradação de diversos peróxidos, como H_2O_2 , peróxidos orgânicos e peroxinitrito. Há também as defesas não enzimáticas que incluem os antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis: ácido ascórbico (vitamina C); glutathione; ubiquinona; vitamina E; retinóides; carotenóides [95,96].

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo constituído de glutamato, cisteína e glicina, que está presente em todas as células animais. A sua importância biológica está no fato de participar do sistema enzimático anti-oxidante (glutathione-peroxidase-redutase) e também de ser uma molécula supressora de radicais livres *per-se*. Ou seja, atua como antioxidante e também como cofator para enzimas redutoras e sinalizadoras [97].

Por ser encontrada abundantemente no organismo, a glutathione pode reagir com espécies reativas [98]. Sendo produto da maioria dessas reações, a glutathione é dimerizada formando pontes de dissulfeto entre os resíduos de cisteína (GSSG). Talvez a atividade antioxidante mais importante da glutathione seja a redução do H_2O_2 a H_2O , participando como cofator das enzimas

Glutathione Peroxidases (GPx) presentes na mitocôndria [99]. Um aumento exagerado de processos oxidativos na célula pode levar ao maior consumo de glutathione resultando na diminuição da relação GSH/GSSG [100,101]. Desta maneira, essa relação pode ser um ótimo parâmetro de desbalanço redox entre grupos sujeitos a estresse oxidativo. Na situação de diminuição acentuada da relação reduzida/oxidada da glutathione, as células sinalizam para a indução de morte celular programada ou não programada (apoptose, autofagia, senescência ou necrose) cujo tipo é ditado pela extensão do dano [97,98].

No caso do desbalanço redox induzido pelo excesso de exposição à luz UV-A, que é a região que tem sido mais estudada com relação à geração de espécies reativas por fotossensibilização, o estresse oxidativo pode induzir danos severos ao DNA levando à instabilidade genômica e à transformação maligna [102,103]. Na tentativa de manutenção da integridade e estabilidade genômica e celular, a apoptose e a autofagia se destacam. Tanto a autofagia quanto a apoptose podem ser iniciadas quando chaperonas moleculares não conseguem rearranjar proteínas mal dobradas e a degradação dos componentes citosólicos não mais é realizada pelos vacúolos lisossômicos [66] (números 1 e 2 da Figura 8), o que pode levar à programação de morte celular autofágica, apoptótica ou induzir senescência.

Na situação brusca de desbalanço redox, o excesso de espécies altamente reativas [104] promovem a oxidação do DNA [76], proteínas [83,84] e lipídeos [89], os quais associados à despolarização e queda do potencial de membrana mitocondrial e à liberação de ATP sinalizam para a morte celular necrótica [42,105,106] (ver número 3 da Figura 8).

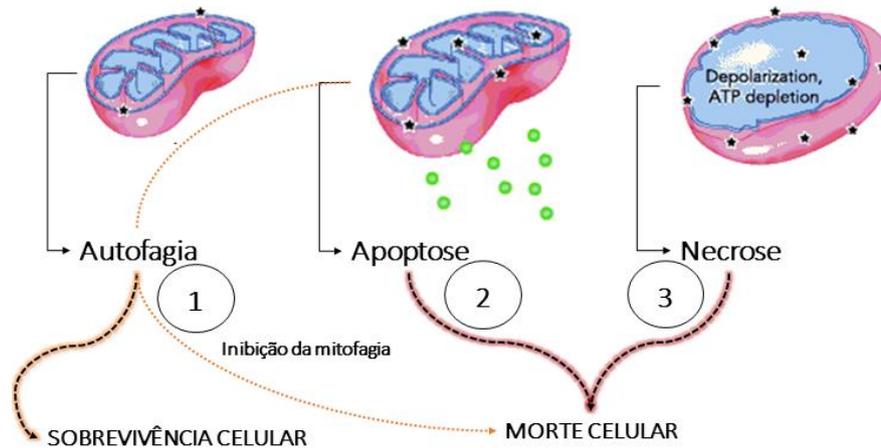


Figura 8: Tipos de morte celular.

(1) Mitocôndrias e moléculas oxidadas são recicladas pela autofagia mantendo a sobrevivência celular. (2) A formação de poros na membrana mitocondrial provoca a liberação de Citocromo C (pontos verdes da Figura), com consequente ativação de morte por apoptose. As mitocôndrias danificadas são acumuladas no processo de autofagia devido à supressão do fluxo autofágico, com consequente morte celular autofágica. (3) A despolarização da membrana e a depleção exarcebada de ATP sinaliza para morte celular necrótica.

A apoptose é um mecanismo em que as células morrem de forma programada, controlando inclusive o processo inflamatório dos tecidos adjacentes [107–109]. A via intrínseca de ativação da apoptose pode iniciar-se com a permeabilização da membrana mitocondrial interna com consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas (Citocromo c, APAF-1), representadas pelas pontuações fora da mitocôndria (Figura 8). Essas por sua vez, promovem a ativação da Caspase-3 ativa, responsável pela ativação do mecanismo de morte apoptótica dependente de caspases [110] (ver número 2 da Figura 8). As caspases pertencem à família das cisteíno-proteases que reconhecem e clivam resíduos de aspartato [111], levando à condensação e fragmentação nuclear e à externalização de fosfolípidios de membrana que sinalizam para fagocitose [112].

Já a autofagia é um dos principais processos biológicos de garantia da homeostase e sobrevivência celular, em resposta a estresses celulares intrínsecos e extrínsecos [113]. Dentre esses estresses extrínsecos, têm-se a luz UV-A que ao ser capaz de danificar lisossomas pelas EROs geradas suprime a autofagia. Nesta situação a homeostase celular fica comprometida [114].

Há indícios de que a supressão autofágica se relacione à inativação de enzimas lisossômicas, tais como a Catepsina B [114]. Em meio a tal supressão lisossomal, a remoção de estruturas oxidadas fica comprometida. O que leva à formação de agregados moleculares no interior de autofagolisossomas, como a lipofuscina [115]. Em consequência disso tudo, há ativação do mecanismo de morte celular programada tipo II (morte autofágica), e ainda indução de senescência celular [71,116,117]. Nesta situação há chance de indução de senescência, que tem sido relacionada ao acúmulo de lipofuscina dentro dos autolisossomos não-funcionais [114,115]. Contudo, muito há ainda a ser elucidado quanto aos mecanismos celulares intrinsecamente ativados nessa condição de lipofuscinogênese aumentada.

A lipofuscina é um pigmento castanho-dourado composto por resíduos de tirosina oxidada a L DOPA (3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina), que além de ser um fotoproduto da irradiação UVA pode ser capaz de aumentar a geração de $^1\text{O}_2$ [71,116,117]. Não seria equivocado imaginar que a lipofuscina fosse fotoativada na região do visível. Já que, por ser um fotossensibilizador similar à eumelanina, absorve a 480nm e 545 nm [118]. Em vigência disso, testou-se também esta hipótese neste trabalho.

Diversos artigos têm demonstrado a indução de morte celular e inflamação induzida por EROs gerados por fotossensibilização na luz UV-A [114,119,120] e visível [20]. No entanto, a literatura carece da conexão entre a magnitude do desbalanço redox, tipo de morte celular e liberação de citocinas pró-inflamatórias.

1.7 Resposta inflamatória frente a fotossensibilização

As vias de sinalização inflamatória são ativadas por moduladores do sistema imunológico. Microorganismos, por exemplo, atuam como ativadores dos processos inflamatórios nas células em geral. Lipopolissacarídeos de parede bacteriana (LPS), são moléculas que estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α além de também promover a liberação intracelular de EROs e ERNs [121]. Esse mecanismo requer a translocação da proteína NF-kB do citoplasma ao núcleo, onde irá se associar aos fatores de transcrição pró-inflamatórios. Mas para que isso ocorra, torna-se necessário a fosforilação do inibidor de NF-kB – ikB. Uma vez dissociado o complexo NF-kB/ikB, o fator NF-kB é direcionado ao núcleo [76,86,122–124].

Outro exemplo de endereçamento nuclear do NF-kB é a geração de EROs e ERNs pela luz UV-A, por meio do processo de fotossensibilização que também estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL6 e TNF- α [76,86,122–124] envolvidos nos mecanismos de morte celular apoptótica, autofágica e necrótica [86,122].

Na pele, a regulação da expressão gênica pró-inflamatória começa na maioria das vezes por espécies reativas formadas por moléculas endógenas

UV-A foto excitadas [125], o que modula a liberação de citocinas IL6 (Wlaschek et al., 1994) e ativação de proteínas MAPK e JNK como tentativa de regulação do estresse oxidativo e manutenção da homeostase celular [102,120]. Há indícios de que o $^1\text{O}_2$ participa diretamente dessa sinalização [126–128]. A sinalização induzida pelo $^1\text{O}_2$ começa com sua formação por fotossensibilização celular e adição a dienos conjugados com resultante formação de endoperóxidos. Estes são convertidos por reações químicas em hidroperóxido e a prostaglandina [129]. A prostaglandina por sua vez é liberada dos rafts de colesterol e fosfolípídeos de membrana, para se ligar ao seu receptor e assim estimular as vias inflamatórias.

Paralelo à indução de morte celular pela sinalização redox, TNF- α estimula a expressão de metaloproteinases (MMP-1 e MMP-9) [130], as quais auxiliam no processo de diferenciação de queratinócitos e remodelagem epidérmica [131].

Contudo, a ativação destas enzimas na derme leva a danos irreversíveis à matriz extracelular, que se torna visível nas pessoas e é chamado de fotoenvelhecimento da pele dependente de $^1\text{O}_2$. Esse processo de fotoenvelhecimento ativa a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos queratinócitos epidérmicos, as quais regulam por via parácrina a produção de colágeno pelos fibroblastos presentes na derme [71,130,132].

O mecanismo parece ter início na mitocôndria através da oxidação de grupos sulfidrilas de proteínas e mesmo da glutatona (GSH) pelas espécies reativas produzidas pelos derivados das riboflavinas. Em vigência do dano mitocondrial fotoinduzido há comprometimento e permeabilidade da membrana mitocondrial formando poros, que liberam citocromo C, dificultando o fluxo da

cadeia transportadora de elétrons, com consequente liberação de ATP [133]. Esse ATP se ligará a receptores purinérgicos de membrana (que são receptores para adenosina e seus nucleotídeos) acoplados a proteína G, resultando na formação de AMP cíclico, responsável pela sinalização celular como segundo mensageiro. Em resposta a essa sinalização há liberação da citocina pró-inflamatória IL6, o que pode levar a morte celular apoptótica e/ou necrótica dependendo da quantidade e tipo de EROs geradas [120,130,133–136].

Embora os mecanismos gerais de sinalização celular induzidos por UV-A estejam bem estabelecidos, tentativas de se prever doses e/ou quantidades de EROs para ativação dos processos de sinalização inflamatória e de morte celular são deficientes principalmente porque não existem relações quantitativas entre os fatores envolvidos. Por isso os mecanismos de fotossensibilização UV-A e visível podem estar correlacionados, sendo a melanina a molécula utilizada para investigar essa hipótese.

2 OBJETIVO

Investigar o papel das reações de fotossensibilização induzidos por luz visível e UV-A em tecidos biológicos superficiais, incluindo células epiteliais (em cultura) e cabelo.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar a fotoquímica da melanina em solução, em diferentes cabelos com diferentes fenótipos e em células de melanoma e melanócitos;
- Caracterizar as consequências da fotossensibilização da melanina para a homeostase celular e danos ao DNA nuclear;
- Correlacionar a dose de luz UV-A com a geração de EROs, liberação de citocinas pró-inflamatórias e indução de morte por necrose, apoptose e autofagia em células HaCaT e J774;
- Investigar se os fotoprodutos químicos gerados pela luz UV-A são fotossensíveis à luz visível;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces (LPFI) localizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP), São Paulo, SP, Brasil.

3.1 Materiais

A água destilada foi obtida em aparelho de vidro e posteriormente purificada por meio de um sistema purificador de água millipore (Milli-Q). D₂O 99%, tirosina, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio Brometo), formaldeído 4% (m/v), digitonina, Na₂EDTA, HEPES, Albumina bovina (BSA), iodeto de propídeo, agarose, diclorofluoresceína hidroacetato (H₂DCFDA), Triton X-100, laranja de acridina, ácido sórbico, diferiprona e as endonucleases de restrição Fpg e Endo III foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA ou Alemanha). Azul de tripan, MitoTracker Red, CM-H₂XRose LysoTracker Green foram adquiridos da Invitrogen (EUA). Etanol, ácido acético, H₃PO₄, cloreto de amônio eram da Labsynth (Brasil). Todos os outros solventes eram de grau espectroscópico. Prolong-DAPI, Soro Fetal Bovino e DMEM foram adquiridos da Qiagen (Brasil). Todos os outros materiais eram de melhor qualidade analítica disponível e foram utilizados como recebidos. Reações imunológicas foram realizadas por Kits ELISA de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e Citocromo C, todos da B&D Systems (EUA); Anticorpo contra a enzima metaloproteinase 1 (MMP1) foi adquirido da *Amershan GE Healthcare* (Reino Unido). Foram usados também anticorpos primário contra caspase-3 (coelho), LC3-II (coelho) e COXIV (rato) de mitocôndria todos comercializados pela *Cell Signaling Technology* (EUA), os anticorpos

secundários anti-coelho marcado com Alexa 546, anti-rato marcado com Alexa-488 e Alexa 633 foram adquiridos da *Molecular Probes* (EUA). Kit Apo-Trace[®] foi usado para a detecção de células apoptóticas por meio do acúmulo da sonda Apo-Trace[®] no citoplasma de células em apoptose (Sigma-Aldrich, EUA).

NaOD foi preparado por três ciclos de dissolução e evaporação do sólido inicial de NaOH (1g) em D₂O (99%). O derivado de riboflavina (Tarf-Me, fotossensibilizador de luz UV-A) foi preparado no laboratório, no trabalho de Tese de Doutorado IQ/USP defendida por Alexandre Vieira Silva.

Amostras de melanina utilizadas nos experimentos foram identificadas com nomes e origens conforme Tabela 1. Eumelanina e feomelanina foram sintetizados como Haywood et al [137] com modificações. Eumelanina IQ/USP foi preparada a partir de L-tirosina (2,5 mg/mL) em tampão de fosfato de pH 7,4 (50 mM) e tirosinase de cogumelo (150 U/mL) em solução de soro albumina bovino (BSA) (5 mg/mL) [137]. Feomelanina IQ/USP foi sintetizada a partir de L-dopa (0,5 mg/mL) e L-cisteína (1,5 mg/mL) em tampão fosfato pH 7,4 (50 mM) e tirosinase de cogumelo (100 U/mL) [137]. As reações foram realizadas à temperatura ambiente sob agitação durante 24 horas. Também foram utilizadas amostras de eumelanina Ito e feomelanina Ito (ver tabela 1) cedidas gentilmente pelo Dr. S. Ito [138,139] do Japão. As amostras de cabelo foram obtidas de voluntários do LPFI – IQ/USP.

Tabela 1: Origen das amostras de melanina utilizadas neste estudo. A letra a indica melanina (Sepia) da Sigma-Aldrich (EUA); A letra b indica melaninas sintetizadas no Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interface do Instituto de Química da USP (Brasil). A letra c indica melaninas sintetizadas no laboratório do professor S. Ito (Japão).

AMOSTRA	ORIGEM	NOMES NA TESE
Melanina ^a	EUA-Sigma-Aldrich®	Melanina S.A
Eumelanina ^b	BRASIL-LPFI-IQUSP	Eumelanina IQUSP
Eumelanina ^c	JAPÃO-Dr S. Ito	Eumelanina Ito
Feomelanina ^b	BRASIL-LPFI-IQUSP	Feomelanina IQUSP
Feomelanina ^c	JAPÃO-Dr S. Ito	Feomelanina Ito

As melaninas sintetizadas em nosso laboratório foram denominadas Eumelanina IQ/USP e Feomelanina IQ/USP. Já as melaninas sintetizadas no laboratório do Professor S, Ito do Japão foram denominadas Eumelanina Ito e Feomelanina Ito (Tabela 1). As amostras de eumelanina IQUSP e as amostras de feomelanina IQUSP foram sintetizadas e acondicionadas em tampão fosfato 50 mM em pH 7,4 conforme Haywood e colaboradores [137]. As amostras de eumelanina Ito e feomelanina Ito foram utilizadas conforme recebidas [140].

3.2 Equipamentos

3.2.1 Equipamentos de Espectroscopia

Espectros de absorção de soluções foram obtidos no UV2401-PC Shimadzu (Japão). Espectros de superfície de cabelos foram obtidos em um espectrofotômetro guiado por fibra ótica (USB-2000; Ocean Optics, Dunedin FL, EUA). Os espectros de fluorescência da melanina e do cabelo foram obtidos em um espectrofluorímetro Spex Fluorolog 1681.

Irradiações no visível (cabelos e soluções de melanina) foram realizadas em um fotoreator caseiro que consistia em uma lâmpada halógena de 4 W

fornecedora de luz unicamente na região do visível (400-800 nm) (ver figura 10A). Os espectros de ^1H RMN foram obtidos a 25°C em um aparelho Bruker DRX500 operando a 500 MHz (10 mg de eumelanina da Sigma-Aldrich foi dissolvido em 0,7 mL de $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOH}$ (pH 10) e espectros foram obtidos antes e após irradiação).

Medições de $^1\text{O}_2$ foram realizadas em um instrumento especialmente concebido para medir emissão resolvida no tempo no infravermelho próximo, que consiste de um laser de Continuum Surelite III (355nm e 532nm, duração de 5 ns, 10 pulsos/s, 1 mJ/pulso), filtro de silício, monocromador, fotomultiplicadora resfriada em nitrogênio líquido (R5509) da Hamamatsu (Bridgewater, NJ, EUA) e um analisador multicanais rápido com 5 ns/canal (MSA-300; Becker & Hickl, Berlim, Alemanha).

Espectros de espalhamento de luz ressonante (ELR) de melaninas extraídas de células melano-competentes (B16-F10) foram realizadas em Espectrofotômetro Cary 50 Bio UV-Visible (Canadá) com abertura de fendas de 2,5 em comprimentos de onda de excitação e emissão em monocromador sincronizado.

Espalhamento de luz dinâmico (ELD) foi realizado nas mesmas condições, utilizando um equipamento Zetasizer nano Series (UK).

Espectrometria de massa foi realizada na central analítica (IQUSP) em um equipamento MALDI-TOF (Franzen Analytik, Bremen, Alemanha) conforme Beltrán-García e colaboradores [141]. A absorção/emissão de células foi quantificada em leitor de placas com monocromador de excitação e emissão (Tecan Infinite 200M EUA). Avaliações de resposta em populações celulares

foram realizadas por citometria de fluxo no equipamento FC500 (Beckman Coulter, EUA).

Leituras de fluorescência foram realizadas com os filtros FL1 de excitação (485 nm) e emissão (520 nm); e FL3 de excitação (545 nm) e emissão (630 nm).

3.2.2 Equipamentos de Microscopia

As imagens microscópicas foram obtidas em microscópio epifluorescente Axiovert 200 (Carl Zeiss, Alemanha). O mesmo conjunto de filtros (λ_{ex} = 362, 488 e 547 nm; λ_{em} =475, 515 e 630 nm) foi utilizado para obter todas as imagens de emissão mostradas. Células aderidas em lamínulas foram montadas em lâminas de vidro, cujas imagens foram obtidas com objetivas de 63X (Plan-APOCHROMAT 63X/1.40 DIC M27 Zeiss™), 40X (C-APOCHROMAT 40X/1.20 Corr M27 Zeiss™). A edição e análise das imagens foi realizada usando-se o software Image J 1.45s (National Institutes of Health).

3.2.3 Equipamentos de Cultura Celular

Os meios de cultivo foram aquecidos em banho maria a 37°C. As células foram manipuladas em fluxo laminar (Bioflux 90 Fitracom, Brasil) equipado com lâmpada germicida UVC e incubadas em estufa (Thermo Electron corporation, EUA) sob temperatura constante de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

3.2.4 Equipamentos de Irradiação

O sistema de irradiação UV-A foi construído pela Empresa Nova técnica e IQ/USP (Brasil), utilizando projeto do LPFI, sendo equipado com sensores para temperatura e umidade. Dentro do equipamento existe um suporte para

instalação de seis lâmpadas de luz UV-A, que iluminam as prateleiras. A disposição entre as prateleiras é de 8 cm de distância. Horizontalmente, o irradiador foi dividido em oito áreas cuja varredura de energia em mW/cm^2 foi medida pelo dosímetro UV-A 365 nm VLX-3.W (França). O dosímetro foi gentilmente emprestado pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck do Instituto de Ciências Biomédicas – USP. A intensidade de potência do espectro do gerador foi de aproximadamente $3,0 \text{ mW}/\text{cm}^2$ e percentagem de emissão dos espectros para as energias UV-B 313 nm (0,05%); UV-A 325 nm (0,05%); UV-A 366nm (98%); visível 405 nm (1,7%) e 430nm (0,2%). A imagem do irradiador, a quantificação da potência luminosa em cada prateleira e o espectro de emissão estão mostrados na Figura 9.

Sistema de irradiação UV-B utilizado para alguns experimentos controle, possui uma plataforma composta por uma lâmpada UV-B ajustada em um suporte metálico coberto por um tecido preto. O espectro de 312 nm foi mensurado a intensidade de potencia $0,714 \text{ mW/cm}^2$ em dosímetro UV-B 312 nm VLX-3.W (França). O sistema de irradiação e o dosímetro UVB também foi gentilmente emprestado pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

O sistema de irradiação no visível para cubeta foi construído no próprio laboratório suportado por uma lâmpada halógenas (ver espectro da Figura 10A). O sistema de irradiação visível para placa de células em cultura também foi construído no próprio laboratório suportado por 8 lâmpadas de intensidade de potência de aproximadamente $3,0 \text{ mW/cm}^2$ e espectro de 400nm a 700 nm (Figura 10B)

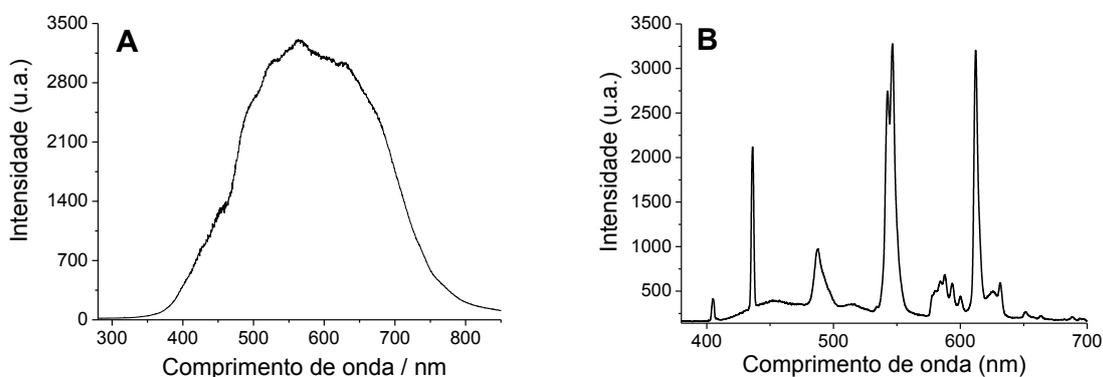


Figura 10: Espectro de luz visível.

O gráfico A mostra o espectro da lâmpada halógena usado para irradiação de melanina em cubeta de quartzo. O gráfico B mostra o sistema de irradiação visível com picos em 405 nm, 450 nm, 488nm, 532nm, 580 nm e 630 nm usados para irradiação de células em cultura. Ambos os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro guiado por fibra ótica (USB-2000; Ocean Optics, Dunedin FL, EUA).

3.2.5 Equipamentos de Separação Analítica

O sistema de cromatografia líquida de alto desempenho utilizado no nosso estudo é um equipamento modular da Shimadzu composto de um degaseificador (modelo DGU-20A5), 2 bombas para mais entrega do solvente (modelo LC-6AD), um forno (modelo CTO-10AS_{VP}), um detector UV-vis (modelo SPD-20A), um coletor de frações (modelo FRC-10A) e um módulo de comunicação (modelo CBM-20A).

3.3 Métodos

3.3.1 Cultura celular

Os tipos celulares utilizados incluíram melanoma cutâneo murino (B16-F10); melanoma cutâneo humano (SKMEL28); cultura primária de melanócitos humanos de caucasóides (HU-USP); queratinócitos normais humanos imortalizados (HaCaT); macrófagos murinos (J774) e humanos (THP1).

O meio RPMI 1640 foi usado em macrófagos J774 e THP1. O meio DMEM foi usado para os demais tipos celulares. Todos os meios foram suplementados com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO/BRL Life Technologies) e solução de penicilina-estreptomicinae antimicótico todos a 1% (v/v). As células HaCaT e J774, THP1 e melanócitos primários foram cedidas pelo Conjunto das Químicas (IQ/USP e FCF/USP) e as células B16F10 foram cedidas pela Professora Doutora Glaucia R. Martinez do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todas as células foram cultivadas sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

3.3.2 Melanogênese

A indução de melanogênese em células de melanoma murino B16-F10 e melanócitos humanos foi realizada conforme Kongshoj e colaboradores [142]. As células foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) após 24 horas em estufa a 37°C e atmosfera 5% de CO_2 , as células foram lavadas com PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,20 g/L, Na_2HPO_4 1,15 g, KH_2PO_4 0,2 g/L). Os substratos para a síntese de melanina intracelular M^+ foram o aminoácido Tirosina (Tyr) 0,5 mM da Sigma-Sigma-Aldrich (Alemanha) e Cloreto de Amônio (NH_4Cl) 10 mM da Labsynth (Brasil) para a síntese da melanina M^+ .

Os substratos para a síntese da melanina intracelular UM^+ foram Acetil Tirosina 0,5 mM, extrato proteico e vitamina B, componentes do produto comercial Unitan[®] da Farma Service (Brasil) e Cloreto de Amônio (NH_4Cl) 10 mM da Labsynth (Brasil).

A melanina de células B16-F10 foi gerada com tratamento das células com aminoácido Tirosina (0,5mM) e NH_4Cl 10 mM, denominada neste trabalho por M^+ . A melanina de células B16-F10 foi gerada com tratamento das células com Acetil Tirosina (0,5mM) + NH_4Cl 10 mM foram denominadas neste trabalho por UM^+ . Em ambas as células, o tempo de incubação para pigmentação celular foi de 48 horas. Melaninas M^+ e UM^+ foram extraídas em NaOD 0,01 M através da lise celular realizada por sonicador Branson Sonifier 450 (EUA) a 20 W por 30 segundos. A quantificação da melanina foi a 470 nm, cuja massa foi normalizada pela quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford [143].

3.3.3 Espalhamento de luz e espectro de massas das melaninas M⁺ e UM⁺ extraídas

As melaninas M⁺ e UM⁺ foram extraídas das células B16-F10, dissolvidas em solução D₂O/NaOD 0,01M. 1uL das melaninas M⁺ e UM⁺ foram adicionados a matriz SA (ácido sinapínico; solução saturada em ácido fórmico 0.1%: acetonitrila 30:70; V/V). 1uL do volume preparado foi aplicado no equipamento. O espectro de massa foi realizado no MALDI-TOF conforme Beltrán-Garcia e colaboradores [141]. No caso dos experimentos de espalhamento de luz dinâmico e ressonante as soluções de melanina M⁺ e UM⁺ foram lidas diretamente nos equipamentos descritos acima.

3.3.4 Condições de irradiação

Todas as células foram irradiadas em presença de 1,0mL de PBS, mantidas em placas com tampa de plástico polipropileno para manter a esterilidade celular. As doses de luz UV-A (ver espectro UV-A da figura 9C) foram 0, 3, 6, 12, 18 e 36 J/cm² em tempo de exposição 0, 15, 30, 60, 90 e 180 minutos, respectivamente. A escolha dessas doses UV-A foram baseadas em energias detectadas nas regiões nordeste e sul do Brasil conforme Tese de Doutorado de André Passaglia Schuch e publicação [39]. As doses de luz visível foram 0, 6, 36 e 72 J/cm² em tempo de exposição 0, 30, 180 e 360 minutos, respectivamente. A irradiação UV-B foi utilizada na dose de 4,5 J/cm² com tempo de exposição de 30 minutos. Houve experimentos que irradiaram-se as células em todas as doses UV-A (0, 3, 6, 12, 18 e 36 J/cm²) e outros experimentos que irradiaram-se células contendo o fotossensibilizador Tarf-Me (derivado da riboflavina) em dose de luz UVA 6 J/cm². Um caso específico de

fotossensibilização foi realizado a fim de se avaliar a fototoxicidade da lipofuscina. Para isso, submeteram-se células HaCaT à irradiação na luz UV-A ($12\text{J}/\text{cm}^2$) sob tempo de exposição de 60 minutos, seguida de incubação em meio DMEM 10% SFB (v/v) por 48 horas a 37°C . Após esse período, a lipofuscina gerada foi fotoativada sob luz visível a ($36\text{ J}/\text{cm}^2$) sob tempo de exposição de 180 minutos. Após irradiação com luz visível as células foram submetidas aos ensaios de viabilidade celular.

3.3.5 Desbalanço redox

3.3.5.1 Quantificação da geração de oxigênio singlete em soluções de melanina, amostras de cabelo e em células B16-F10

A quantificação de $^1\text{O}_2$ foi realizada em amostras de melanina a, b, c (ver tabela 1) e em cabelos preto, castanho, branco, ruivo e loiro (massa de $120 \pm 10\text{ mg}$). Todas as amostras foram ambientadas com solvente D_2O e introduzidas no equipamento de espectroscopia para detecção de $^1\text{O}_2$. Melaninas produzidas pelas B16-F10 (M^+ e UM^+) tiveram a geração de oxigênio singlete medidas diretamente no ambiente celular. As células controle e pigmentadas (M^+ e UM^+) foram suspendidas em tripsina e lavadas com PBS sob centrifugação 4000 rpm por 5 minutos. O precipitado celular foi ressuspendido em solução salina (NaCl 0,9% em D_2O). O espectro de geração de $^1\text{O}_2$ foi realizado a 532nm imediatamente após preparação das amostras. Melaninas M^+ e UM^+ também foram extraídas das células, suspensas em D_2O e as medições dos espectros de $^1\text{O}_2$ foram obtidos no equipamento descrito em equipamentos de espectroscopia (3.2.1).

3.3.5.2 Análise de formação de EROs por H₂DCFDA

A sonda 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato – H₂DCFDA geralmente é oxidada por espécies reativas de oxigênio [144] formando 2',7'- diclorofluoresceína (DCF) que é fluorescente quando excitada a 488 nm [145–148].

Foram plaqueadas 1×10^5 células/mL das linhagens HaCaT e J774 em placas de 12 poços, as quais foram mantidas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Após incubar as células com 10 µmol/L de H₂DCFDA em PBS, as mesmas foram lavadas e irradiadas em PBS sob luz UV-A a diferentes doses (J/cm²). Após a irradiação, as células foram tripsinizadas seguido de sedimentação sob microcentrifugação a 300g a 4°C por 5 minutos. Nas posteriores lavagens em PBS e sedimentações, as células foram mantidas em gelo até a leitura da fluorescência verde com os filtros FL1 de excitação (485 nm) e emissão (520 nm) por citometria de fluxo (Beckman Coulter, EUA). A geração de espécies reativas foi calculada em função da fluorescência do controle não irradiado. Paralelo a esse protocolo, realizou-se também o experimento de análise de oxidação de glutathiona, através da técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) nas mesmas condições de fotossensibilização acima descritas.

3.3.5.3 Quantificação de Glutathiona

Células HaCaT e J774 foram plaqueadas (1×10^5 /mL) em placas de 6 poços, e após 24 horas foram lavadas duas vezes em PBS, para enfim serem irradiadas sob luz UV-A em presença de 1,0 mL de PBS. Após a irradiação, as células foram coletadas em PBS e sedimentadas sob microcentrifugação a 5000RPM durante 5 minutos. A seguir, adicionou-se 0,2 mL de H₃PO₄

concentrado às células, seguido de três ciclos de congelamento (N_2 líquido) e descongelamento (banho-maria a $37^\circ C$). Em seguida, as células lisadas foram sedimentadas sob microcentrifugação a 13.000RPM durante 10 minutos a $4^\circ C$. Por fim, o sobrenadante coletado foi congelado a $-80^\circ C$.

A detecção de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) foi realizada por HPLC [149] sob um fluxo de fase móvel de ácido fórmico 0,1% (v/v), metanol 10% (v/v) em água MQ. A fase estacionária foi detectada a 220 nm em uma coluna C-18. A detecção de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) foi comparado com os picos de GSH e GSSG padrões. As amostras foram normalizadas contra a quantificação de proteínas totais obtidas através do método de Bradford [143].

3.3.6 Análise de estresse oxidativo mitocondrial

O estresse oxidativo mitocondrial UV-A fotoinduzido foi monitorado pela mensuração direta da oxidação da molécula MitoTracker Red CMH₂XRos DND-26 (Molecular Probes®). Em presença de espécies reativas de oxigênio CMH₂XRos é oxidado CMXRos que é um corante catiônico intrinsecamente fluorescente que se liga a nucleófilos presentes no interior da mitocôndria [150].

Os autolisossomas foram monitorados pelo LysoTracker Green (Molecular Probes®) que se acumula em vacúolos ácidos, cuja fluorescência verde é facilmente detectada, usando-se filtros ou laser com parâmetros de excitação a 488nm e emissão a 520nm. Para isso, foram plaqueadas 3×10^5 /mL células HaCaT em lamínulas dispostas em placas de 6 poços as quais foram mantidas por 48 horas a $37^\circ C$ e 5% CO_2 . Células HaCaT foram lavadas em PBS seguido de incubação com MitoTracker Red CM-H₂XRos DND-26 (1,0

$\mu\text{Mol/L}$) e LysoTracker GreenDND-26 ($0,1 \mu\text{Mol/L}$) em tampão PBS por 15 minutos a 37°C e 5% de CO_2 . Após incubação e lavagem, as células foram irradiadas no gerador UV-A. Por fim, as lamínulas foram submetidas à análise por microscopia confocal de varredura à laser, utilizando os parâmetros de excitação a 488 nm e emissão a 505-530 nm para visualização dos vacúolos ácidos (autolisossomas e lisossomas); e excitação a 633 nm e emissão a 651-704 nm para visualização dos processos oxidativos em mitocôndrias.

3.3.7 Viabilidade celular

Fototoxicidade da melanina produzida em células melano competentes (B16-F10 e melanócito humano) foi avaliada em função da dose e fonte de luz. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços por 24 horas a 37°C e 5% CO_2 . Após lavagens em PBS, induziu-se a pigmentação das células melano-competentes a indução da melanogênese M^+ e UM^+ . Em seguida irradiaram-se as células nas doses de luz UV-B (0 e $4,5 \text{ J/cm}^2$) e células nas doses de luz visível (0, 36 e 72 J/cm^2), em presença de 200 μL de PBS. As amostras não irradiadas permaneceram no escuro em PBS. Após irradiação as células receberam meio de cultivo suplementado com SFB a 10% (v/v) e foram incubadas a 37°C em estufa de CO_2 5%. Após 48 horas de incubação, avaliou-se a sobrevivência celular a partir do teste colorimétrico de redução do MTT [151].

As células HaCaT e J774 também foram plaqueadas 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços por 24 horas a 37°C e 5% CO_2 . Em seguida, as células foram lavadas e irradiadas em PBS nas doses de luz UV-A (0 a 36 J/cm^2). As amostras não irradiadas permaneceram no escuro em presença de PBS. Após

o tratamento, as células foram incubadas em meio de cultura suplementado com SFB a 10% (v/v) por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂.

Após incubação, utilizou-se três ensaios colorimétricos MTT, NRU e CVS para avaliar a viabilidade celular, conforme Martins e colaboradores [152]. O ensaio MTT mede a atividade de enzimas mitocondriais (Succinato Desidrogenase e Citocromo C Oxidase) que reduzem o MTT (Brometo de 3-(4,5,-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio, Sigma) a formazan com coloração roxa e absorvância em 550 nm [153]. O ensaio NRU (*Neutral Red Uptake*) avalia a incorporação do vermelho neutro NR (NR) pelos lisossomos de células viáveis cuja detecção foi mensurada pela absorvância em 540 nm. Em caso de indução de autofagia, há maior incorporação de NR por vacúolos autofágicos lisosomotrópicos (autolisossomas), cuja sobrevivência celular obtida pelos ensaios de MTT e CVS possibilita o cálculo da unidade arbitrária de autofagia, conforme proposto por [152]. O ensaio CVS (*Crystal Violet Staining*) que é a marcação citoquímica para avaliar a sobrevivência celular *in vitro*, é dada pela densidade relativa de células irradiadas e não-irradiadas. Esse ensaio é realizado na mesma placa em que se avaliou a sobrevivência por NRU. Assim, após serem lavadas duas vezes com H₂O destilada, as células fixadas no ensaio NRU foram coradas com solução de Cristal Violeta 0,02% (m/v) por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavagem por duas vezes com H₂O destilada e eluição do CV em solução 50% (v/v) de etanol contendo de citrato de sódio 0,1 mMol/L, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Após breve agitação, obteve-se os valores de absorvância a 585 nm com correção de referência a 800 nm [154]. Os ensaios foram realizados em quadruplicadas e foram repetidos em três experimentos independentes.

3.3.8 Mecanismo de morte celular

3.3.8.1 Comprometimento de lisossomos e autofagia

Detecção de autofagia pela estratégia AAU in vitro

Para se mensurar autofagia empregou-se a estratégia de detecção de vacúolos autofágicos pela variável AAU (*Arbitrary Autophagic Units*) [154]. Sumariamente, essa estratégia baseia-se na marcação de vacúolos autofágicos pelo corante lisossomotrópico vermelho neutro (NR), usando-se o ensaio NRU. À medida em que se aumentava a concentração de cloroquina (CQ), uma droga indutora de autofagia, aumentava-se o acúmulo de vacúolos autofágicos sugestivos de autofagia ($Rho = 0,9$ p-valor $<0,00001$). Esse aumento de AAU se correlaciona inversamente com a sobrevivência celular dada por CVS e MTT, indicando que CQ induz morte por autofagia [154].

Segundo essa abordagem, após a indução de autofagia há um acúmulo de NR em autolisossomos ou vacúolos autofágicos tardios em comparação ao controle não-tratado, onde se tem em maior frequência de lisossomos viáveis. Assim, em decorrência da maior incorporação e retenção do NR em vacúolos autofágicos lisossomotrópicos, há uma superestimação da taxa de sobrevivência celular. Ao se normalizar essa taxa pela média das taxas de sobrevivência celular estimadas pelos ensaios CVS e MTT, tem-se a variável AAU que se correlaciona significativamente e linearmente com morte celular autofágica.

Esta abordagem propõe identificar o acúmulo de NR por vacúolos autofágicos ácidos tardios (autolisossomas), os quais representam a fusão entre o autofagossoma e lisossoma na etapa final do processo autofágico [154]. As mesmas condições experimentais citadas no tópico de viabilidade celular foram utilizadas para o cálculo de AAU. Após experimentos de AAU,

células HaCaT e J774 foram irradiadas sob luz UV-A e o experimento de microscopia foi realizado utilizando o laranja de acridina (AO) usualmente empregado como corante vital e para se avaliar o acúmulo de vacúolos ácidos indicativos de morte celular autofágica.

As células HaCaT e J774 foram plaqueadas (3×10^4 células/mL) em placas de 6 poços sobre lamínula por 24 horas. As células foram lavadas e irradiadas em PBS segundo a irradiação sob luz UV-A a diferentes doses (J/cm^2). Após 24 horas, as células foram incubadas por 10 minutos em solução de AO a $1 \mu\text{g}/\text{mL}$. As lâminas foram preparadas em PBS e observadas sob microscópio epifluorescente invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com uma objetiva 40X (C-APOCHROMAT 40X/1.20 Corr M27 Zeiss™). A fluorescência do marcador AO foi detectada usando-se o filtro que promove excitação a 450-490 nm com emissão long pass (LP) de 515 nm. As imagens foram editadas e avaliadas usando-se o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda).

Análise de autofagia por imunofluorescência

As células HaCaT foram plaqueadas em placas de 6 poços (2×10^5 células/mL), contendo uma lamínula em cada poço, e após 24h as células foram irradiadas sob luz UV-A. Posteriormente as células foram lavadas em PBS e fixadas em formaldeído 4 % (m/v) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após consecutivas lavagens em PBS com intervalos de 5 minutos, bloqueou-se as células em solução de PBS contendo soro albumina bovina (BSA) 5% (m/v) e Triton X-100 0,3% (v/v), por 1 hora a temperatura ambiente. Após bloqueio as células foram incubadas com anticorpo primário LC3-II (rabbit monoclonal anti-LC3B, Cell Signaling Technology, 3868S) diluído 1:200 em

PBS contendo 1.0 % (m/v) de BSA (Sigma, A4161) e Triton X-100 (Sigma, X100) 0.3% (v/v) overnight a 4°C. Após lavagem, as células foram incubadas com anticorpo secundário (Alexa 488-goat fluorochrome-conjugated anti-rabbit IgG (H+L), Molecular Probes, A-11008) diluído a 1:500 em solução PBS1x contendo 1.0 % (m/v) de BSA (Sigma, A4161) e Triton X-100 (Sigma, X100) por 2 horas. Lamínulas foram montadas em lâminas de microscópio utilizando os meios de montagem Prolong-DAPI (Molecular Probes, P36935). As imagens foram obtidas por microscopia, usando-se o microscópio confocal Axiovert 200 (Zeiss LSM 510™, Alemanha) equipado com objetiva de 63X (Plan-APOCHROMAT 63X/1.40 DIC M27 Zeiss™). As imagens foram editadas no software Image J (National Institutes of Health, Bethesda). Os filtros de fluorescência foram utilizados para visualizar os núcleos-DAPI (excitação 364 nm / emissão 475nm) e Alexa 488 (excitação 488 nm/emissão 543 nm).

Análise de mitofagia por imunofluorescência de COXIV e LC3-II

Para se avaliar mitofagia, realizou-se o ensaio de imunofluorescência colocalizada para as proteínas de marcação de autofagossoma, LC3-II, e de marcação mitocondrial, COXIV, usando-se microscopia confocal. Para isso, as células HaCaT foram plaqueadas em placas de 6 poços (2×10^5 células/mL), contendo uma lamínula em cada poço, e após 24h as células foram irradiadas sob luz UV-A. A seguir, as células aderidas em lamínulas foram lavadas em PBS e, em seguida, fixadas em solução tamponada de formaldeído a 4% (m/v) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS gelado, em intervalos de 5 minutos. Após o bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente em solução de PBS contendo Triton X-100 a 0,3% (v/v) e Albumina de Soro Bovino 5% (m/v), incubaram-se as lamínulas 12

horas a 4°C em presença dos anticorpos primários monoclonais de coelho anti-LC3-II (rabbit monoclonal anti-LC3B, Cell Signaling Technology, 3868S) e de camundongo anti-COXIV (Complex IV subunit IV monoclonal antibody, Life Technology, A21347), ambos diluídos 1:200 em PBS 1x contendo 1% (m/v) de Albumina de Soro Bovino e Triton X-100 a 0,3% (v/v).

Após o período de incubação do anticorpo primário, lavaram-se três vezes as lamínulas em PBS, seguido de incubação em PBS acrescida de Triton X-100 a 0,3% (v/v) contendo anticorpos secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa-488 e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-633 ambos diluídos 1:500. Finalmente, após três lavagens consecutivas em PBS, com intervalos de 5 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz, montaram-se as lamínulas com Prolong-DAPI para detecção das imagens em microscópio confocal. Os filtros de excitação e emissão de fluorescência utilizados foram os seguintes: para visualizar o marcador nuclear DAPI, 362 nm/475 nm (emissão na cor azul); Alexa 488, 488 nm/520 nm (emissão na cor verde) e Alexa 633, 547 nm/630 nm (emissão na cor vermelha). As imagens foram obtidas como descrito anteriormente.

Quantificação da autofluorescência de autofagolisossomos

As células HaCaT foram plaqueadas em placas de 6 poços (2×10^5 /mL) e após 24 horas, um grupo de células foi irradiado sob luz UV-A (6 J/cm^2) depois de 90 minutos de incubação com Tarf-Me ($100 \mu\text{g/mL}$). Outro grupo celular foi apenas irradiado com luz UV-A (18 J/cm^2). Após 24 e 48 horas de incubação, os grupos celulares foram submetidas à detecção da autofluorescência da lipofuscina por citometria de fluxo (exc 488 nm, e 630nm).

Fotossensibilização da lipofuscina no autofagolisossomo

O ensaio MTT foi utilizado para avaliar se células HaCaT UV-A fotoexcitadas produziam lipofuscina, e se após irradiação sob a luz visível a viabilidade estaria comprometida. Para isso, irradiaram-se células HaCaT na dose UV-A de $12\text{J}/\text{cm}^2$, e após 48 horas de produção da lipofuscina, as células foram submetidas à irradiação sob luz visível a $36\text{J}/\text{cm}^2$. A seguir, o ensaio de MTT foi realizado imediatamente, conforme já descrito.

3.3.8.2 Comprometimento da mitocôndria e indução de apoptose

Detecção de apoptose pela liberação de citocromo c

Células HaCaT foram plaqueadas ($1 \times 10^6/\text{mL}$) e após 24 horas foram lavadas em PBS e irradiadas sob luz UV-A. As células foram lavadas três vezes com PBS gelado e poros na membrana plasmática foram obtidos com solução de digitonina $50\text{ mg}/\text{mL}$ e 100 mM de KCl durante 12 minutos no gelo apenas para abrir poros na membrana plasmática. As amostras dos sobrenadantes foram adicionadas na placa de ELISA sensibilizada com o anticorpo primário monoclonal contra Citocromo C (Human Cytochrome c Quantikine ELISA Kit - B&D Systems EUA). A reação foi parada em solução ácida para leitura de absorbância a 450 nm .

Detecção de caspase 3 em células melano competentes

Para se caracterizar a apoptose empregou-se ensaio de imunofluorescência contra Caspase-3 ativa. Para detecção de Caspase-3 ativa em células B16-F10 (M^+ e UM^+) as células foram plaqueadas, pigmentadas a M^+ e UM^+ e irradiadas sob luz visível ($72\text{J}/\text{cm}^2$). Posteriormente as células foram lavadas em PBS e fixadas em formaldeído 4% (m/v) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após consecutivas lavagens em PBS com intervalos de

5 minutos, bloqueou-se as células em solução de PBS contendo soro albumina bovina (BSA) 5% (m/v) e Triton X-100 0,3% (v/v), por 60 minutos a temperatura ambiente. A seguir, as células foram incubadas por 12 horas a 4°C em câmara úmida com anticorpo primário contra proteína Caspase-3 ativa (leaved Caspase-3 (Asp175, 5A1 Rabbit mA, Cell Signaling Technology, 9664P) e COXIV-mitocôndria (Complex IV subunit IV monoclonal antibody, Life Technology, A21347), diluídos 1:200 em PBS contendo BSA 1,0% (m/v) (Sigma, EUA) e Triton X-100 0.3% (v/v). Após lavagens em PBS com intervalos de 5 minutos, as células foram incubadas por 2 horas com anticorpos secundários (Alexa 543 fluorochrome-conjugated goat-anti-rabbit IgG e Alexa 633 fluorochrome-conjugated goat-anti-mouse IgG), ambos da Molecular Probes (Lige Technology®), diluídos a 1:500 em PBS contendo BSA 1,0% (m/v) e Triton X-100 0.3% (v/v). Após lavagens em PBS com intervalos de 5 minutos, as lâminas foram montadas com Prolong® (Molecular Probes, EUA) para visualização do núcleo celular com DAPI (exc 364 nm). As imagens foram obtidas por microscopia, usando-se o microscópio confocal Axiovert 200 (Zeiss LSM 510™, Alemanha) equipado com objetiva de 63X (Plan-APOCHROMAT 63X/1.40 DIC M27 Zeiss™). As imagens foram editadas no software Image J (National Institutes of Health, Bethesda).

Detecção de caspase 3 em queratinócitos HaCaT

A manipulação das células HaCaT foi idêntica ao item “Análise da autofagia por imunofluorescência” onde as células foram incubadas com anticorpo primário Caspase-3 ativa (leaved Caspase-3 (Asp175, 5A1 Rabbit mA, Cell Signaling Technology, 9664P) diluído 1:200 e anticorpo secundário

(Alexa 488-goat fluorochrome-conjugated anti-rabbit IgG (H+L), Molecular Probes, A-11008) diluído a 1:500.

Foi realizado também em células HaCaT irradiadas sob luz UV-A, o experimento de microscopia utilizando o kit Apo-Trace[®] usualmente empregado para caracterizar morte apoptótica em células com alteração de membrana, cuja fluorescência da sonda Aposense[®] é detectada pelo seu acúmulo no citoplasma [155]. O procedimento celular foi idêntico ao já comentado na microscopia utilizando o laranja de acridina (AO) (item 3.3.8.1), mas aqui foi utilizado Aposense a 50 µg/mL (Apo-Trace[®] Sigma).

3.3.8.3 Comprometimento de membrana e necrose

O tipo de morte celular não programada (necrose) foi avaliado por ensaios fluorométricos, usando-se corante iodeto de propídeo (IP). O marcador IP é incorporado e intercalando no DNA de células que apresentam comprometimento de membrana plasmática. O acúmulo de IP também pode ser visualizado em células em apoptose tardia (necrose secundária), que apresentam permeabilidade de membrana, núcleo aumentado e com condensação de cromatina [156]. Para diferenciá-los, avaliou-se a intensidade de fluorescência mensurada por citometria de fluxo (FACS), assim como alterações morfológicas de células coradas por IP avaliadas por microscopia, para distinção de células mortas.

Células B16-F10 foram plaqueadas, pigmentadas a M⁺ e UM⁺ e irradiadas sob luz visível (72J/cm²). Subsequentemente, as células foram lavadas em PBS e marcadas com IP (5µg/mL) por 10 minutos a 37°C. Após lavagem por duas vezes em PBS, as células foram observadas ao microscópio

epifluorescente invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com uma objetiva 40X (C-APOCHROMAT 40X/1.20 Corr M27 Zeiss™). A fluorescência do marcador IP foi detectada usando-se o filtro que promove excitação a 450-490 nm com emissão long pass (LP) de 515 nm.

Foi realizado também em células HaCaT e J774 irradiadas sob luz UV-A, o experimento de microscopia utilizando o iodeto de propídeo (IP) para distinção de células mortas ou ainda em processo de morte segundo o comprometimento de membrana plasmática e avaliação morfológica nuclear. O procedimento celular foi idêntico ao já comentado na microscopia utilizando o laranja de acridina (AO) (item 3.3.8.1) mas aqui foi utilizado IP a 1 µg/mL.

3.3.9 Dano no DNA genômico de células melano-competentes (M⁺ e UM⁺) segundo irradiação sob luz visível

As células B16-F10 foram plaqueadas, pigmentadas a M⁺ e UM⁺, seguido de irradiação sob luz visível (36J/cm²) em tampão PBS. 30 µL de uma suspensão 1x10⁵ células foi misturado com 100 µL de agarose LMP (0,5% em PBS), distribuída em placas que foram pré-revestidas com agarose LMP (1,5% em PBS) e deixadas em repouso em uma bandeja com gelo. Após solidificação, as células foram lisadas no escuro em um tampão de sal de alta alcalinidade (2.5 mol L⁻¹ NaCl, 0.1 mol L⁻¹ EDTA, 0.01 mol L⁻¹ Tris, 1% Triton X-100, pH 10) durante 12 horas.

Após incubação das lâminas em tampão de lise, elas foram tratadas com 0,2U das enzimas Fpg e Endo III (Sigma-Sigma-Aldrich EUA) em tampão de enzima (0,1 Mol/L de KCl, 0,5m Mol/L de Na₂EDTA, 40 mMol/L de Hepes e 0,2 mg/mL BSA, pH=8,0) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente as lâminas foram

colocadas em tampão de eletroforese 4°C no escuro por 30 min. A eletroforese foi realizada em câmara escura, em um Power Supply – ESP 301 (GE) contendo o mesmo tampão, por 30 min a 25 V. Depois da eletroforese, as placas foram neutralizadas em tampão de neutralização e fixadas em etanol. O DNA foi corado com brometo de etídio (10 µg/mL) e as lâminas foram observadas em aumento de 400X sob excitação a 515 nm em microscópio de fluorescência (OLYMPUS BH-2) usando software Komet 5.1. Foram analisadas 100 células de cada amostra e três experimentos independentes.

3.3.10 Dano no DNA de células após fotossensibilização da lipofuscina gerada por UV-A em células HaCaT

As células HaCaT foram plaqueadas (2×10^5 células/mL) em lâmina de vidro. Após incubação por 24 horas, as células foram irradiadas em PBS sob luz UV-A a 12 J/cm^2 para produção de lipofuscina, e após 48 horas as células foram irradiadas sob luz visível a 36 J/cm^2 . O ensaio cometa aqui foi realizado conforme item 3.3.9.

3.3.11 Efeitos da foto-ativação da Tarf-Me por luz UV-A

Para se estudar o impacto da fotossensibilização de flavinas endógenas, relacionando os efeitos da radiação UV-A sob queratinócitos *in vitro*, optou-se por incorporar em células, um derivado de riboflavina (Figura 11A) denominado Tarf-Me (Figura 11B) sintetizado para a Tese de Doutorado IQUSP de Alexandre Vieira Silva.

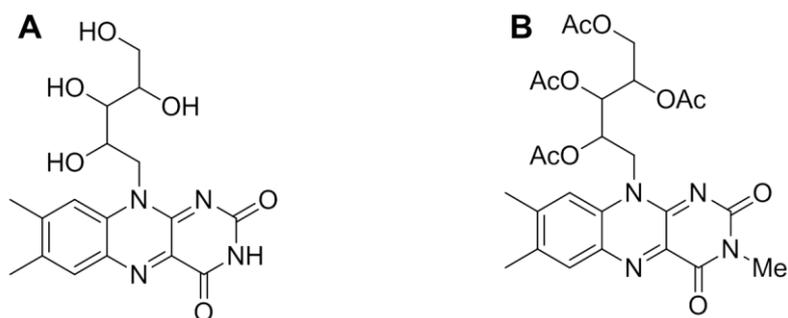


Figura 11: Estrutura molecular da riboflavia (A) e do seu acetilado e metilado (B). A estrutura da molécula B é denominada Tetra Acetil Riboflavina metilado (Tarf-Me).

A principal diferença é que na Tarf-Me há a substituição de 5 hidrogênios de hidroxila por grupos acetato e conseqüentemente a molécula fica bem mais lipofílica [157]. Além disso o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel foi substituído por um grupo metila. Dados da literatura mostraram que o derivado Tarf-Me é mais fotoestável do que a riboflavina [158]. Os máximos de absorção da Tarf-Me correspondem as regiões do UV-A (344nm) e visível (466 nm), confirmando a sua natureza de fotossensibilizador endógeno na região do UV-A e visível. O comprimento de onda máximo de emissão em água é 524 nm e o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete de 0,58.

As células HaCaT e J774 foram plaqueadas em placas de 6 poços (2×10^5 /mL) e após 24h as células foram administradas com Tarf-Me (100 μ g/mL) dissolvida em 5% de DMSO e diluída em meio DMEM 1% (v/v) de Soro Fetal Bovino. As células foram incubadas por 90 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Espectros de absorção de 350 a 600 nm e microscopia de fluorescência $\lambda_{ex} = 488$ nm; $\lambda_{emiss} 515$ nm foram utilizados para detecção de incorporação da Tarf-Me no ambiente intracelular. Para verificação da geração de ¹O₂ pela Tarf-Me incorporada, lavaram-se as células em PBS, e o ¹O₂ foi detectado sob

excitação 355nm em solução salina 0,9% em D₂O. O espectro de intensidade de ¹O₂ foi obtido no equipamento descrito acima e foi normalizado pela contagem das células em azul de tripan após leitura de sinal de ¹O₂. Para investigar se a Tarf-Me não somente gera ¹O₂ mas também radicais livres, realizou-se a fotossensibilização de Tarf-Me na presença de Ácido sórbico 20 µMol/L, que protegia também os efeitos de ¹O₂, e de um quelante de ferro Diferiprona 30 µMol/L que protegia também os efeitos de radicais livres [159].

3.3.12 Viabilidade celular após foto-ativação da Tarf-Me

Após preparar Tarf-Me (100µg/mL) dissolvida em 5% de DMSO e diluída em meio DMEM 1% de Soro Fetal Bovino, foi acrescentada distintamente o Ácido sórbico e a Diferiprona. As células foram incubadas por 90 min, lavadas com PBS e irradiadas sob luz UV-A (6J/cm²). A viabilidade celular, o comprometimento do fluxo autofágico e a presença de lipofuscina foram avaliados como descrito acima.

3.3.13 Citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinase 1

Sobrenadantes das células HaCaT, J774 e THP1 foram coletados seis horas pós a irradiação sob luz UV-A (0 a 36J/cm²) para o ensaio de ELISA de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β e IL-6) (B&D Systems, EUA) e enzima metaloproteinase 1 (MMP1) (Amershan GE Healthcare, Reino Unido). A reação foi parada com uma solução ácida para leitura de absorbância a 450 nm. Citocinas e MMP1 foram normalizadas pela dosagem de proteína total através do método de Bradford [143] e contagem de células com azul de tripan após a coleta dos sobrenadantes.

3.3.14 Análise estatística

Os parâmetros médios foram comparados entre os grupos segundo o teste de variância (ANOVA), usando-se o software Origin 7.5. Consideraram-se comparações entre grupos com significância estatística, aquelas cujas p-valores foram menores ou iguais a 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fotossensibilização no visível da melanina em solução

Melanina é um cromóforo que absorve radiação eletromagnética no UV e no visível e como tal, pode ser responsável pelos efeitos da luz visível em superfícies biológicas. Desta forma, iniciamos este trabalho caracterizando as propriedades fotofísicas da melanina, especificadamente a absorção e a emissão luminosa e a geração de oxigênio singlete. As amostras de melanina utilizadas nessa seção foram de diversas fontes. Na Tabela 1 (materiais e métodos) a fonte e a nomenclatura empregada nesta tese foram definidas. Detalharemos na legenda da figura qual melanina foi utilizada em cada caso. Note que a melanina SA apresenta absorção (Figura 12A) e fluorescência (Figura 12B) que se estende por toda a região do visível, como já havia sido descrito anteriormente [160]. Um outro dado interessante é que o máximo de emissão altera-se com o comprimento de onda de excitação, conforme correlação entre o comprimento de onda de excitação e o de emissão máxima observada no gráfico D da figura 1 do artigo em anexo [160]. Porque a melanina não é uma molécula simples com estrutura única, não se espera que tenha um espectro de absorção/emissão bem definido. Explica-se assim, o espectro de absorção sem bandas bem resolvidas apresentado na figura 12. De fato, espera-se que a melanina (incluindo os vários tipos de melanina em diferentes estádios de maturação) tenha várias espécies absorventes e emissores de luz, semelhantes a outras substâncias complexas encontradas na natureza, tais como petróleo [161].

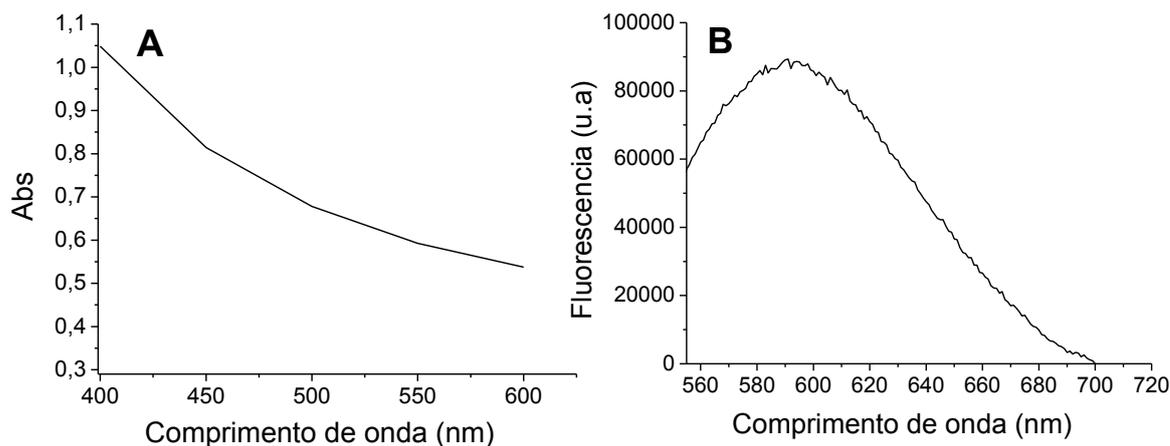


Figura 12: Espectro de absorção e emissão da melanina SA.

(A) Espectro de absorção e (B) espectro de Fluorescência da melanina SA em NaOH 0,01M a 25°C com excitação em 532 nm.

Para caracterizar as possíveis modificações químicas que ocorrem na melanina, estudaram-se as alterações na absorção de amostras de melanina SA na presença de oxigênio e após purga com argônio (baixas concentrações de oxigênio), durante irradiação com luz visível (Figura 13A). Note que ocorre diminuição significativa na absorção da amostra que foi equilibrada com ar e esta alteração está ausente na amostra purgada com argônio, mostrando que a fotodegradação da melanina depende do oxigênio molecular. É importante notar que na presença de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) observa-se a formação de uma quantidade substancial de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) na amostra excitada a 532 nm. Aqui, nós estamos mostrando pela primeira vez a geração de $^1\text{O}_2$ em melanina fotoexcitada em luz visível (Figura 13B).

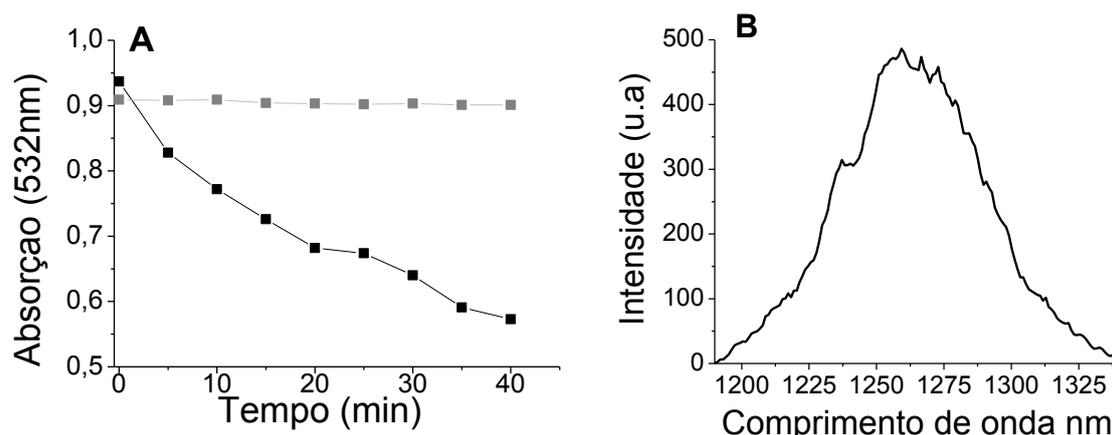


Figura 13: Fotodegradação da melanina e geração de oxigênio singlete.

A: Absorção ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) de soluções de melanina SA (Sigma-Aldrich) (0,3 mg/mL) em D_2O ([NaOD] 0,01 M) irradiadas com luz branca halógena na dose 10 J/cm^2 (ver espectro da Figura 10A). Na linha de pontos cinzas, o argônio foi purgado durante 20 minutos (■). Na linha de pontos pretos, a melanina estava equilibrada com o ar (■). As medidas foram realizadas no mesmo dia da preparação da amostra. B: Espectro de detecção de oxigênio singlete (1270 nm) da solução de melanina SA equilibrada com ar em igual concentração do gráfico A.

Na tentativa de identificar a alteração química que leva ao fotobranqueamento da melanina em solução, realizamos experimentos de RMN de 1H em soluções de melanina, antes e após a irradiação. O espectro da melanina já foi descrito, analisado e publicado por outros pesquisadores[162] e a nossa análise se baseou em dados e interpretações destes autores. A irradiação da melanina sob luz visível mostrou formação de um pico a 8,4 ppm (singlete) com um subsequente decréscimo nos picos dos padrões indol aromáticos (7,7-7,8 ppm). Estas alterações no espectro de RMN de 1H de melanina também foram observados por Katritzky e colaboradores, após a oxidação química (peróxido de hidrogênio) da melanina. Katritzky e colaboradores também previram que este pico a 8,4 ppm era devido à presença de um grupo " $-N = CH-Ar$ " [162]. Sabendo-se que a via da reação principal de 1O_2 com indol é a formação de um hidroperóxido no carbono C3 [63], percebemos que o deslocamento da ligação dupla para a vizinhança do

nitrogênio pode explicar a formação de tal grupo químico (Figura 14). Este produto de reação não é específico para $^1\text{O}_2$ porque outras espécies reativas podem também gerá-lo. No entanto, conforme o descrito aqui, $^1\text{O}_2$ é gerado pela melanina (Figura 14) e é muito provável que o primeiro passo da degradação de melanina seja a reação mostrada na Figura 14.

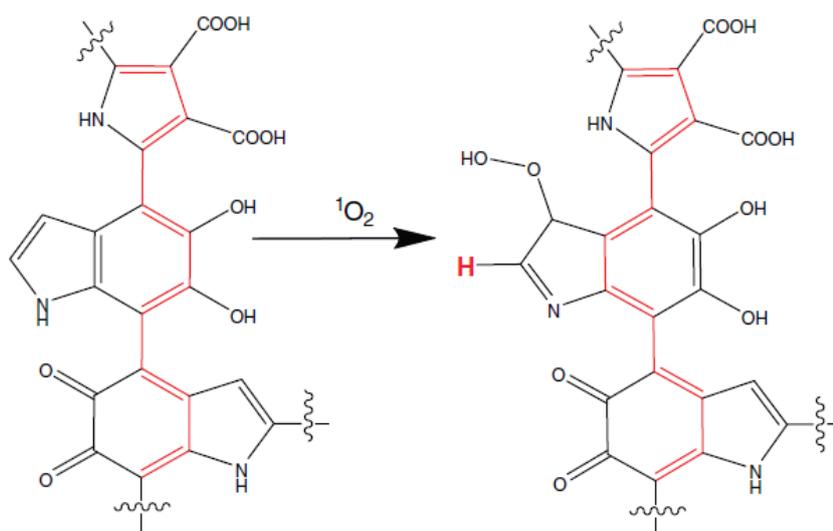


Figura 14: Foto-oxidação da melanina.

O esquema mostra a proposta de mecanismo de reação da foto-oxidação da melanina pelo oxigênio singlete, e a formação de hidroperóxido demonstrada pela técnica de RMN H1, compatível com a reação de oxigênio singlete e grupo indol [163].

Portanto, a luz visível é capaz de induzir a degradação do anel de indol da melanina e o passo inicial desta reação é devido à formação de hidroperóxido através do ataque de $^1\text{O}_2$ na posição C3 do grupo indol. Uma possibilidade para explicar o foto-dano da melanina é a formação de espécies tripletes, permitindo reações de fotossensibilização tipo II e a formação de $^1\text{O}_2$ que pode adicionar a duplas ligações (Figura 14), danificando assim a melanina [164,165].

Embora já se sabia que a melanina é fotoativa, foi observado pela primeira vez a emissão de $^1\text{O}_2$ proveniente diretamente da excitação de melanina por luz visível. Para demonstrar que a exposição de cromóforos aumenta a atividade fotossensível da melanina, soluções de melanina SA dissolvidas em hidróxido de sódio 0,1 M; peróxido de hidrogênio 0,1 M e ureia 6 M foram incubadas no escuro a 25°C e a geração de oxigênio singlete foi mensurada. Note que a emissão de $^1\text{O}_2$ após de incubação de 14 dias foi maior em todas as três soluções estudadas (Figura 15).

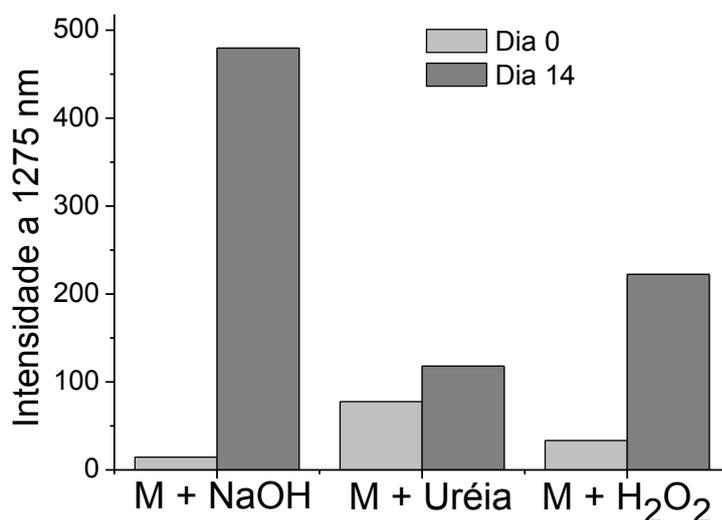


Figura 15: Área do gráfico de emissão de $^1\text{O}_2$ de amostras de melanina (M) em NaOH, H₂O₂ e Uréia.

Melanina SA (10mg) foi dissolvida em 0,1M NaOH; 6,0M de ureia e 0,1M de H₂O₂. Todas as amostras foram excitadas a 532 nm e a integral dos espectros de intensidade de emissão de $^1\text{O}_2$ a 1275nm foi representada através das barras do gráfico. As medidas foram realizadas no dia de preparação da solução e também 14 dias à posteriori. Neste período as amostras foram mantidas em cubetas celadas a temperatura ambiente e mantidas no escuro.

Houve um aumento considerável na quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado com o tempo de incubação, especialmente quando a melanina foi dissolvida em hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio (Figura 15). Por conseguinte, a hidrólise e a oxidação da melanina respectivamente induzidas por hidróxido de

sódio e peróxido de hidrogênio aumentaram a geração de oxigênio singlete. Experimentos de diálise mostraram que os grânulos da melanina tratadas com NaOH e H₂O₂ não atravessaram a membrana de diálise de 10kD [166]. Isso sugere que o tratamento químico deve alterar principalmente a conformação deste polímero em solução permitindo a exposição das espécies excitáveis e maior geração de ¹O₂.

Experiências de diálises também provaram a ausência de fragmentos de melanina a partir de soluções de melanina em uréia [32,166]. Neste caso, a melanina é integral. A única mudança induzida pela ureia foi a desnaturação do biopolímero, isto é, a abertura da estrutura de melanina e a exposição dos seus resíduos fotoativos, que também levaram ao aumento da geração de ¹O₂. Portanto, quando a melanina sofre tratamentos químicos ou físicos, que causam uma mudança na sua estrutura e a exposição dos seus resíduos fotoativos, há geração de ¹O₂ com maior eficiência.

Nofsingere colaboradores detectaram que os pigmentos eumelanina agregados produzem 10 vezes menos radical ânion superóxido (O₂^{•-}) que oligômeros não agregados [32]. Nossos resultados mostraram que a fotoeficiência de melanina aumenta ao se abrir a sua estrutura polimérica causando a exposição de seus resíduos fotoativos. Este efeito parece ser uma tendência geral na fotoquímica da melanina. Portanto, o estado geral de hidratação e de outras propriedades, que são importantes para a manutenção da estrutura da melanina na pele e no cabelo, pode ser importante para evitar danos nestes tecidos mediados pela exposição solar.

Para investigar o papel que o tipo de melanina tem na sua fotofísica e fotoquímica, diferentes melaninas foram testadas, eumelanina e feomelanina

(IQ/USP) e eumelanina e feomelanina Ito, cedidas pelo Dr. S. Ito (Fujita Health University, Japão) (Tabela 1 dos métodos).

Espectros de emissão de $^1\text{O}_2$ da eumelanina e feomelanina mostraram distinções fotoquímicas. A feomelanina apresentou 30% de maior intensidade de geração de $^1\text{O}_2$ que a eumelanina quando excitada a 532 nm (Figura 16). Esse dado mostra que não só a fragmentação e ou a desnaturação do biopolímero, mas também a natureza da sua estrutura, determinam a eficiência de geração de oxigênio singlete.

Além de avaliar a eficiência de geração de oxigênio singlete é importante caracterizar a eficiência com que o oxigênio singlete reage com estas melaninas. Por isso, mediu-se a absorção da eumelanina e da feomelanina irradiadas em função do tempo. Durante 1 hora de irradiação no visível, a absorção da eumelanina sofreu queda de 30% em comparação com a feomelanina que diminuiu em apenas 7% (gráfico interno da Figura 16). Isso mostra que a eumelanina reage de maneira mais eficiente com oxigênio singlete do que a feomelanina. Isso mostra a capacidade supressora de $^1\text{O}_2$ pela eumelanina por meio da adição de $^1\text{O}_2$ à dupla ligação com formação de hidroperóxido na posição C3 do grupo indol (Figura 14).

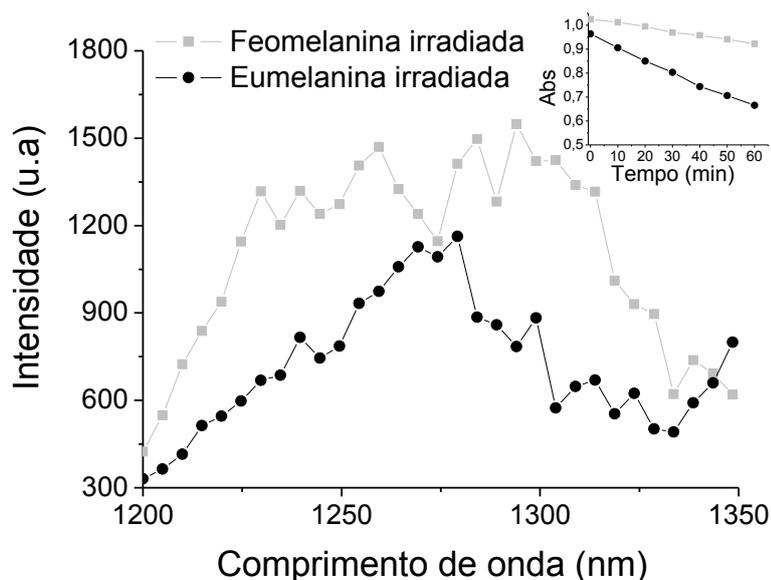


Figura 16: Intensidade de emissão de oxigênio singlete da eumelanina e da feomelanina após irradiação sob a luz visível.

Ambas soluções foram solubilizadas em NaOD 0,01M/D₂O e excitadas a 532nm. O gráfico interno mostra a absorbância da eumelanina e feomelanina após 60 minutos de irradiação sob a luz visível.

Evidências experimentais sugerem que pessoas com maior teor de feomelanina (caucasóides brancos com pele sensível tipo I) são mais propensas a ter câncer de pele. Estudos *in vitro* têm sugerido maior fototoxicidade da feomelanina [19,167], embora não haja uma explicação mecanística para esta observação. Outros autores obtiveram comprovações experimentais de que a feomelanina é mais reativa do que a eumelanina [31], embora isso ainda seja objeto de conjectura. Nossos dados contribuem nesta discussão, mostrando que a geração e supressão de oxigênio é uma propriedade que distingue a reatividade destes biopolímeros.

4.2 Fotossensibilização no visível da melanina em cabelo

No evento de exposição à luz UV, o cabelo reconhecidamente fluoresce principalmente por causa da absorção e emissão de resíduos de aminoácidos específicos (triptofano, tirosina e fenilalanina). A absorção da radiação UV, também afeta a cor e a estrutura do cabelo [15,16]. No entanto, quando iniciamos esse trabalho não havia relatos sobre a fluorescência do cabelo induzidas por irradiação com luz visível. Processos fotofísicos e fotoquímicos devem se originar a partir da absorção de moléculas cromofóricas na faixa do visível presentes na estrutura do cabelo, que são a melanina e seus precursores e derivados (Figura 12).

Iniciamos este capítulo descrevendo as propriedades ópticas de vários tipos de cabelo sob iluminação com luz visível. Por uma questão de simplicidade, apenas duas cores extremas de cabelo são mostradas, isto é, loiro e preto. Cores de cabelos intermediárias, ou seja, marrom claro e escuro, etc, têm características espectroscópicas intermediárias. Nota-se que em ambos os cabelos loiros e pretos há características estruturais semelhantes em nível microscópico (Figura17); no entanto, os seus perfis de emissão são diferentes. Fluorescência de cabelos louros (Figura17A) é mais intensa do que a detectada a partir de cabelos pretos (Figura17A).

A emissão mais fraca de fibras de cabelo preto é compatível com o espectro de emissão mais fraco no espectrofluorímetro (Figura17C). Outra diferença interessante do perfil de emissão de cabelos pretos e loiros é o perfil de pontuação. Nota-se que a emissão proveniente de pelos pretos não é contínua, mas em vez disso, ela tem um perfil de pontuações que é devido à presença de grânulos de melanina [168,169]. Nota-se também que a

quantidade de absorção da luz nos cabelos pretos é muito maior, devido ao maior teor de melanina (Figura 17B), sugerindo que a fluorescência mais fraca de pelos pretos é devido a um efeito de filtro interno (menos luz atinge as camadas mais profundas o cabelo) e a reabsorção de luz (luz emitida é reabsorvida).

Ao variar o comprimento de onda de excitação foram observadas mudanças no comprimento de onda de emissão máxima nos cabelos loiros, indicando que diferentes fluoróforos estavam presentes (Figura 17D), o que é um comportamento que se poderia esperar a partir de uma substância complexa tal como a melanina.

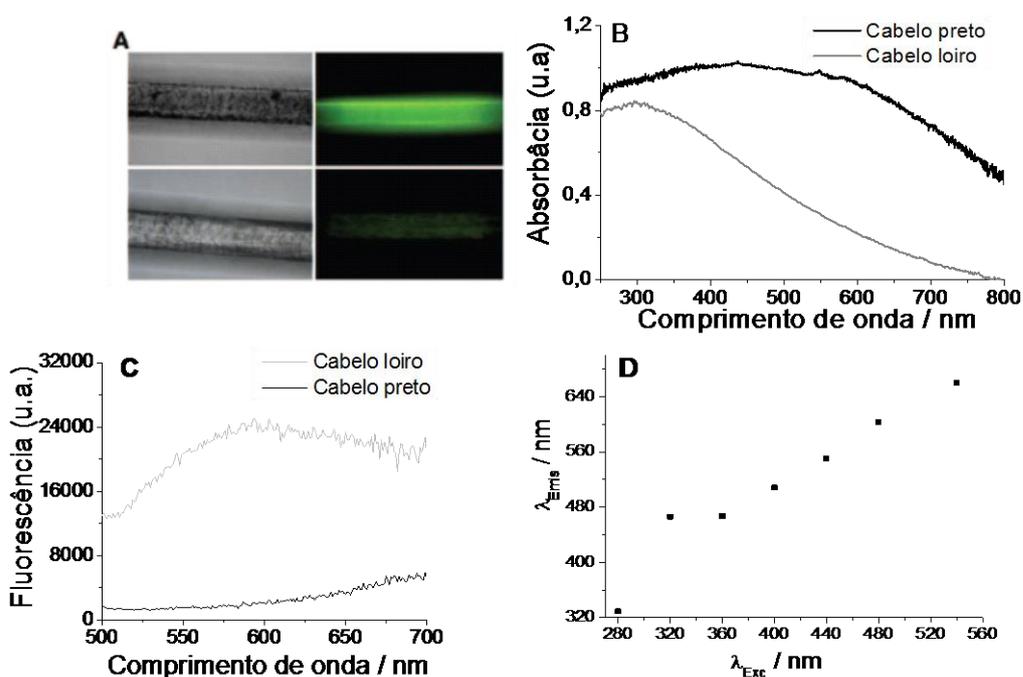


Figura 17: Propriedades microscópicas e espectroscópicas de cabelos loiros e pretos.

A) À esquerda: Imagem de transmissão de cabelo loiro (acima) e cabelo preto (parte inferior). Direita: imagens de fluorescência de cabelo loiro (acima) e cabelo preto (parte inferior). B) Espectros de absorção de cabelos pretos e loiros. C) Espectros de fluorescência de cabelos loiros e pretos ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$). D) Correlação entre o comprimento de onda de excitação e os máximos de emissão dos espectros de emissão de cabelos loiros. Figura foi retirada da publicação em que o autor da tese figura como primeiro autor [163].

A única espécie que absorve a luz visível nos cabelos é a melanina (Figura 12), o que indica que a melanina é a espécie provável que emite luz. O fato de que os espectros de fluorescência e as imagens microscópicas de cabelo sob luz visível serem sensíveis ao conteúdo de melanina, permite o uso dessas técnicas para avaliar os danos específicos da melanina e seus respectivos efeitos nos cabelos.

A luz UV é conhecida por causar dano em melanina e em outras estruturas de cabelo [170–175]. No entanto, o efeito da irradiação da luz visível não foi cuidadosamente investigado. Após irradiação com luz visível, foram observados mudanças nas propriedades de absorção/emissão de fios de cabelo (Figura 18). O aumento na emissão de luz em cabelo loiro e preto (Figura 18A), foi acompanhada por uma diminuição na absorção de melanina em ambos os tipos de cabelo (Figuras 18B e C), indicando que a melanina estava sendo degradada. Nota-se também que o efeito foi mais pronunciado em cabelos loiros (Figura 18B). Portanto, a luz visível, além de interagir fisicamente (dispersão, difração, absorção e emissão), com as estruturas presentes nos cabelos, também provoca alterações químicas, que é semelhante ao efeito observado pela exposição de pelos à luz UV [170–175].

Trabalhos anteriores sugerem que danos químicos induzidos por UV em cabelos pode ser causado por $^1\text{O}_2$. No entanto, não havia relato na literatura comprovando a geração fotoinduzida de $^1\text{O}_2$ no cabelo [166,171,172,176]. Espera-se que a excitação UV deva produzir $^1\text{O}_2$ em cabelos por causa da excitação direta de aminoácidos fotoativos [177]. Por outro lado, sabemos que a melanina presente no cortex dos fios de cabelo produzem $^1\text{O}_2$ (Figura 13B) e levantamos a hipótese da luz visível gerar $^1\text{O}_2$ em cabelos. Para testar esta

hipótese, as medições diretas de fosforescência em 1270nm de fios de cabelos foram realizados após excitação 532 nm, um comprimento de onda que é absorvido apenas pela melanina nos cabelos.

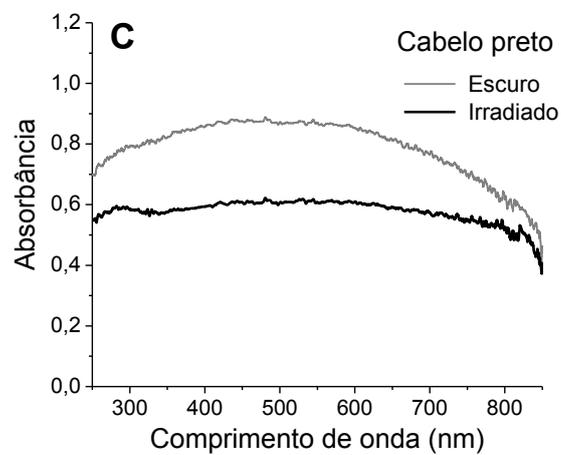
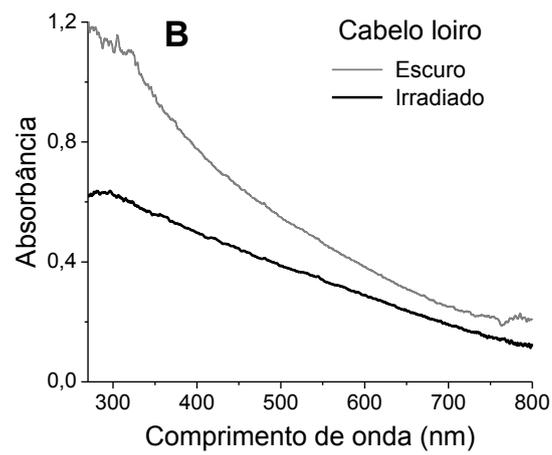
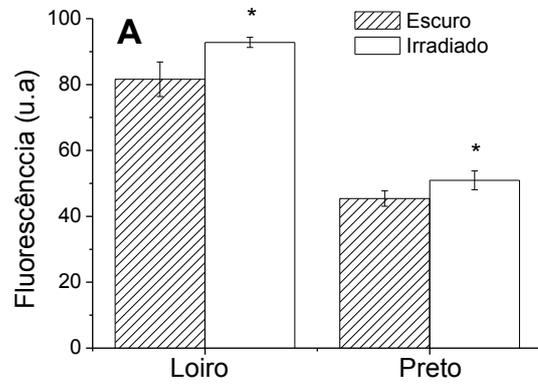


Figura 18: Absorção e propriedades emissivas de fios de cabelo (loiros e pretos) antes e depois de 2 h de irradiação na lâmpada halógena (Figura 10A).

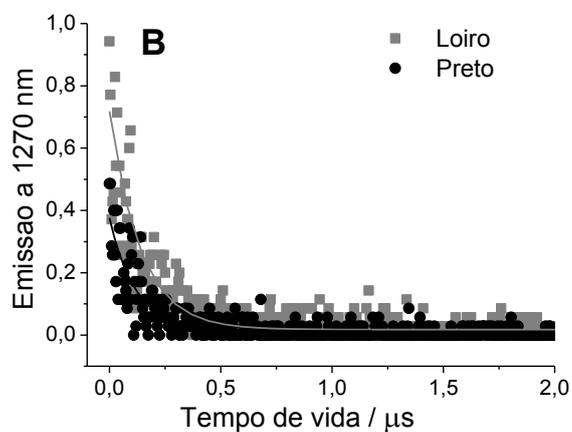
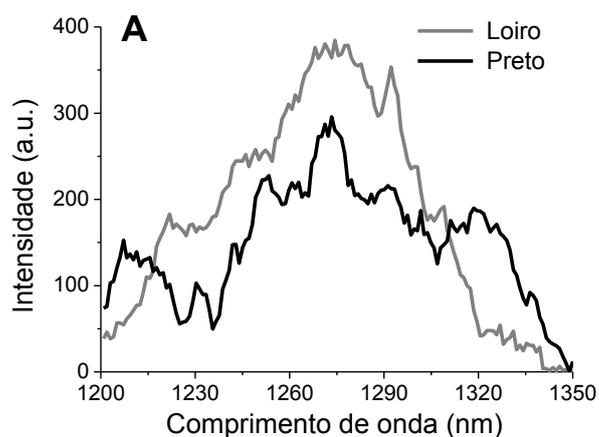
A) Intensidade integrada de emissão de amostras de cabelo loiro e preto, antes e após a irradiação. Os dados são as médias de fluorescência de 10 fios obtidos a partir de imagens de microscopia; A integração foi realizada utilizando o aplicativo ImageJ a uma área constante. B) Espectros de absorção de cabelos loiros e C cabelos pretos antes e após a irradiação. * significativamente diferente a $P < 0,05$ [160].

Os cabelos foram suspensos em água deuterada (D_2O) e espectros de fosforescência no infravermelho próximo foram medidos após excitação com 532 nm. Nota-se claramente a banda de emissão centrada em 1270 nm, a qual é devida à emissão de 1O_2 ($a^1\Delta_g$) [60,178] (Figura 19A). A intensidade de emissão de 1O_2 depende também do tipo de cabelo. A Figura 19 mostra a intensidade de sinais de 1O_2 vindos de cabelos de cores diferentes. Cabelos pretos e pardos apresentaram intensidades semelhantes (Figura 19C). Para os outros cabelos, emissão de 1O_2 foi significativamente maior, sendo mais forte em cabelos loiros (Figuras 19A e B), que é uma tendência similar à observada nos sinais de fluorescência (Figura 17A).

Além da magnitude do sinal espectral infravermelho próximo, o tempo de vida de 1O_2 é um outro parâmetro importante a ser analisado, porque dá uma indicação do ambiente do 1O_2 , bem como, permite o estudo da presença de supressores físicos e químicos que causam uma diminuição no tempo de vida do 1O_2 . Os cabelos foram suspensos em vários solventes e decaimentos de emissão foram medidos em 1270 nm (Figura 19B).

Interessante a ser considerado no espectro da figura 19B é que o decaimento das emissões observadas em cabelos loiros é maior em comparação com os cabelos pretos (4,7 vezes menor em cabelos pretos). É interessante notar que os cabelos negros têm cerca de cinco vezes mais eumelanina do que cabelos loiros [174,179] e a supressão de 1O_2 é

aproximadamente cinco vezes mais eficiente em cabelos pretos, o que é uma forte evidência de que a eumelanina é a principal espécie de supressão de $^1\text{O}_2$, conforme observado no capítulo anterior. Estas observações estão de acordo com a atividade supressora conhecida de $^1\text{O}_2$ por eumelanina. Também está de acordo com a maior magnitude de emissão de $^1\text{O}_2$ observada em cabelos loiros (Figura 19) que possuem maior quantidade de feomelanina.



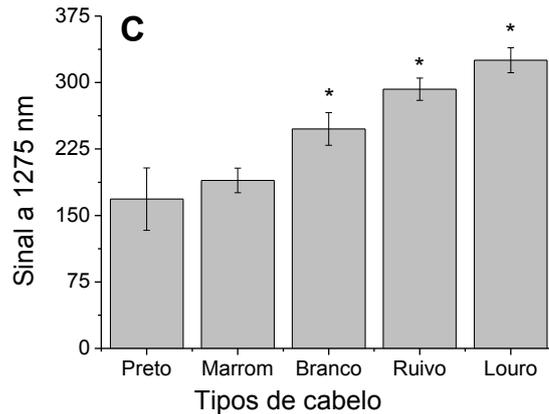


Figura 19: Emissão de $^1\text{O}_2$ de amostras de cabelos loiros e pretos excitados a 532 nm.

O gráfico A mostra o espectro de geração de $^1\text{O}_2$ (1270 nm) de amostras de cabelo loiro e preto. O gráfico B, mostra o tempo de vida (μs) a 1270 nm de cabelos loiros e pretos em D_2O . O gráfico C mostra as barras que representam a quantificação da área do gráfico de Intensidade de emissão de $^1\text{O}_2$ (em 1270 nm) dos cinco tipos de cabelo. * significativamente diferente a $p < 0,01$ em relação aos cabelos preto e marrom com predominância de eumelanina.

Outro aspecto interessante é que o tempo de vida de $^1\text{O}_2$ em qualquer tipo de cabelo é tanto (várias ordens de grandeza) mais curto do que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ conhecido nos respectivos solventes isotrópicos em que a mexa de cabelo é suspensa. No caso de CCl_4 o tempo de vida de $^1\text{O}_2$ é vários décimos de milissegundo (~ 87 ms) [180] e os sinais provenientes dos cabelos são 3,75 e 0,8 ms para cabelos loiros e pretos respectivamente.

A Figura 20 resume os processos fotofísicos que ocorrem dentro de um fio de cabelo. Nossos resultados fornecem forte evidência de que, sob irradiação de luz visível, o cabelo sofre danos a sua estrutura e cor por causa da geração de $^1\text{O}_2$ por fotossensibilização da melanina. $^1\text{O}_2$ é fotoquimicamente gerado nos cabelos por excitação visível, com tempo de vida relativamente curto mas capaz de gerar dano no cabelo dependendo do teor de melanina. As modificações químicas da melanina induzidas por irradiação devem iniciar-se com a formação de um hidroperóxido do anel indólico, mas devem atingir também outros aminoácidos como cisteína, muito presente na queratina.

Portanto, os resultados provaram o papel do $^1\text{O}_2$ nos danos do cabelo induzido pela fotossensibilização da melanina.

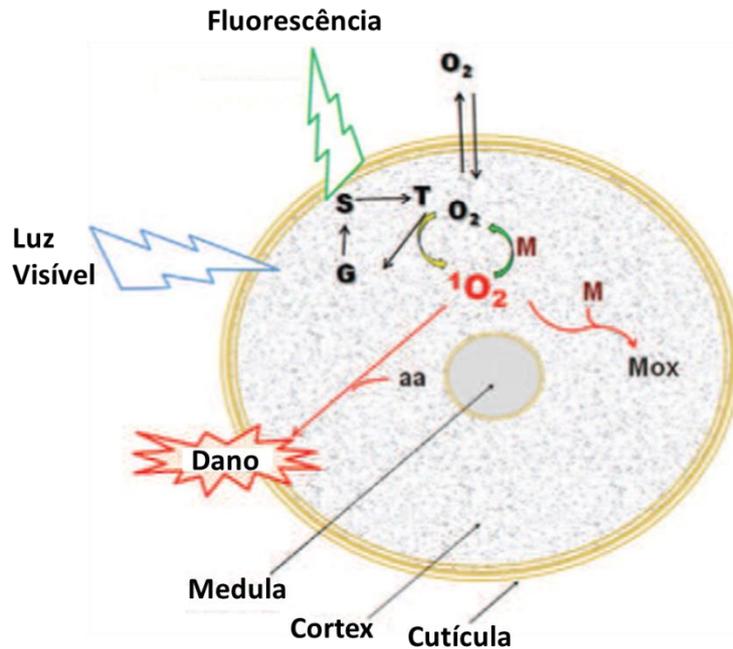


Figura 20: Processos fotofísicos e fotoquímicos em um fio de cabelo sob irradiação que mostra a produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) por fotossensibilização após a irradiação com luz visível.

O processo inicia-se, principalmente, na região onde a melanina está presente (córtex). G é o estado fundamental de melanina; S é o seu estado de singlete; T é o seu estado triplete. G absorve a luz, formando S que se converte em T através de cruzamento intersistemas e T reage com o oxigênio, formando $^1\text{O}_2$. $^1\text{O}_2$ pode ser suprimido pela oxidação da melanina, formando melanina oxidada (Mox), ou reação com outros resíduos de aminoácidos (aa), tais como a cisteína da queratina, provocando danos na estrutura do cabelo. A seção transversal do cabelo mostra cutícula, córtex e medula, que estão fora de escala. Figura foi retirada da publicação em que o autor da tese figura como primeiro autor [163].

4.3 Fotossensibilização no visível da melanina em células epiteliais: Geração de $^1\text{O}_2$ e seus efeitos biológicos

As propriedades fotoquímicas da melanina indicaram a dualidade dessa molécula por gerar e suprimir $^1\text{O}_2$ em solução e nas estruturas do cabelo. A fim de compreender o efeito que a fotossensibilização da melanina pode ter sobre as células epiteliais, comparou-se a fotossensibilidade da luz UV-B e visível em diferentes linhagens de células, que expressam diferentes níveis de melanina (Figura 21). Nota-se que as células que expressam mais melanina (B16-F10) têm uma maior taxa de sobrevivência sob a luz UV-B quando comparadas às células com pouca (SKMEL28) ou nenhuma melanina (HaCaT), em concordância com a literatura [181]. No entanto, as células melano-competentes (SKMEL28 e B16-F10) morrem mais significativamente quando irradiadas sob a luz visível em comparação ao queratinócitos HaCaT (Figura 21). Isto é uma forte evidência de que a fototoxicidade na luz visível refere-se mais intimamente à presença do fotossensibilizador melanina. Linhagens celulares J774 e HeLa também foram testadas e não apresentaram nenhum comprometimento celular após irradiação $36\text{J}/\text{cm}^2$ de luz visível (dado não mostrado) por serem amelanocíticas, ou seja, incapazes de sintetizarem o pigmento melanina.

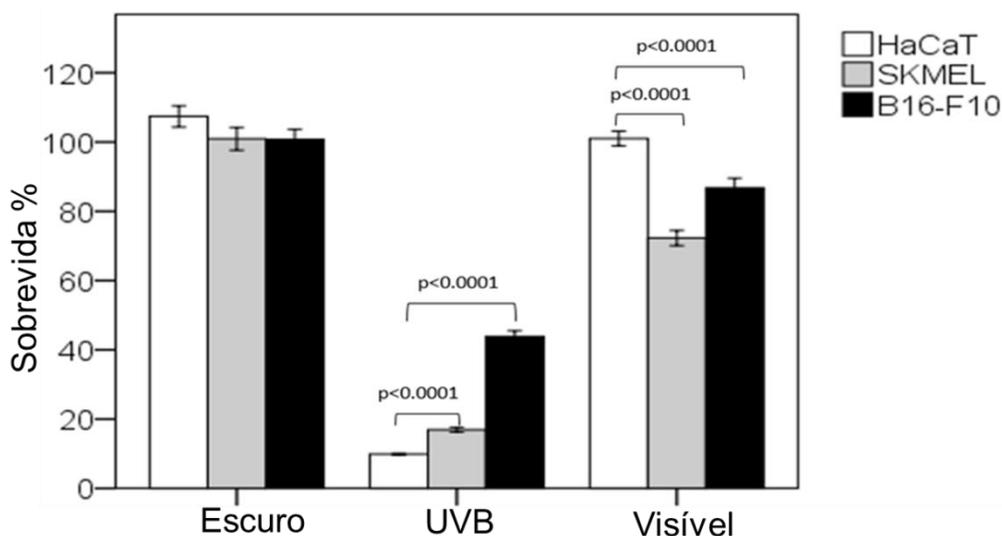


Figura 21: Efeito de UV-B e luz visível sobre a viabilidade celular.

A viabilidade (MTT) das células HaCaT, SKMEL28 e B16-F10 mantidas no escuro (controle) ou irradiadas com UV-B ($4,5 \text{ J/cm}^2$) ou visível (36 J/cm^2). As barras representam a sobrevida (%) da células HaCaT amelanocítica (barra branca), e das células melanocíticas SKMEL28 (barra cinza) e B16-F10 (barra preta). Os traços acima das barras mostram significância estatística a $P < 0,0001$ (ANOVA).

Células foram estimuladas por um protocolo de pigmentação, gerando melanina intracelular (item 3.3.2 - melanogênese). Na figura 22, a imagem CT mostra uma célula B16-F10 controle com nível homeostático de melanina e a imagem M^+ mostra uma célula B16-F10 estimulada para produção de melanina [181]. Nota-se que na célula M^+ há maior quantidade de melanina distribuída aleatoriamente no citoplasma. Testamos a toxicidade da luz visível em duas linhagens de células melano-competente (B16-F10 e melanócitos de humanos caucasianos) submetidas à produção de melanina M^+ . Apesar de os melanócitos em cultura serem claramente diferentes de melanócitos da pele, os mesmos são conhecidos por serem um bom modelo experimental para testar a resposta celular aos desafios ambientais [7].

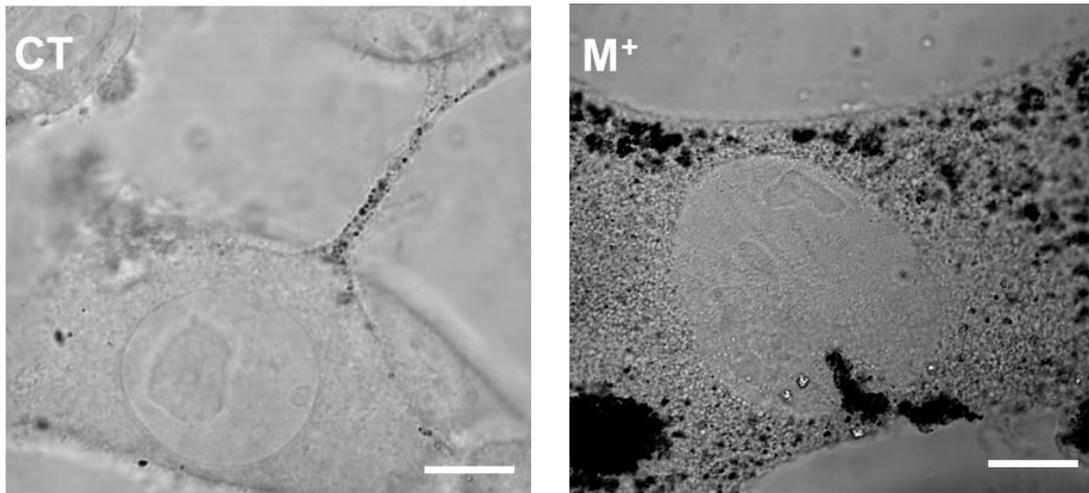


Figura 22: Pigmentação de células B16-F10.

A imagem CT mostra a microscopia confocal da célula controle (sem pigmentação adicional). A imagem M⁺ mostra uma célula com maior conteúdo de melanina. Ambas imagens possuem um aumento de 1000x.

As células CT e M⁺ incubadas por 48 horas na estufa a 37°C (imagens da Figura 22) foram submetidas à irradiação UV-B para confirmar a função de protetora da melanina através do método MTT. A Figura 23 mostra a viabilidade das células CT e M⁺ irradiadas sob a luz UV-B e visível. A ordenada da Figura 23A mostra o decréscimo de 40% na viabilidade das células B16-F10 controle quando irradiadas com luz UV-B (4,5 J/cm²). Como se esperava, na condição M⁺ não ocorreu diminuição significativa da sobrevivência celular após exposição UV-B em relação a célula pigmentada não irradiada (gráfico da direita na Figura 23A). Além disso as células M⁺ UV-B irradiadas apresentaram maior sobrevivência em relação a células apenas UV-B irradiadas (comparar os asteriscos da figura 23A). Esse experimento ratifica o que já foi previamente descrito, que a melanina age como um filtro protetor contra os raios UV-B [182–185]. Curiosamente, na condição M⁺ sob o efeito de luz visível foi observado o inverso do demonstrado para a irradiação UV-B. Nota-se que sob excitação com luz visível (36J/cm²), todas as células melano-competentes na condição

M⁺ apresentaram menor sobrevivência celular quando comparada ao controle escuro (Figura 23B). De fato, ao irradiar com luz visível a 36 ou 72J/cm², ambas as linhagens celulares quando pigmentadas tiveram diminuição substancial na viabilidade, 50% (H36), 25% (M36) e 40% (M72), respectivamente (lado direito da Figura 23B). Esses resultados mostram que a presença de melanina definitivamente aumenta a fototoxicidade de células irradiadas sob a luz visível. Em contrapartida, sem a indução de melanogênese, houve uma redução de apenas ~ 5% na viabilidade celular dessas células quando irradiadas sob luz visível a 36J/cm². No entanto, na dose de 72J/cm² houve uma maior redução da viabilidade embora de apenas 15% (M72J, do lado esquerdo da Figura 23B).

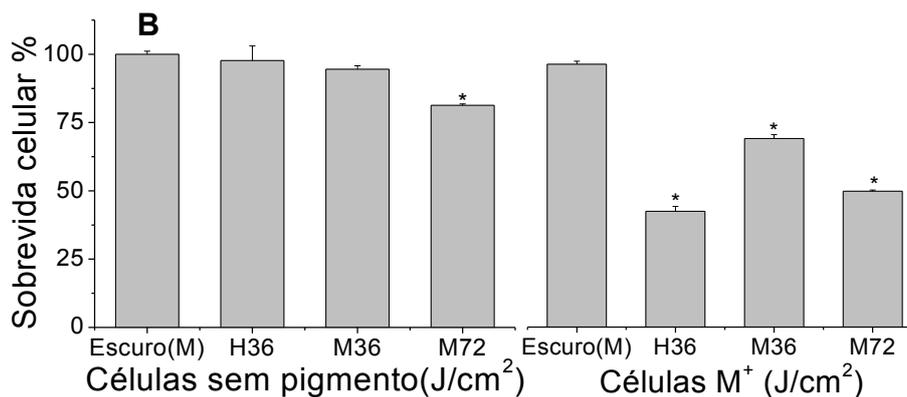
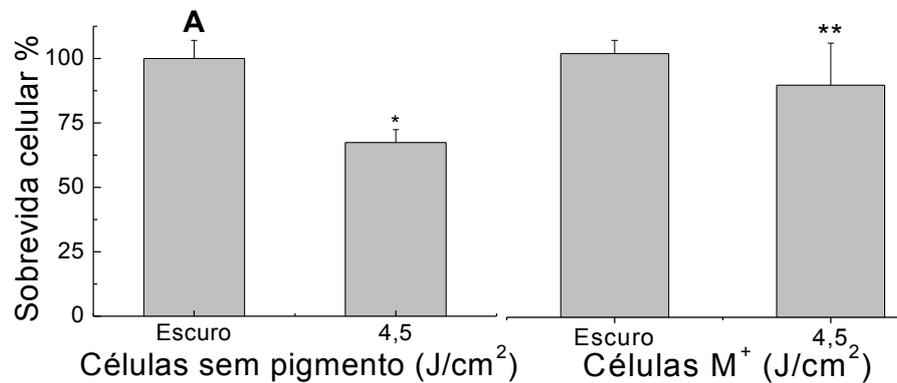


Figura 23: Efeitos da luz UV-B e visível na viabilidade de Melanócitos humano e melanoma de camundongo.

A) Gráfico representando a sobrevivência celular média (%) das células B16-F10 não pigmentadas (à esquerda) e células B16-F10 submetidas ao protocolo de pigmentação (M⁺) com Tyr +NH₄Cl (à direita). As células foram mantidas no escuro e irradiadas na dose UV-B a 4,5J/cm². B) Gráfico representando a sobrevivência celular média (%) das células B16-F10 de camundongo (M) e Melanócitos humanos caucasianos (H) submetidas ao protocolo de pigmentação (M⁺) com Tyr +NH₄Cl mantidas no escuro e irradiadas nas doses visível de 36J/cm² e 72J/cm². A densidade energética foi 0.7 mW.cm⁻² para cálculo da dose UV-B em tempo de exposição de 30'. A densidade energética foi 3.0 mW.cm⁻² para cálculo das doses visível (36 e 72J/cm²) em tempo de exposição de 180' e 360' respectivamente. "*" mostra a significância estatística a P < 0,05 (ANOVA) em relação ao controle escuro. "***" mostra a significância estatística a P < 0,05 (ANOVA) entre as células pigmentadas e não pigmentadas após irradiação UV-B.

Optou-se por estudar os mecanismos de morte em células B16-F10 (M⁺ M72J da Figura 23B) na dose de 72J/cm² por essa condição representar uma IC₅₀. As células com super-expressão de melanina (M⁺) apresentaram morte celular por necrose (ver seta da Figura 24A) e apoptose (ver seta da Figura 24B) após irradiação com luz visível. A necrose foi evidenciada através da incorporação de IP pelo DNA nuclear (pontuações vermelhas indicadas pela seta na imagem 24A). Já a apoptose foi caracterizada pela marcação citoplasmática da proteína Caspase-3 ativa em células M⁺ irradiadas (ver pontuações verdes indicadas pela seta branca da imagem 24B inferior direita). A marcação em vermelho das imagens 24B é o reconhecimento da proteína COXIV de mitocôndria. Nota-se também que a marcação da proteína Caspase-3 ativa em verde ocorre próximo ao núcleo onde a melanina geralmente está localizada (ver seta branca na imagem 24B). Esses dados apontam para a ativação do mecanismo de morte celular por apoptose, em que é possível se visualizar células em necrose secundária caracterizadas pela marcação do DNA por IP, e picnose nuclear.

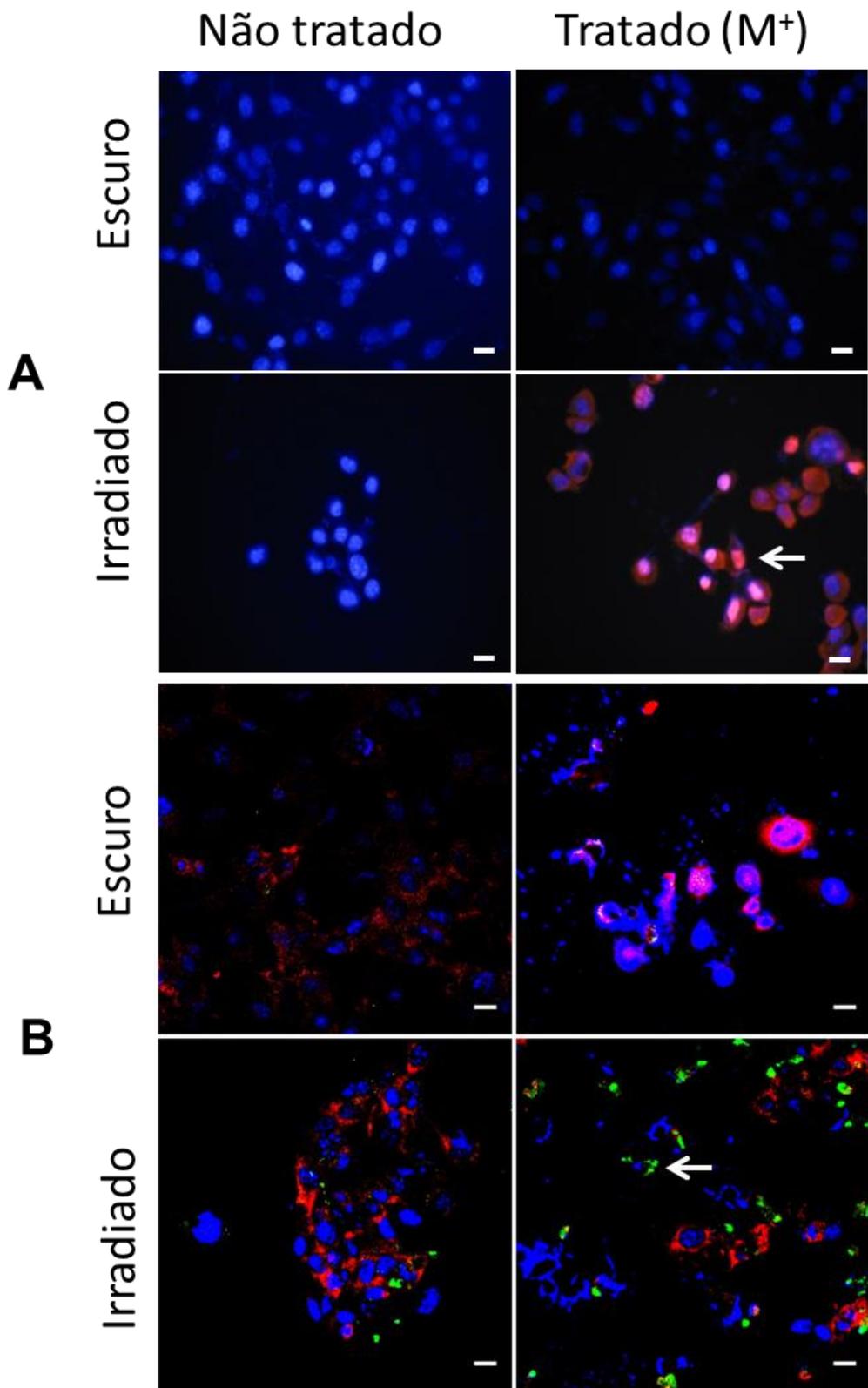


Figura 24: Tipos de morte causada pela luz visível em células B16-F10 pigmentadas.

A marcação em azul de todas as imagens A e B da figura representa o DAPI que reconhece o DNA nuclear das células. A coloração em vermelho das imagens em B refere-se a marcação da proteína COXIV de mitocôndria ativa. A seta mostrada em A representa a incorporação de iodeto de propídeo (coloração vermelha) em células B16-F10 após pigmentação M+ e irradiação visível de 72J/cm². A seta em B mostra a marcação de Caspase-3 ativa (coloração verde) após pigmentação M+ e irradiação visível de 72J/cm². As Imagens apresentam aumento de 400X. A dose foi calculada pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição de 0 e 360'.

Por localizar-se próximo ao núcleo, a melanina protege o DNA contra a radiação UVB. No entanto, a indução de morte celular apoptótica causada pela melanina irradiada com luz visível (Figura 24) gera um paradoxo sobre o papel da melanina em relação à proteção da pele.

Dessa forma, torna-se necessário investigar a correlação de geração do ¹O₂ pela melanina. Os dados das Figuras 23 e 24 sugerem a possível geração de ¹O₂ pela melanina foto excitada dentro das células M⁺. A fototoxicidade observada em células melanocíticas M⁺ (Figura 23B) pode ter relação com a absorção de luz visível e a produção de ¹O₂. Por isso, o próximo desafio foi verificar essa hipótese.

Para isso, células controle e pigmentadas M⁺ foram excitadas com luz visível (532 nm) e os espectros de emissão de ¹O₂ foram registrados na região do infravermelho próximo [60]. Células controle mostraram sinal basal de emissão de ¹O₂ (linha cinza no espectro interno da Figura 25). Em contrapartida, as células pigmentadas M⁺ apresentaram espectro de emissão que claramente evidencia a geração de ¹O₂ no ambiente intracelular (linha preta do espectro interno da Figura 25). O teor de melanina (abscissa) em função da geração de ¹O₂ e da fototoxicidade (ordenadas) na figura 25 mostrou que conteúdo de melanina M⁺ gerou mais ¹O₂ e aumentou da fototoxicidade.

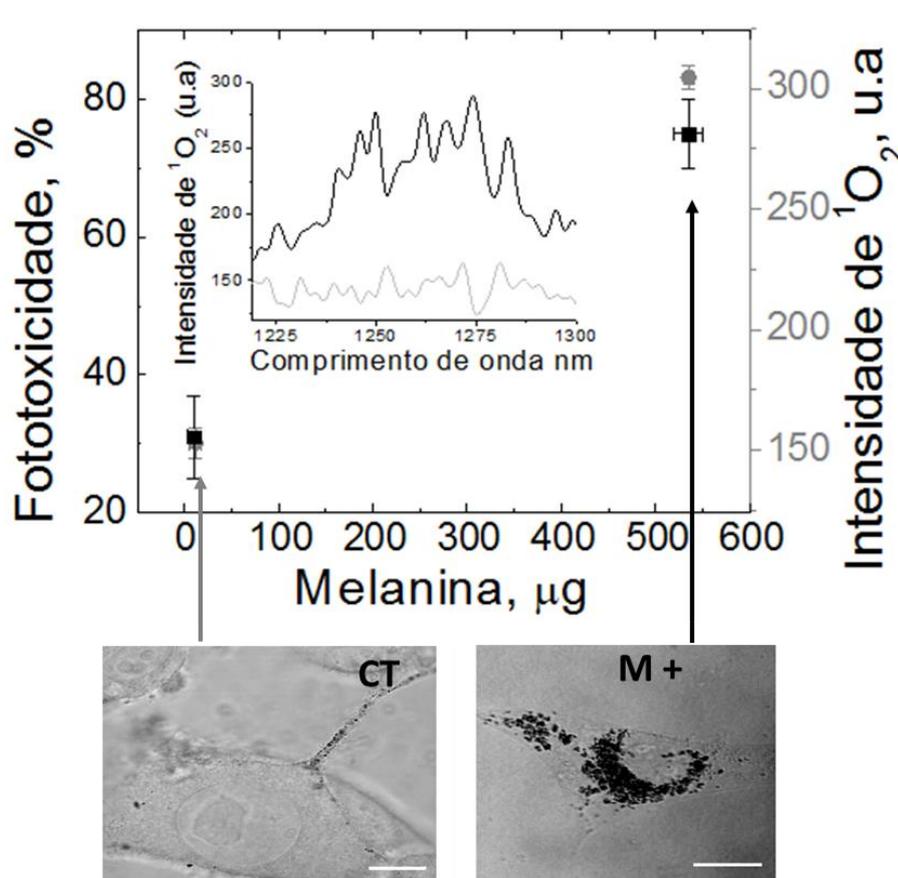


Figura 25: Produção de melanina e sua relação com a geração de oxigênio singlete e a fototoxicidade.

Produção de melanina (em µg melanina/mg de proteína total) em função da fototoxicidade (quadrados pretos) e intensidade integrada de geração de 1O_2 sob excitação 532 nm (círculos cinzas). Células B16-F10 controle (CT) e as células B16-F10 pigmentadas (M^+) estão representadas abaixo do gráfico. As setas cinza e a preta representam as células CT e M^+ respectivamente que corroboram com as cores dos espectros de emissão de 1O_2 em células B16-F10 CT e M^+ interno.

Em 2010, Mahmoud e colaboradores mostraram maior nível de pigmentação em indivíduos com pele tipo IV e V (pele naturalmente escura) quando irradiados com luz visível, sem qualquer alteração em indivíduos com pele do Tipo II (pele com pigmentação baixa) [21]. Os melanócitos dos indivíduos com pele tipo IV e V deveriam estar produzindo mais melanina para proteger as células contra os danos fotoinduzidos pela luz visível.

Uma possível explicação mecanística para os dados de Mahmoud e colaboradores é que o $^1\text{O}_2$ ataca duplas ligações de bases nitrogenadas do DNA [90,91] sem quebrá-lo. O reconhecimento dessas modificações por proteínas de reparo e supressoras de tumor, p53 por exemplo, podem estimular maior produção de melanina, como tentativa de sobrevivência celular ou morte celular controlada conforme Figura 24B [83,186–189]. Sugere-se que a geração de espécies reativas por componentes intermediários da melanina estejam envolvidas nesses mecanismos de sinalização celular [33]. Ao se estimular a pigmentação em células melano-competentes, há indução da parada do ciclo celular, devido à ativação de fatores proteicos p16INK4a e CDK4. Esses se complexam com outras proteínas provocando a perda de atividade de ligação do fator de transcrição E2F, com consequente parada do ciclo celular em G0. Esse mecanismo pode representar uma forma de defesa contra a transformação maligna de melanócitos [34,35].

Ao irradiarmos as células B16-F10 M⁺ com luz visível, detectamos quebra no DNA genômico (Figura 26D). Esse dado é mostrado no gráfico da Figura 26 através do cálculo da OTM, que é a quantificação de fluorescência da calda cometa de 100 células que sofreram quebra no DNA genômico (ver barra D do gráfico). A imagem D mostra a fragmentação do DNA somente em células M⁺ irradiadas sob luz visível a $36\text{J}/\text{cm}^2$ em comparação com as demais células. Esse dado sugere a formação de espécies reativas (oxigênio singlete e radicais livres) no processo de fotossensibilização da melanina de células B16-F10.

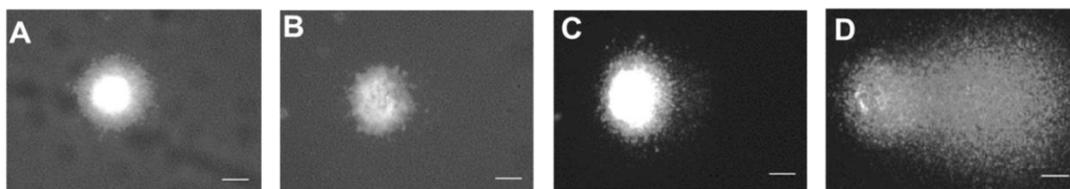
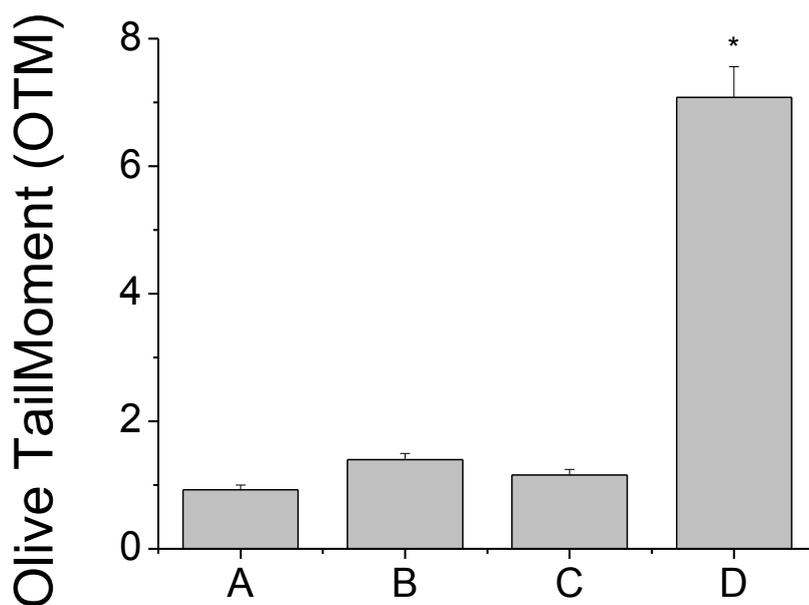


Figura 26: Ensaio cometa das células B16-F10. O gráfico mostra a OTM das células B16-F10 em função dos tratamentos.

A) DNA das células sem tratamento e mantidas no escuro. B) DNA das células tratadas e mantidas no escuro. C) DNA das células sem tratamento e irradiadas na dose de $36\text{J}/\text{cm}^2$. D) DNA das células tratadas e irradiadas na dose de $36\text{J}/\text{cm}^2$. O tratamento foi realizado para pigmentação M^+ . A dose foi calculada pela energia de $3,0\text{ mW}/\text{cm}^2$ e tempo de exposição 180'. “*” mostra significância estatística a $p < 0,01$ (ANOVA) dos três experimentos independentes.

Para confirmar se a quebra do DNA da Figura 26D foi ocasionada por espécies reativas geradas por fotossensibilização tipo I e tipo II, fez-se um experimento com células B16-F10 controle e M^+ irradiadas a $6\text{J}/\text{cm}^2$, cuja dose per se não mostrou quebra no DNA. Após lise das células, lesões no DNA foram reconhecidas por sítios sensíveis a endonucleases Fpg e Endo III que promovem a clivagem de ácidos nucleicos modificados. Bases pirimídicas modificadas foram reconhecidas pela enzima Endo III e bases púricas

modificadas foram reconhecidas pela enzima Fpg. O substrato 8-oxodGuo, que é produto da oxidação de guaninas por $^1\text{O}_2$ [190] foi reconhecido pela enzima Fpg e clivado. A cauda cometa foi 5x maior em relação ao controle (gráfico da Figura 27) e ilustrada pela imagem F da Figura 27. Além das lesões do DNA causadas por oxigênio singlete (fotossensibilização tipo II), outras espécies reativas, como os radicais livres (fotossensibilização tipo I) foram geradas nas células M⁺ irradiadas. O reconhecimento e clivagem do DNA lesionado foi mostrado também por meio da enzima Endo III (imagem 27E). Esse dado mostrou a existência de outras espécies reativas além do oxigênio singlete.

Portanto, células B16-F10 M⁺ irradiadas com luz visível sofreram lesões no DNA provocadas pelas espécies reativas geradas pela fotossensibilização tipo I e tipo II. Essas lesões foram comprovadas através do reconhecimento e clivagem pelas enzimáticas Fpg e Endo III (Figura 27).

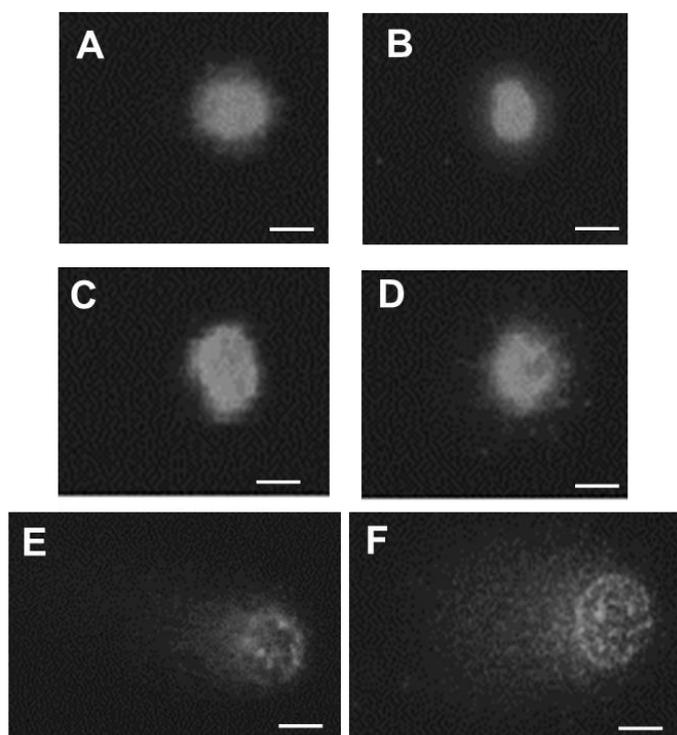
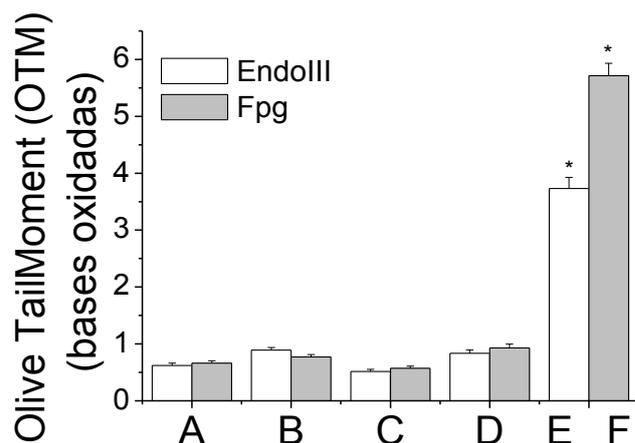


Figura 27: Ensaio cometa de bases oxidadas.

O gráfico mostra a fragmentação do DNA (OTM) das células B16-F10 em função dos tratamentos. As enzimas Endo III e Fpg foram utilizadas para mensurar bases oxidadas nas condições A,B,C,E,F. A) DNA das células sem tratamento e mantidas no escuro. B) DNA das células tratadas e mantidas no escuro. C) DNA das células sem tratamento e irradiadas na dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$. D) DNA das células tratadas e irradiadas na dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ por 30 min e não incubadas com as enzimas Endo III e Fpg. E) DNA das células tratadas e irradiadas na dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ por 30 min e incubadas com a enzima Endo III. F) DNA das células tratadas e irradiadas na dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ por 30 min e incubadas com a enzima Fpg. O tratamento foi realizado para pigmentação M^+ . A dose foi calculada pela energia de $3,0\text{ mW}/\text{cm}^2$ e tempo de exposição 30'. "*" mostra a significância estatística a $P < 0,01$ (ANOVA) dos três experimentos independentes.

No início da década de 80, fotobiologistas sabiam que a radiação UV-A era capaz de induzir respostas celulares. No entanto, os filtros solares em uso não protegiam a pele efetivamente contra os raios UV-A. Nessa época, a única foto-proteção vigente baseava-se no uso de filtros UVB [191–193]. A consequência disto é que grande parte dos cânceres de pele são devido a lesões causadas pela exposição ao UV-A [41,56,57].

Neste trabalho, foi possível contribuir para o conceito de que a luz visível excita a melanina, gera $^1\text{O}_2$ e outros radicais livres. Embora a proteção contra os raios UV-A e UV-B, ainda seja preponderante, esse achado indica que a proteção contra luz visível não deve ser ignorada, e sim deve ser considerada seriamente por profissionais da saúde, bem como, pela população em geral, porque a contínua exposição à luz solar visível, sem a devida proteção, poderá a longo prazo promover danos cumulativos na pele.

4.4 Pigmentação de células B16-F10 sem causar fototoxicidade pela luz visível

Estudos sobre a fotobiologia humana têm mostrado que a luz UV e visível geram pigmentação na pele [20,21]. A melanina possui a dualidade de proteger os tecidos biológicos por meio de mecanismo de filtro solar e antioxidante, mas também gera $^1\text{O}_2$ pela absorção de luz visível [194].

A síntese da melanina ocorre naturalmente a partir do aminoácido L-tirosina (Tyr) catalisada pela enzima tirosinase. Após sintetizada, a melanina se acumula nos olhos, cabelos e células da pele. A oxidação de biomoléculas por espécies reativas geradas por luz UV/visível desencadeia um processo de sinalização para produção de mais melanina e parada de ciclo celular [34,35]. Como forma não só de pigmentação, mas também de fotoproteção celular, a estratégia de estimular a pigmentação através da Acetil Tirosina com extratos proteicos e vitamina B2 (Unitan[®]), denominada aqui por UM⁺, foi investigada para evitar os efeitos colaterais da melanogênese M⁺ sob efeito de irradiação com luz visível.

A síntese de melanina foi induzida em células B16-F10 [142] que utilizam os substratos tirosina e cloreto de amônia para produzir melanina M⁺ (imagem da figura 28A); bem como, com o substrato acetil-tirosina e cloreto de amônia para produzir o fenótipo celular aqui designado UM⁺ (imagem figura 28B). Nota-se nas células M⁺, morfologias fusiformes com distribuição aleatória da melanina no interior celular, e em alguns casos com melanina sobreposta ao núcleo celular (ver seta da imagem da Figura 28A). As células UM⁺, por sua vez, apresentaram morfologia mais esférica e a distribuição da melanina foi

encontrada com maior frequência ao redor do núcleo conforme seta da figura 28B.

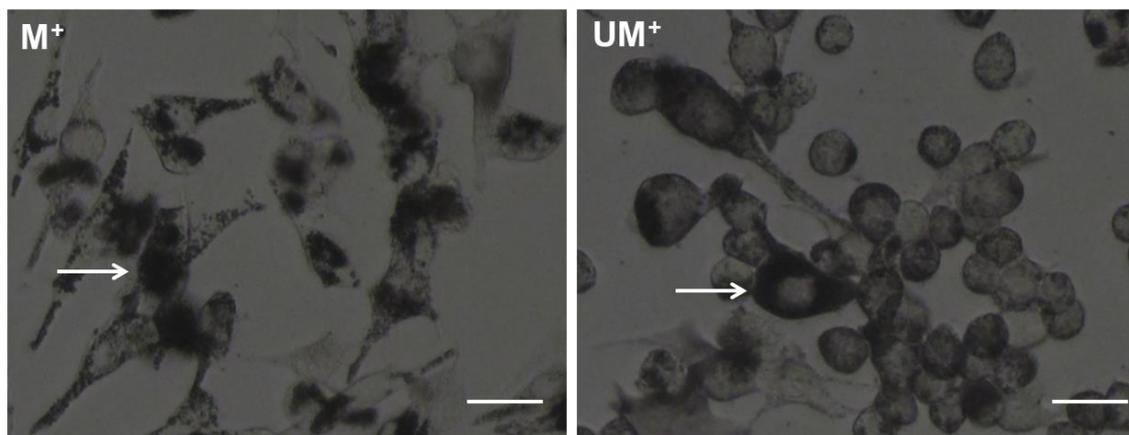


Figura 28: Pigmentação distinta das células B16-F10.

A imagem A mostra as células pigmentadas (M^+) por aminoácido tirosina + NH_4Cl . A imagem B mostra as células pigmentadas (UM^+) pelo derivado Acetil Tirosina (Unitan[®]) + NH_4Cl . As setas indicam a produção de melanina dentro das células. Ambas imagens possuem um aumento de 630x.

As células M^+ e UM^+ incubadas por 48 horas na estufa de cultura celular (imagens da Figura 28) foram submetidas à irradiação UV-B para confirmar a função de filtro protetor da melanina. A irradiação foi a $4,5J/cm^2$ de luz UV-B e a sobrevivência celular foi mensurada pela técnica de MTT. A Figura 29A mostra um decréscimo significativo de ~20% na viabilidade de células B16-F10 não tratadas (CT), quando irradiados sob a luz UV-B. Quando estas células foram submetidas às pigmentações M^+ e UM^+ e posteriormente irradiadas com UV-B não houve diminuição da sobrevivência celular (ver UM^+ e M^+ da Figura 29A), confirmando que as melaninas M^+ e UM^+ , produzidas pelas células B16-F10, agem como um filtro protetor contra os raios UV-B.

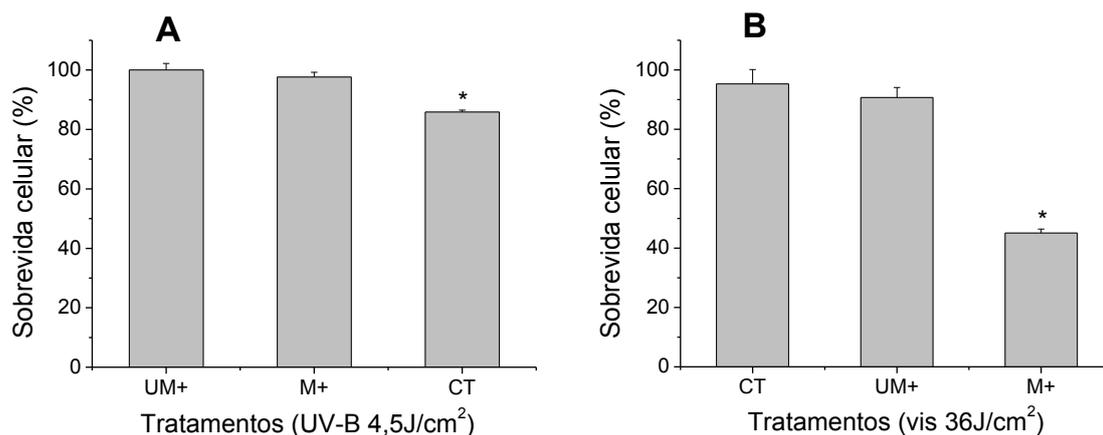


Figura 29: Melanina UM⁺ protege as células B16-F10 da irradiação UV-B e visível.

O gráfico A mostra a sobrevivência (%) das células B16-F10 não pigmentadas, pigmentadas M⁺, UM⁺ e irradiadas com dose UV-B de 4,5J/cm². A densidade energética foi 0,7 Mw/cm² para cálculo da dose UV-B em tempo de exposição de 30'. O gráfico B mostra a sobrevivência celular nas mesmas condições de tratamento e irradiadas com luz visível a 36J/cm². A densidade energética foi 3,0mW/cm² para cálculo da dose visível em tempo de exposição de 180' "**" mostra a significância estatística a P <0,05 (ANOVA) dos três experimentos independentes

Realizou-se também um experimento de viabilidade (MTT) para confirmar se a célula M⁺ atinge o IC₅₀ após irradiação visível, conforme dado da Figura 23, e comparar com a melanina UM⁺. O gráfico 29B confirmou que a célula M⁺ atinge o IC₅₀ após irradiação com luz visível (36J/cm²). Em contrapartida, a luz visível não se mostrou fototóxica para células com nível aumentado de expressão da melanina UM⁺, uma vez que a sobrevivência das células UM⁺ se mantiveram próximo a 100%, como o controle (CT) (Figura 29B). Nota-se portanto que o pigmento UM⁺ protege as células contra irradiação UV-B e visível.

Realizou-se experimentos de tipos de morte com células M⁺ e UM⁺ para confirmar se a melanina UM⁺ era de fato não fototóxica. Irradiou-se as células B16-F10 sob luz visível (36J/cm²) e os mecanismos de morte foram avaliados através da análise morfológica usando corante iodeto de propídeo (IP) e

marcação da proteína Caspase-3 ativa. Células que sintetizaram melanina M⁺ confirmaram o dano em membrana e marcação do DNA com IP conforme marcação em vermelho do DNA nuclear (ver seta branca do tratamento M⁺ da figura 30A). A marcação de caspase-3 também foi confirmada pelo mesmo tratamento M⁺ após irradiação (ver seta branca do tratamento M⁺ da figura 30B). Em contrapartida, células que sintetizaram UM⁺ não foram coradas com IP (imagens UM⁺ da figura 30A) e não mostraram marcação da proteína Caspase-3 ativa (imagens UM⁺ da figura 30B) após irradiação visível (Figura 30). Isso mostra que de alguma forma a melanina UM⁺ não é fototóxica, sendo capaz de manter a integridade e homeostase celular, sem indução de apoptose e necrose (Figura 30) após irradiação sob luz visível, como o observado para M⁺.

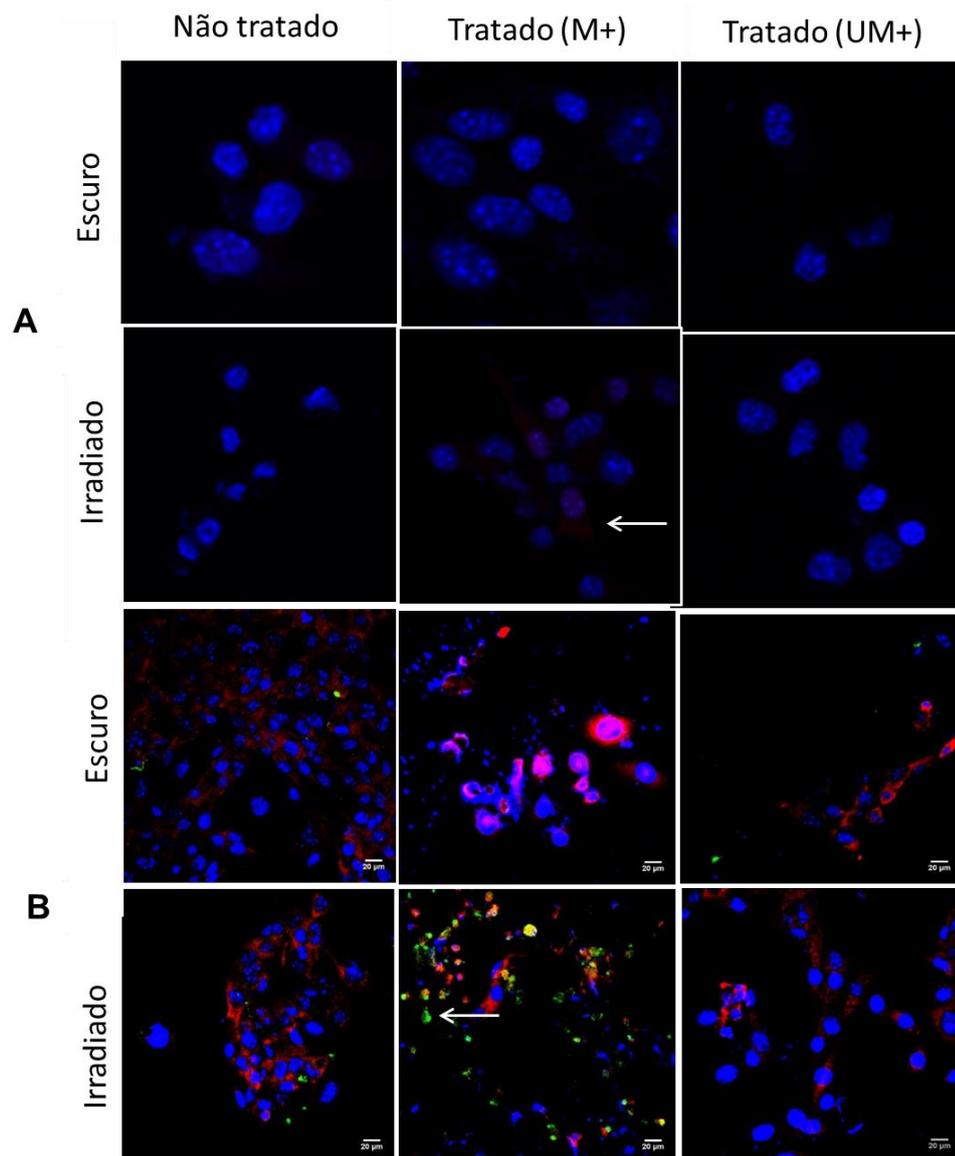


Figura 30: Efeitos da luz visível em células B16-F10 pigmentadas com diferentes protocolos.

A marcação em azul de todas as imagens A e B da figura representa o DAPI que reconhece o DNA nuclear das células. A coloração em vermelho das imagens em B refere-se a marcação da proteína COXIV de mitocôndria ativa. A seta mostrada em A representa a incorporação de iodeto de propídeo (coloração vermelha) em células B16-F10 após pigmentação M+ e irradiação visível de $36\text{J}/\text{cm}^2$. A seta em B mostra a marcação de Caspase-3 ativa (coloração verde) após pigmentação M+ e irradiação visível de $36\text{J}/\text{cm}^2$. A dose foi calculada pela energia de $3,0\text{ mW}/\text{cm}^2$ e tempo de exposição de 0 e 180'.

Dados das seções anteriores mostraram que mudanças na estrutura da melanina aceleram os mecanismos de foto-oxidação e geração de oxigênio singlete, causando lesões no DNA. Por isso faz-se necessário aqui, investigar o

comportamento da melanina UM^+ na quebra do DNA celular. Os efeitos dos dois métodos de pigmentação foram distintos em relação à quebra do DNA genômico. Células submetidas ao protocolo UM^+ não mostraram quebra do DNA após exposição à irradiação visível (ver coluna E da figura 31), o que claramente aconteceu no caso do modelo celular M^+ (ver coluna F da figura 31).

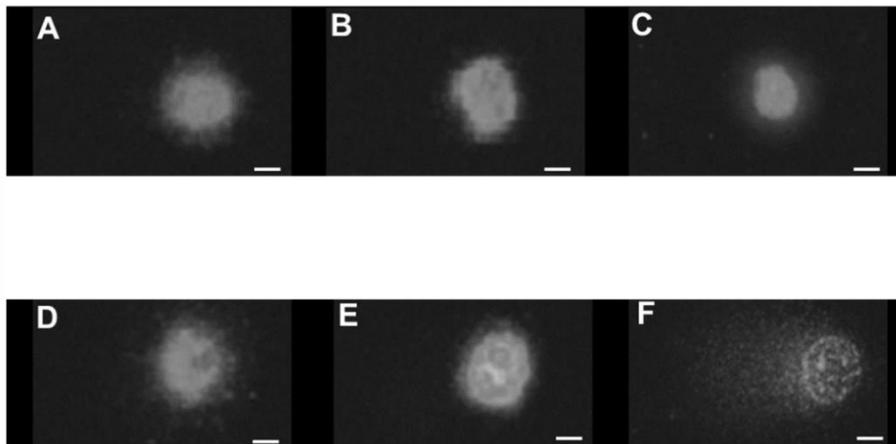
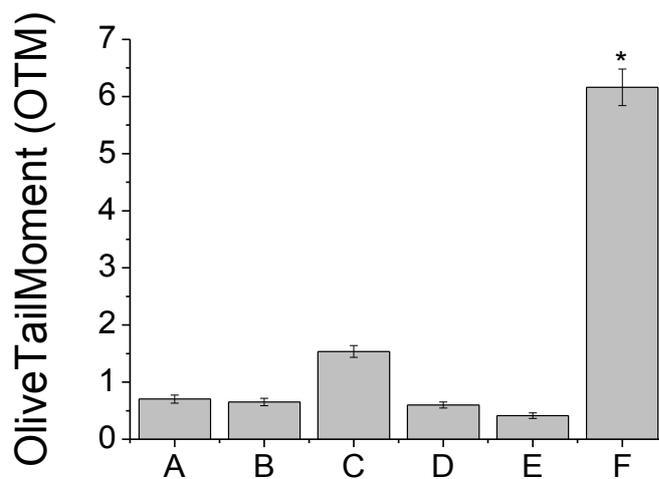


Figura 31: Ensaio cometa: O gráfico mostra a quantificação da fragmentação do DNA (Olive TailMoment) em células B16-F10 em condições de A a F.

A) DNA das células sem tratamento e mantidas no escuro. B) DNA das células tratadas com Acetil Tyr + NH_4Cl (UM^+) mantidas no escuro. C) DNA das células tratadas com Tyr + NH_4Cl (M^+) mantidas no escuro. D) DNA das células não tratadas e irradiadas na dose de $36J/cm^2$. E)

DNA das células tratadas com Acetil Tyr + NH₄Cl (UM⁺) e irradiada na dose de 36J/cm². F) DNA das células tratadas com Tyr + NH₄Cl (M⁺) e irradiada na dose de 36J/cm². A dose foi calculada pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição 180'. As imagens apresentam aumento de 400X. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P <0,01 (ANOVA) dos três experimentos independentes em relação ao controle.

Esse dado corrobora com a preservação da membrana plasmática e não indução de morte celular por apoptose (Figura 30) no modelo celular UM⁺ quando excitada no visível. Cabe, neste momento, questionar se há diferenças na fotossensibilização da melanina gerada no protocolo celular UM⁺ comparada com o protocolo M⁺. A geração de ¹O₂ foi quantificada, como nos exemplos anteriores desta tese, através da medida de emissão no infravermelho próximo (Figura 32).

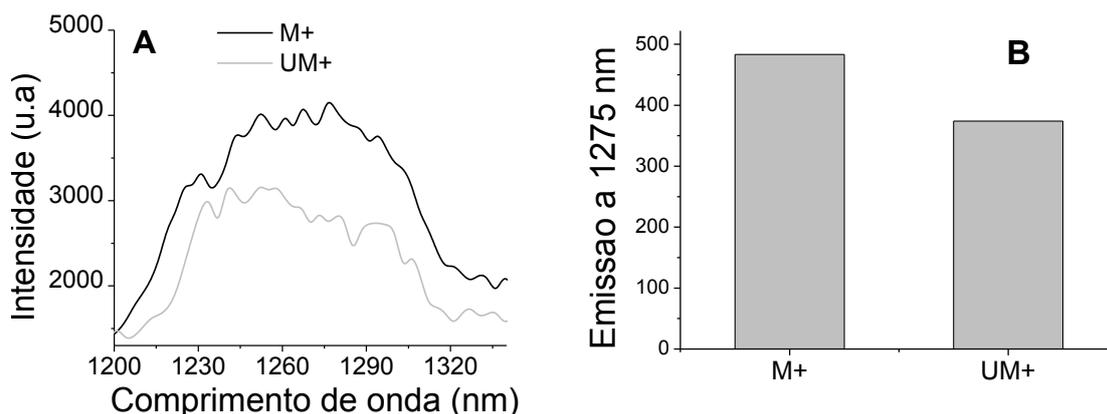


Figura 32: Geração de ¹O₂ das melaninas M⁺ e UM⁺ extraídas das células B16-F10.

O gráfico mostra a detecção de ¹O₂ (1270 nm) das melaninas M⁺ e UM⁺ excitadas a 532 nm. O espectro de linha preta mostra a geração de ¹O₂ da melanina M⁺. O espectro de linha cinza mostra a geração de ¹O₂ da melanina UM⁺. O gráfico B mostra a quantificação das áreas dos espectros M⁺ e UM⁺ do gráfico A.

Melaninas M⁺ e UM⁺ foram extraídas das células B16-F10 e normalizadas pela quantificação de proteínas totais conforme método de Bradford [143]. A quantidade de melaninas M⁺ e UM⁺ extraídas das células foram semelhantes (ver barras "melanina" na Figura 33). No entanto, a geração

de $^1\text{O}_2$ (exc 532nm) pela melanina M^+ foi maior que a geração de $^1\text{O}_2$ pela melanina UM^+ (Figura 32A). O gráfico de barras da figura 32B mostra a quantificação da área (emissão a 1275nm) dos espectros de $^1\text{O}_2$ das melaninas M^+ e UM^+ . A barra UM^+ do gráfico 32B mostrou queda de aproximadamente 25% na geração de $^1\text{O}_2$ em comparação com a melanina M^+ .

Investigou-se também a geração de $^1\text{O}_2$ das melaninas M^+ e UM^+ dentro das células B16-F10 (melaninas não extraídas) e constatamos que a melanina M^+ gera mais $^1\text{O}_2$ que a melanina UM^+ (ver barras " $^1\text{O}_2$ " na Figura 33). Ambos os dados (geração de $^1\text{O}_2$ nas Figuras 32 e 33) mostraram menor geração de $^1\text{O}_2$ pela melanina UM^+ quando excitada a 532nm. Esses dados sugerem que a melanina M^+ não só gera menos $^1\text{O}_2$ (PS tipo II), mostrado pela ausência de dano em membrana e ausência da marcação do DNA com iodeto de propídeo como também a diminuição da geração de radicais livres (PS tipo I) mostrado pela ausência de apoptose (marcação de caspase-3) (Figura 30) e quebra do DNA genômico (Figura 31). A barra "sobrevida celular" na Figura 33 mostra que a viabilidade das células M^+ cai a metade (IC_{50}), mostrando que a melanina M^+ é fototóxica. Em contrapartida, as células produtoras de melanina UM^+ mantêm viabilidade semelhante às células controle (próximo a 100% de viabilidade). A manutenção da viabilidade das células UM^+ indica que além da queda na geração de $^1\text{O}_2$, ocorreu também a queda de geração de radicais na fotossensibilização UM^+ mostrada pelos dados de apoptose, iodeto de propídeo (figura 30) e pelos dados de sobrevivência celular (figura 33). De alguma forma, a geração de $^1\text{O}_2$ modulada pela melanina UM^+ não promove dano genotóxico, já que o DNA nuclear foi preservado após irradiação (ver Figura 31E).

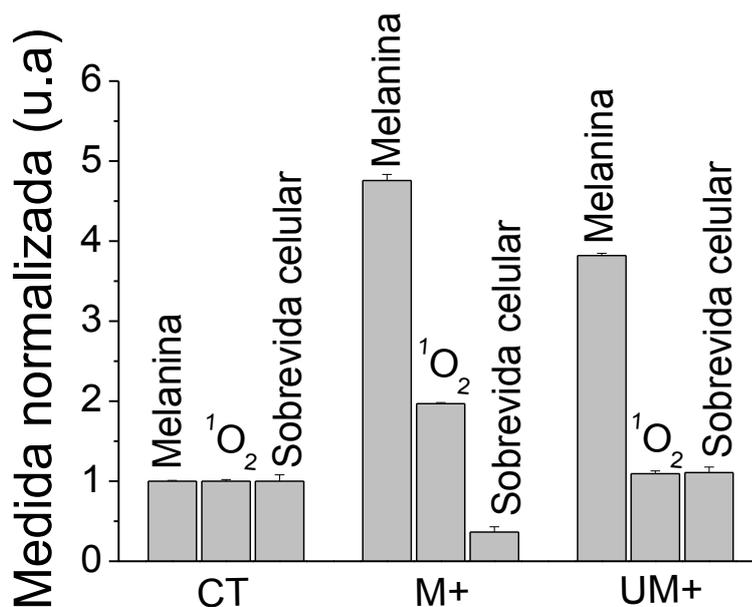


Figura 33: Quantificação de melanina, oxigênio singlete e sobrevida celular.

O gráfico mostra as medidas normalizadas em função dos tratamentos controle (CT) e células pigmentadas M⁺ e UM⁺. As primeiras barras de cada grupo mostram as quantificações das melaninas extraídas das células B16-F10 controle (CT) e estimuladas a pigmentação M⁺ e UM⁺. As segundas barras mostram quantificação do ¹O₂ das melaninas dentro das células. As terceiras barras mostram a sobrevida celular (%) das três condições de pigmentação (CT, M⁺ e UM⁺), pelo ensaio colorimétrico MTT, das células irradiadas na dose 36J/cm² a energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição 180'.

Logicamente, deve haver uma provável diferença das moléculas de melanina M⁺ e UM⁺. Investigou-se, portanto, o tamanho, forma e a massa dos polímeros de melanina M⁺ e UM⁺ extraídos das células B16-F10 por meio das técnicas de espalhamento de luz dinâmico, espalhamento de luz ressonante e espectro de massas, que estão apresentados respectivamente, na tabela 2, figuras 34 e 35. O raio hidrodinâmico (Tabela 2), o perfil de espalhamento de luz ressonante (Figura 34) não apresentaram distinções significativas entre as melaninas M⁺ e UM⁺. Embora o espectro de massas UM⁺ (espectro rosa da figura 35) apresentou mais picos (644,66; 673,64; 940,60) que o espectro M⁺ (espectro verde da figura 35), não se pode afirmar que as melaninas possuem

grandes diferenças estruturais apesar das diferenças dos espectros de intensidade de $^1\text{O}_2$ (Figura 32).

Tabela 2: Raio hidrodinâmico obtido por espalhamento de luz dinâmico de grânulos das melaninas produzidos nos protocolos M^+ e UM^+ .

Tipos de melanina	Tamanho (nm)
M^+	159,05 \pm 0,3
UM^+	153,15 \pm 0,6

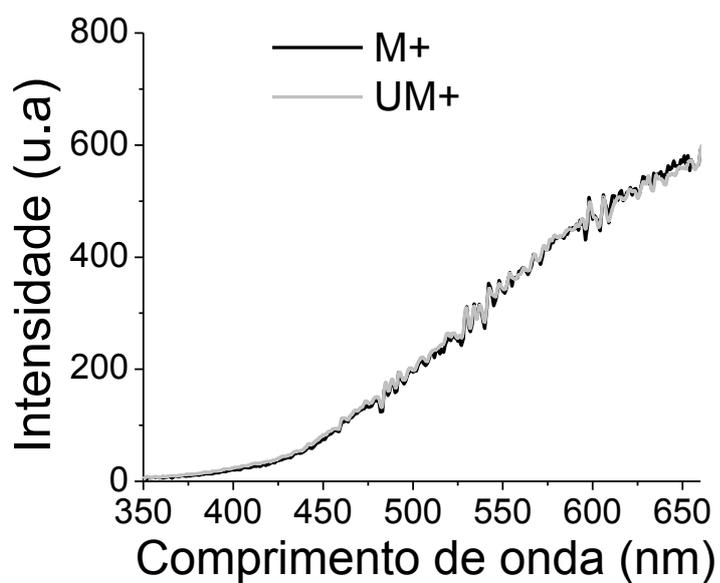


Figura 34: Espalhamento de luz ressonante das melaninas M^+ e UM^+ extraídas das células B16-F10.

O gráfico mostra o espalhamento de luz ressonante sendo a linha preta representada por M^+ e a linha cinza representada por UM^+ .

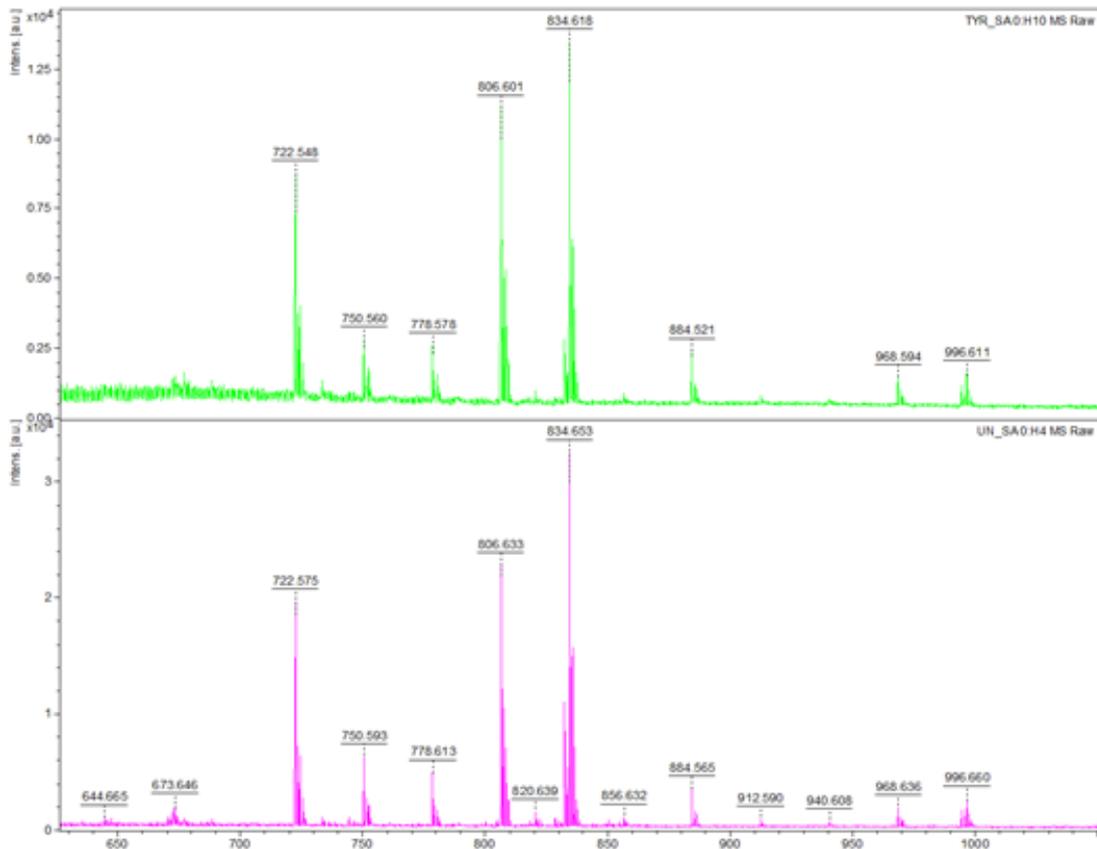


Figura 35: Espectro de massa das melaninas M⁺ e UM⁺ extraídas das células B16-F10.

Os espectros mostram os picos de M⁺ (picos em verde no primeiro espectro); os picos de UM⁺ (picos em rosa no segundo espectro) mostram as similaridades na massa de ambas melaninas (M⁺ e UM⁺) extraídas das células B16-F10.

As imagens da Figura 36 mostram células B16-F10 controle (CT) com morfologia esférica e sem pigmentação expressiva. Já as células pigmentadas M⁺ e UM⁺ apresentam maior pigmentação, mas com diferenças na morfologia e na localização da melanina sintetizada (Figura 36). As células UM⁺ apresentam-se com morfologia esférica, semelhante ao controle e com concentração de melanina ao redor do núcleo e com distribuição de melanina mais homogênea. Por outro lado, as células M⁺ apresentam-se com morfologia mais alongada e com distribuição de melanina aleatória, estando sobreposta ao núcleo e podendo estar localizada no interior do mesmo. Estas características de localização do pigmento podem estar correlacionadas com as diferenças de

fototoxicidade pela geração de $^1\text{O}_2$ e dano no DNA (Figuras 31, 32 e 33) entre as melaninas M^+ e UM^+ apesar de ambos polímeros apresentarem similaridade no tamanho (tabela 3), no arranjo (Figura 34) e na massa (Figura 35). Sugere-se que a grande diferença possa estar relacionada com a localização dos grânulos de melanina no ambiente intracelular, o que pode então influenciar na exposição dos cromóforos.



Figura 36: Morfologia das células B16-F10 controle e pigmentadas. As imagens mostram as células controle e a pigmentadas (M^+ e UM^+) em aumento de 100x.

O esquema da Figura 37 resume os processos fotofísicos que ocorrem no interior das células com melaninas M^+ e UM^+ . As células produtoras da melanina M^+ sofreram apoptose e necrose secundária desencadeada por danos bruscos em membranas celulares (lisossomas, mitocôndrias) e no DNA, através da fotossensibilização tipo I e tipo II por luz visível. Em contrapartida, células produtoras de UM^+ não sofreram morte celular apoptótica devido à preservação da membrana e do DNA genômico. Isso ocorre porque UM^+ gera menos radicais e $^1\text{O}_2$ *in vivo* do que M^+ (Figura 33), apesar de promover a geração de $^1\text{O}_2$ *in vitro* (Figura 32). A partir desses resultados, propõe-se que a não fototoxicidade de UM^+ possa ser atribuída mais intimamente à localização

do pigmento do que simplesmente pela quantidade de espécies reativas geradas.

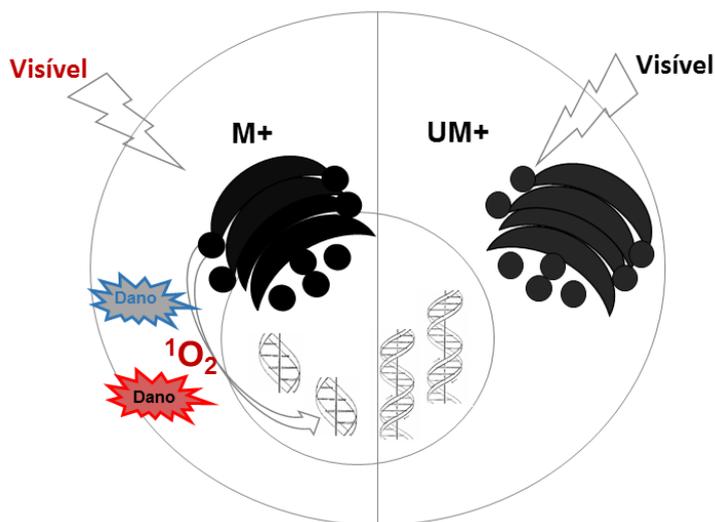


Figura 37: Representação esquemática da produção de melanina M⁺ e de melanina UM⁺.

Descreveu-se que a melanina M⁺ absorve a luz visível e se comporta como um fotossensibilizador, gerando 1O_2 e induzindo apoptose celular. E mesmo sob baixas doses de irradiação ($6J/cm^2$) a melanina M⁺ sob a luz visível promove dano no DNA genômico, conforme a formação de 8 oxo-dGuo gerados por 1O_2 . Dessa forma, se a fotossensibilização da melanina pela luz visível tem caráter genotóxico, não se pode deixar de discutir a relevância disso na saúde pública, frente ao risco que ela representa como fator etiológico para o câncer de pele.

No entanto, os dados obtidos das melaninas M⁺ e UM⁺ indicam que a exposição dos cromóforos em uma localização subcelular ainda não conhecida, pode esclarecer mais detalhes sobre este mecanismo (Figura 37). Por fim, pode-se dizer que houve um grande avanço no conhecimento, nortado pelo fato da melanina UM⁺ promover pigmentação saudável, atendendo à necessidade de um fotoprotetor contra luz visível.

4.5 Efeitos e mecanismos da luz UV-A em células da pele.

4.5.1 Homeostase celular e $^1\text{O}_2$

Diversas moléculas endógenas da pele absorvem luz na faixa do UV-A (320 a 400 nm), podendo gerar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) após fotossensibilização. Essas reações de fotossensibilização podem levar a danos em biomoléculas e comprometimento da homeostase celular e estabilidade genômica [19]. A quantidade de energia absorvida pelas moléculas endógenas pode gerar espécies reativas suficiente para desencadear a morte celular. No entanto, danos iniciais podem gerar condições para efeitos não lineares, ou seja, que não dependem linearmente da dose de luz empregada, pois outros compostos fotossensibilizantes podem ser gerados no processo.

A lipofuscina, por exemplo, é um produto da fotossensibilização sob a luz UV-A, com características espectroscópicas semelhantes à melanina (Figura 38). Por isso, a lipofuscina pode gerar $^1\text{O}_2$ e causar dano celular e genotóxico, quando excitadas pela luz visível.

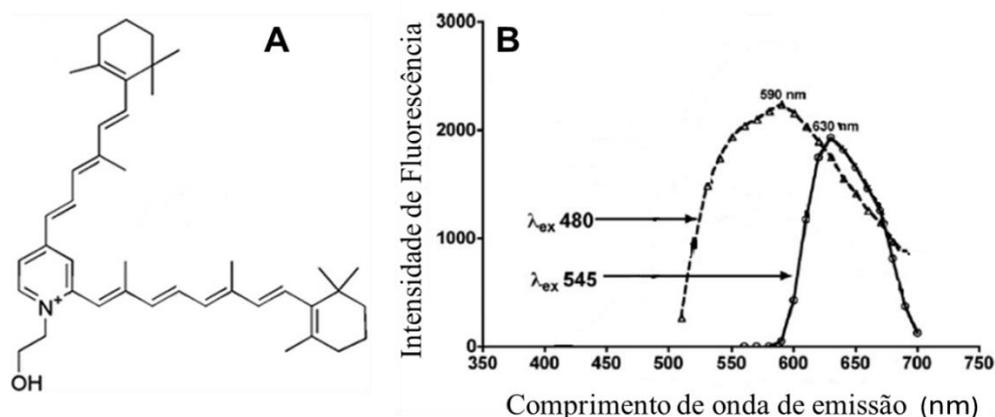


Figura 38: Estrutura e espectro da lipofuscina.

(A) mostra a estrutura molecular da lipofuscina e (B) mostra seu espectro de intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda no visível [118,195].

A literatura ainda não aborda de maneira quantitativa a energia UV-A necessária para produção de lipofuscina, sem causar danos bruscos à sobrevivência celular, de tal forma que esse assunto é alvo de investigação atual. Por isso, iniciou-se este trabalho quantificando o dano celular, estresse oxidativo e tipos de morte UV-fotoinduzidos, para se caracterizar possíveis biomoléculas produzidas pela fotossensibilização sob a luz UV-A. Estas podem absorver no visível e acelerar o foto envelhecimento e estabelecer algum risco de tumorigênese humana.

Os gráficos da Figura 39 mostram a porcentagem de sobrevivência celular em função das doses de luz, quantificadas por meio da atividade de enzimas mitocondriais (MTT) (A), incorporação do vermelho neutro nos lisossomos (NRU) (B) e incorporação do cristal violeta (CVS) (C) em células de macrófagos (J774) e queratinócitos (HaCaT), respectivamente. As três metodologias de avaliação da sobrevivência celular (MTT, NRU e CVS), indicaram que doses abaixo de $12\text{J}/\text{cm}^2$ apresentaram viabilidade celular ~ 95% e a partir da dose $12\text{J}/\text{cm}^2$ a sobrevivência diminuiu para 70%, sendo a IC_{50} atingida a doses de UV-A entre 12 e $18\text{ J}/\text{cm}^2$ (Figuras 39A, 39B e 39C).

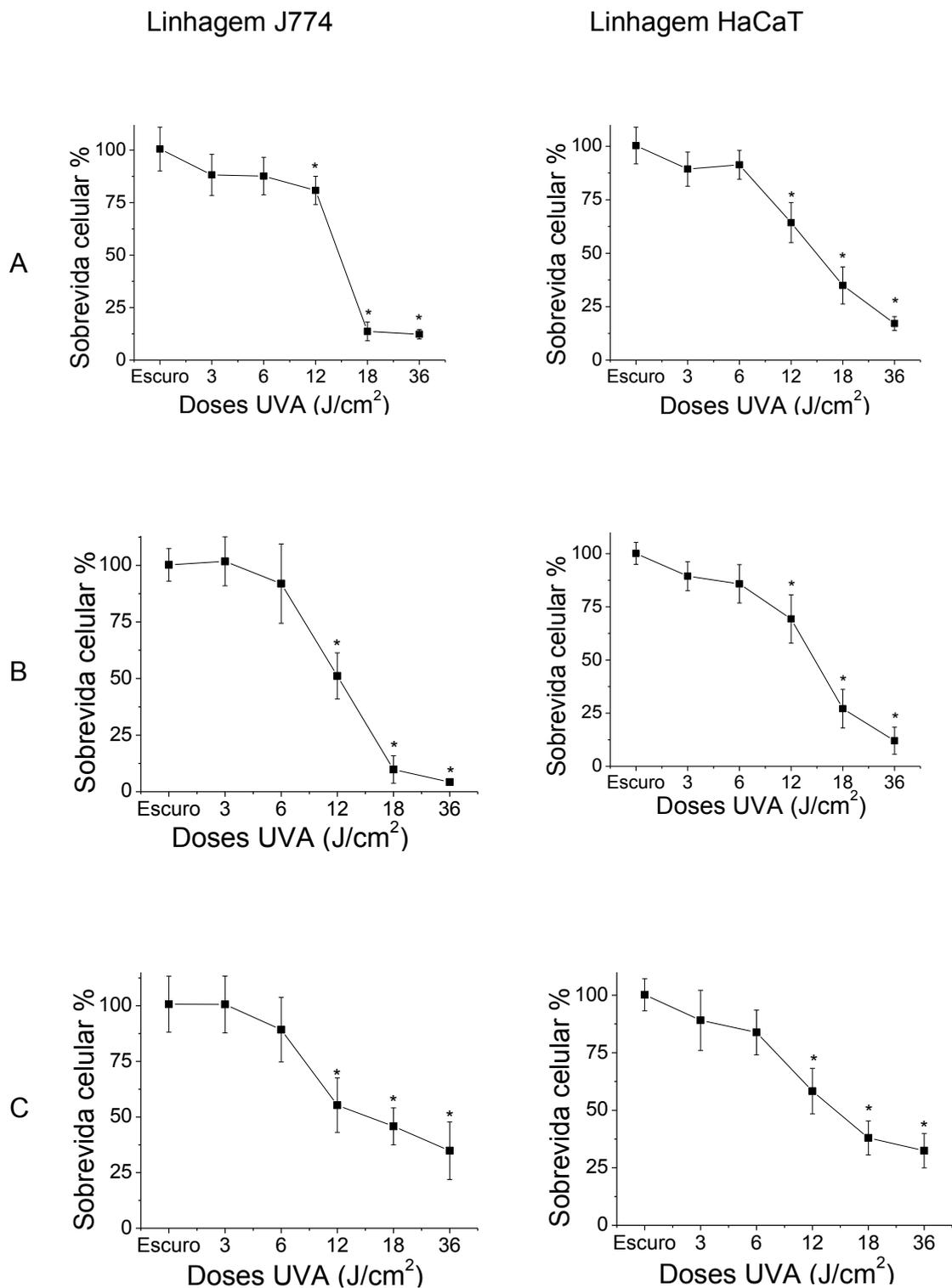


Figura 39: Luz UV-A afeta a sobrevivência de células J774 e HaCaT.

Os gráficos A, B e C mostram a sobrevivência celular através dos ensaios de MTT, NRS e CVS das células J774 e HaCaT em função das doses de luz UV-A. As doses foram calculadas pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição 0, 15', 30', 60', 90' e 180'. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P < 0,05 (ANOVA) dos três experimentos independentes em relação ao controle escuro.

É interessante observar que nas doses $18\text{J}/\text{cm}^2$ e $36\text{J}/\text{cm}^2$ ocorreu mais morte em macrófagos J774 do que em queratinócitos HaCaT demonstrado pelo ensaio MTT (Figura 39A) e pelo ensaio NRU (Figura 39B). Isso mostra que diferentes tipos celulares podem ativar mecanismos de sinalização distintos, mesmo com a mesma quantidade de energia de excitação. Sugere-se, portanto, que os mecanismos imunológicos e de morte estão relacionados a diferentes tipos celulares, sendo diretamente susceptíveis aos processos redox. Ao se observar a queda de 30% da sobrevivência de ambos os tipos celulares pós 48 horas da irradiação na dose de $12\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 39), pode-se inferir que um certo desbalanço redox já foi atingido. Esse surto redox foi avaliado através da diminuição da glutatona reduzida (GSH) e aumento da glutatona oxidada (GSSG). Conforme pode-se visualizar na Figura 40A e 40B, já na dose UV-A $3\text{J}/\text{cm}^2$ há oxidação de GSH de células J774 e HaCaT (ver relação GSH/GSSG dos gráficos da Figura 40).

A drástica oxidação de GSH intracelular (a partir da dose UV-A $6\text{J}/\text{cm}^2$) em ambos tipos celulares ocasionou um saldo maior de EROs que reagiram com a sonda H_2DCFDA , mostrado pelo aumento da fluorescência desta sonda, que está apresentado nos gráficos C e D da Figura 40 [100,101]. Isso provocou a queda de ~5% na viabilidade celular (avaliada 48 horas após irradiação UV-A $6\text{J}/\text{cm}^2$, Figura 39). Nessa condição de irradiação ($6\text{J}/\text{cm}^2$), a taxa de produção de radicais livres e de $^1\text{O}_2$ superou a taxa de supressão, ocasionando portanto o surto de desbalanço redox [196].

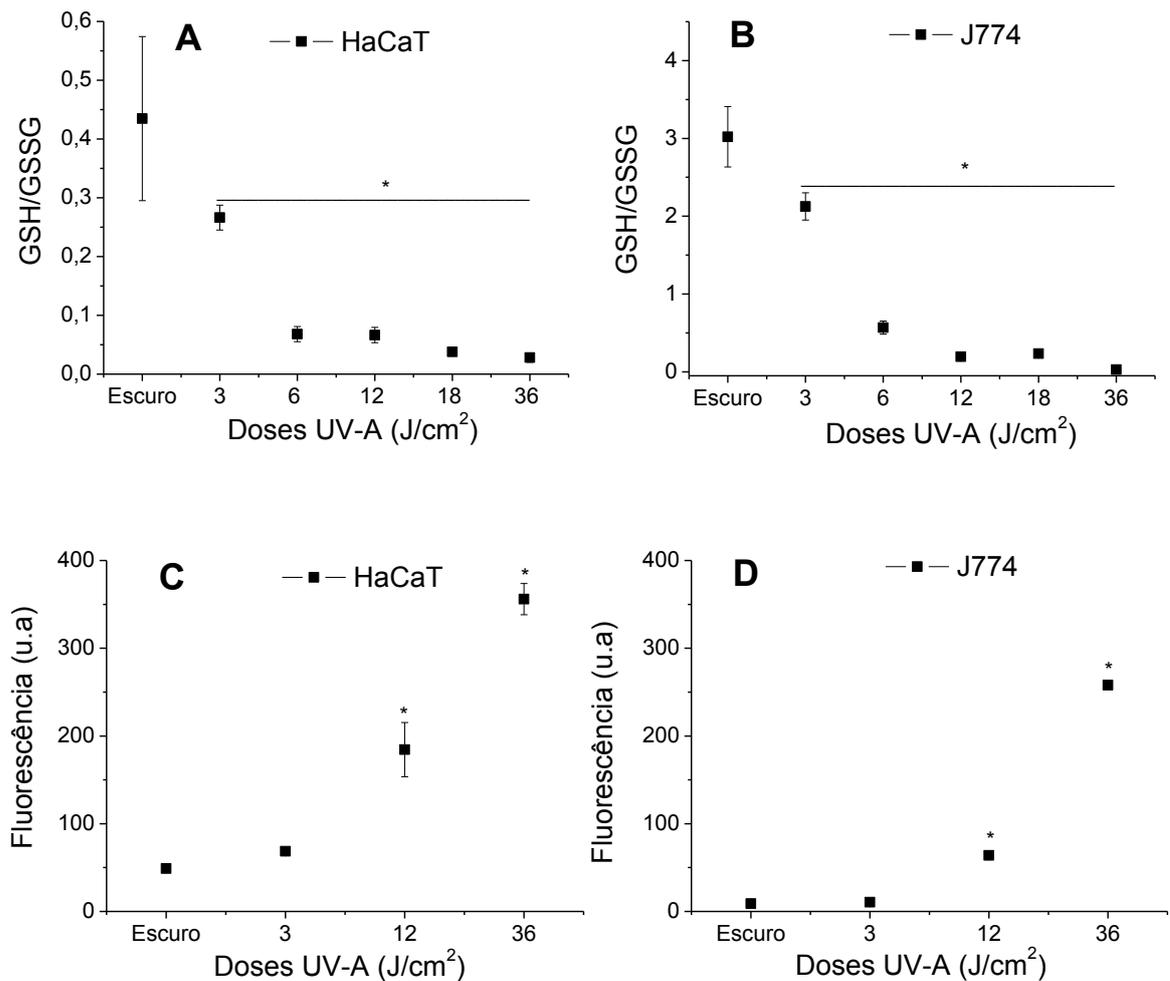


Figura 40: Efeitos da Luz UV-A na geração de EROs em células HaCaT e J774.

Os gráficos A e B mostram a relação entre GSH/GSSG e os gráficos C e D mostram a oxidação da sonda H₂DCFDA pela luz UV-A em células HaCaT e J774. As doses foram calculadas pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição 0, 15', 30', 60', 90' e 180'. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P <0,05 (ANOVA) dos três experimentos independentes em relação ao controle escuro.

O aumento das espécies reativas e indução de morte (UV-A 12J/cm²) mostrados aqui pelas figuras 39 e 40 correlacionaram com a literatura [39] onde células XP-C irradiadas a dose UV-A (15J/cm²) na cidade de São Paulo-Brasil (11:00am-12:00pm; 23° 3'S) mostraram genotoxicidade com formação de bases oxidadas e fotoprodutos 6-4 (6-4PP) [39].

Além da geração de dano direto do desbalanço redox, foi importante correlacionar a absorção de luz com a geração de ERO_s, utilizando um mimético de flavina sintetizado no laboratório (Tarf-Me, riboflavina acetilada e metilada - Tese de Doutorado Alexandre Vieira – IQUSP 2013). Para isso, iniciaram-se experimentos com células de macrófago J774 por ser conhecido que esse tipo celular incorpora bem a Tarf-Me (por ser uma célula fagocitária). Inicialmente, desenvolvemos um protocolo de incorporação, que permitiu a internalização eficiente da Tarf-Me e medidas de absorção e emissão desta sonda no ambiente intracelular. Como pode ser observado nas Figuras 41A e 41B, a suspensão de células apresenta absorção com máximo em 450 nm e emissão no verde, que são características fotofísicas da Tarf-Me (Tese do Alexandre Vieira Silva - IQUSP 2013) [158]. Além disso, conseguiu-se quantificar o aumento da geração de ¹O₂ intracelular na presença de Tarf-Me incorporada (Figura 41C). A geração de ¹O₂ pelas flavinas endógenas, como às presentes em FMN e FADH₂ mitocondriais, é tida como um dos mecanismos que explicam o efeito da luz UV-A em células epiteliais [70,74,75,197,198]. Na presença de Tarf-Me, ocorre o aumento significativo na geração de ¹O₂ (ver linha cinza do espectro 41C), o que está de acordo com esta hipótese.

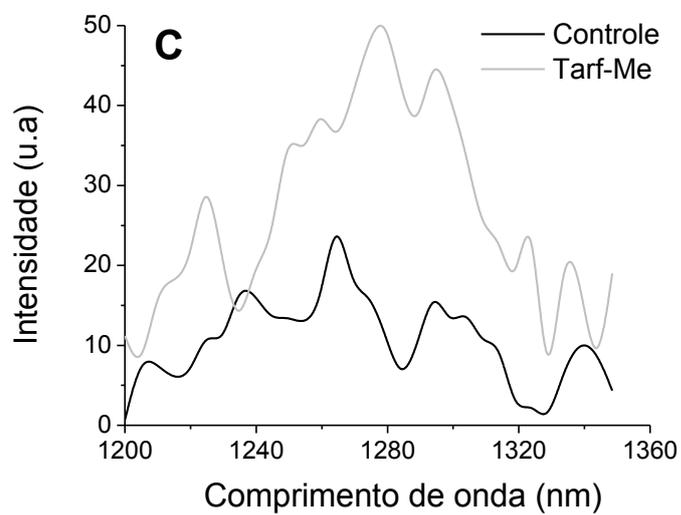
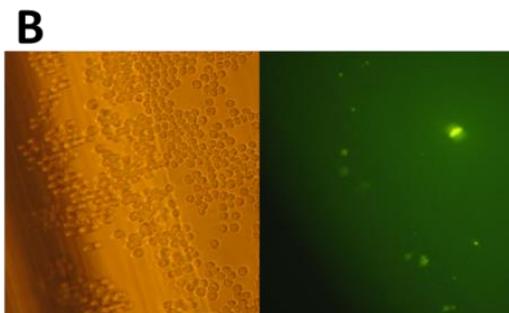
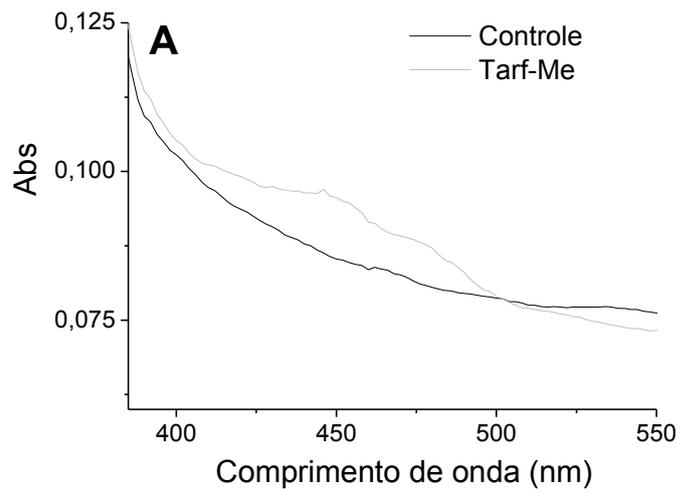


Figura 41: Incorporação do derivado da riboflavina Tarf-Me pelas células J774.

O gráfico A mostra o espectro de absorção e a imagem B amarela são células J774 (aumento de 400x) que incorporaram a Tarf-Me mostrada pela fluorescência verde (exc 488nm). O gráfico C mostra o espectro de geração de $^1\text{O}_2$ das células J774 controle e incubadas com Tarf-Me.

Na Figura 42A está apresentada a percentagem de sobrevivência das células J774 incubadas ou não com Tarf-Me e com sorbato e tratadas com dose única de UV-A $6\text{J}/\text{cm}^2$ ou mantidas sem iluminação própria. As incubações com Tarf-Me e com sorbato não causaram variações significativas na viabilidade celular, sendo que a irradiação UV-A sozinha diminuiu a viabilidade em apenas ~5% (Figura 42A), de acordo com dados anteriores (Figura 39). Em contrapartida, quando as células foram incubadas com Tarf-Me e sinergicamente irradiadas na dose UV-A $6\text{J}/\text{cm}^2$, as mesmas sofreram queda na viabilidade, que chegou a um valor próximo ao IC_{50} (Figura 42). Assim, confirmou-se que a riboflavina age como fotossensibilizador intracelular [70,74,75,197] por gerar $^1\text{O}_2$ e comprometendo a sobrevivência celular. O Sorbato, que age em grande parte como supressor de espécies tripletes e de $^1\text{O}_2$ [199], foi administrado junto com as células incubadas com Tarf-Me e irradiadas na mesma dose UV-A. O resultado mostrou sobrevivência celular 75% (Tarf+Sorbato da Figura 42A), ou seja, proteção contra os efeitos fototóxicos da Tarf-Me. Esse dado sugere que a supressão do $^1\text{O}_2$ e dos tripletes da Tarf-Me protegem as células, efeito esse que pode ser mensurado diretamente através da diminuição do tempo de vida e da quantidade de oxigênio singlete gerada no ambiente intracelular (Figura 42).

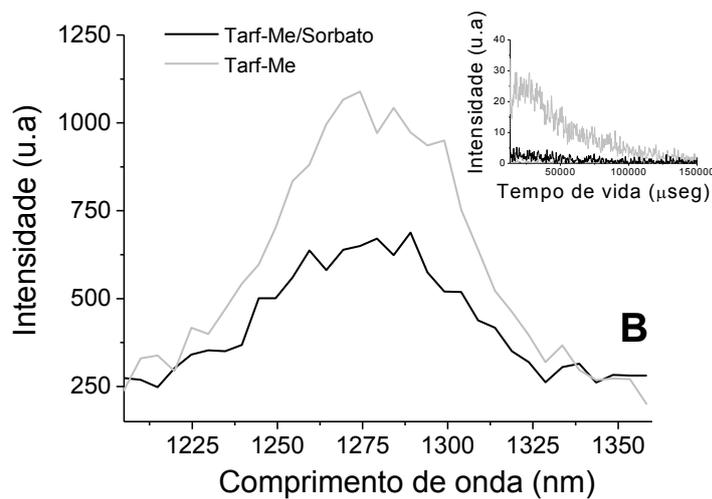
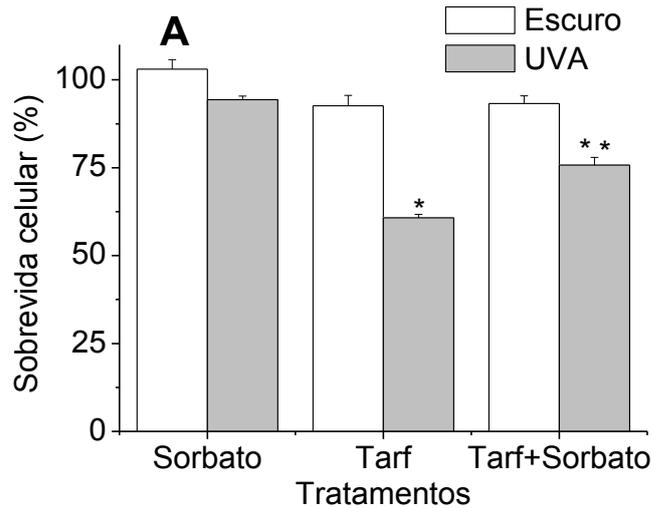


Figura 42: Luz UV-A é absorvida por moléculas endógenas das células J774.

O gráfico A mostra a sobrevivência das células não tratadas e tratadas com Tarf-Me + Sorbato e irradiadas em dose UV-A. O gráfico B mostra a geração de oxigênio singleto das células não tratadas e tratadas com Tarf-Me + Sorbato e excitadas a 355nm. Todos os tratamentos foram realizados no escuro e sob irradiação UV-A na dose $6\text{J}/\text{cm}^2$ nos tempos de exposição de 30'. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a $P < 0,05$ (ANOVA) de três experimentos independentes.

A geração de oxigênio singleto e a indução de morte em macrófagos J774 Tarf-Me fotoexcitada, despertou o interesse em se investigar se o mesmo efeito ocorreria em queratinócitos HaCaT. Para isso, incubaram-se as células

HaCaT com Tarf-Me nas mesmas condições de tratamento e irradiação realizadas para os macrófagos J774 (Figura 42). O resultado da sobrevivência celular foi semelhante nos dois tipos celulares (Figuras 42A para J774 e Figura 43 para HaCaT). Aqui, as células HaCaT foram também incubadas com a sonda Diferiprona (Dfp), que geralmente suprime a geração do radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) na reação de Fenton, por ser um poderoso quelante de ferro [159]. O gráfico da Figura 43 mostra um aumento de 50% na sobrevivência celular devido à essa supressão de estresse oxidativo ferro-dependente.

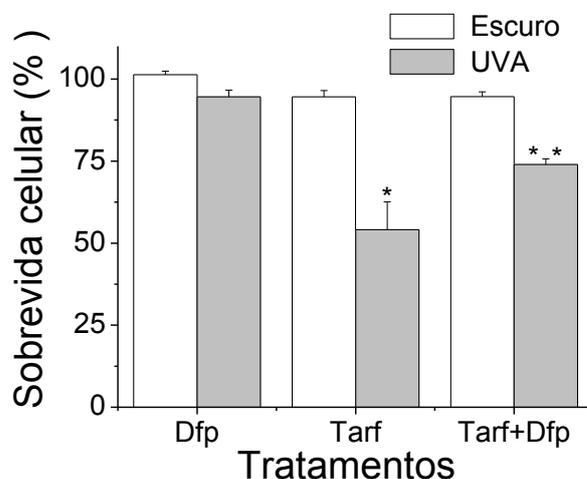


Figura 43: Luz UV-A é absorvida por moléculas endógenas das células HaCaT.

O gráfico mostra a sobrevivência das células HaCaT tratadas e não tratadas com Diferiprona (Dfp). "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a $P < 0,05$ (ANOVA) dos três experimentos independentes.

Não há especificidade do Sorbato para a supressão do $^1\text{O}_2$ (Figura 42) e da Diferiprona para a supressão do radical $\text{OH}\cdot$ (Figura 43). No entanto, os dados confirmaram que a foto-excitação da riboflavina pela luz UV-A gera espécies reativas através da fotossensibilização Tipo I e Tipo II que podem sinalizar para os mecanismos de morte celular programada I (apoptose) e II (autofagia).

4.5.2 Mecanismo de morte celular

Os 5% de morte celular observada pelo ensaio MTT na dose $6\text{J}/\text{cm}^2$ de UV-A (Figuras 39, 42 e 43), indicam que as mitocôndrias de algumas células foram lesionadas e podem ter sido endereçadas aos lisossomos para a remoção autofágica. Dessa forma, doses acima de $6\text{J}/\text{cm}^2$ devem ser investigadas para ilustrar os mecanismos de morte. Conforme demonstrado na Figura 44, células J774 e HaCaT apresentaram vacúolos ácidos 48 horas pós irradiação, os quais aumentaram linearmente conforme a dose de luz UV-A aumentava (Figura 44). O acúmulo de vacúolos ácidos é sugestivo de ativação de autofagia como mecanismo de morte celular programada II e esse mecanismo parece ser ativado segundo o desbalanço redox UV-A mediado (Figura 40). A incorporação do IP no DNA em células mortas por irradiação na luz UV-A a $36\text{J}/\text{cm}^2$ (seta branca, Figura 44), confirma o extremo dano celular causado pelo aumento descontrolado do desbalanço redox.

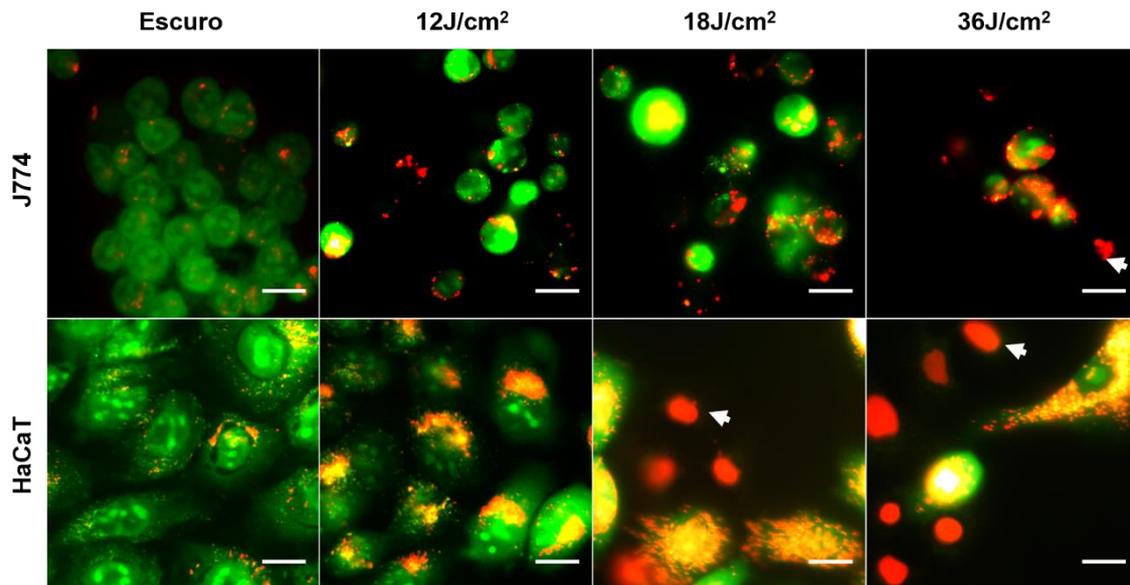


Figura 44: Luz UV-A induz danos em células J774 e HaCaT.

As imagens acima mostram células J774 no escuro e irradiadas e as imagens abaixo mostram células de HaCaT no escuro e irradiadas. As células foram tratadas com laranjado de acridine (AO) e iodeto de propídeo (IP) 48 horas após irradiação UV-A. As barras representam uma escala de 20 μm e as setas brancas mostram a marcação em vermelho do iodeto de propídeo intercalado com o DNA nuclear. As doses foram calculadas pela energia de 3,0 mW/cm^2 e tempo de exposição de 0', 60', 90' e 180'.

A necrose observada na dose UV-A 36J/cm² em ambos os tipos celulares estudados, mostra que energias abaixo dessa dose podem sinalizar para morte celular programada, conforme já citado no parágrafo anterior sobre o acúmulo de vacúolos ácidos na dose 12J/cm². Os tipos de morte celular programada I (apoptose) e morte celular programada II (autofágica) foram estudados em queratinócitos (células HaCaT). Isso porque, HaCaT são células com programação natural de diferenciação a corneócito na epiderme, e cujo processo está intrinsecamente relacionado à autofagia [4,5]. Entendemos portanto, que a irradiação UV-A pode acelerar a indução de morte programada de células HaCaT em cultura.

A Figura 45 apresenta um estudo detalhado de morte por apoptose onde o gráfico A mostra a liberação de Citocromo C detectado pela técnica de ELISA

e as imagens de microscopia em B mostram marcadores de apoptose, necrose secundária e ou necro-apoptose. Os núcleos fluorescentes em azul (DAPI), a Caspase-3 ativa em verde, a sonda apoptose sensível Aposente[®] em azul esverdeado e IP em vermelho. Na dose 18J/cm² da Figura 45A observa-se a liberação significativa de Cito cromo c (MG/ml) provocada pelo desequilíbrio redox, que também oxidou a sonda MTG acumulada no interior das mitocôndrias (ver gráfico interno na Figura 45A).

Nota-se até aqui que as espécies reativas geradas naturalmente na mitocôndria sinalizam para as vias de morte celular programada (ver controle escuro do gráfico 45A) e que na dose 18J/cm² há um aumento de ¹O₂ e de radicais livres que aumentaram a ativação de Caspase-3 ativa (seta branca). Nas doses 12 e 18J/cm², a apoptose foi caracterizada não só pela ativação de Caspase-3 ativa (em verde no citoplasma) como também pela morfológica nuclear – condensação e a fragmentação da cromatina (seta cinza, Figura 45B). A coloração azul esverdeado das imagens de microscopia (ver setas do tratamento com Apo-Trace[®] na Figura 45B) mostrou mais uma indicação experimental de apoptose, cuja ativação foi percebida a partir de 12J/cm². A seta vermelha mostra o iodeto de protídeo intercalado ao DNA nuclear indicando apoptose tardia ou micro apoptose das células (ver imagens Apo-Trace[®] na Figura 45B).

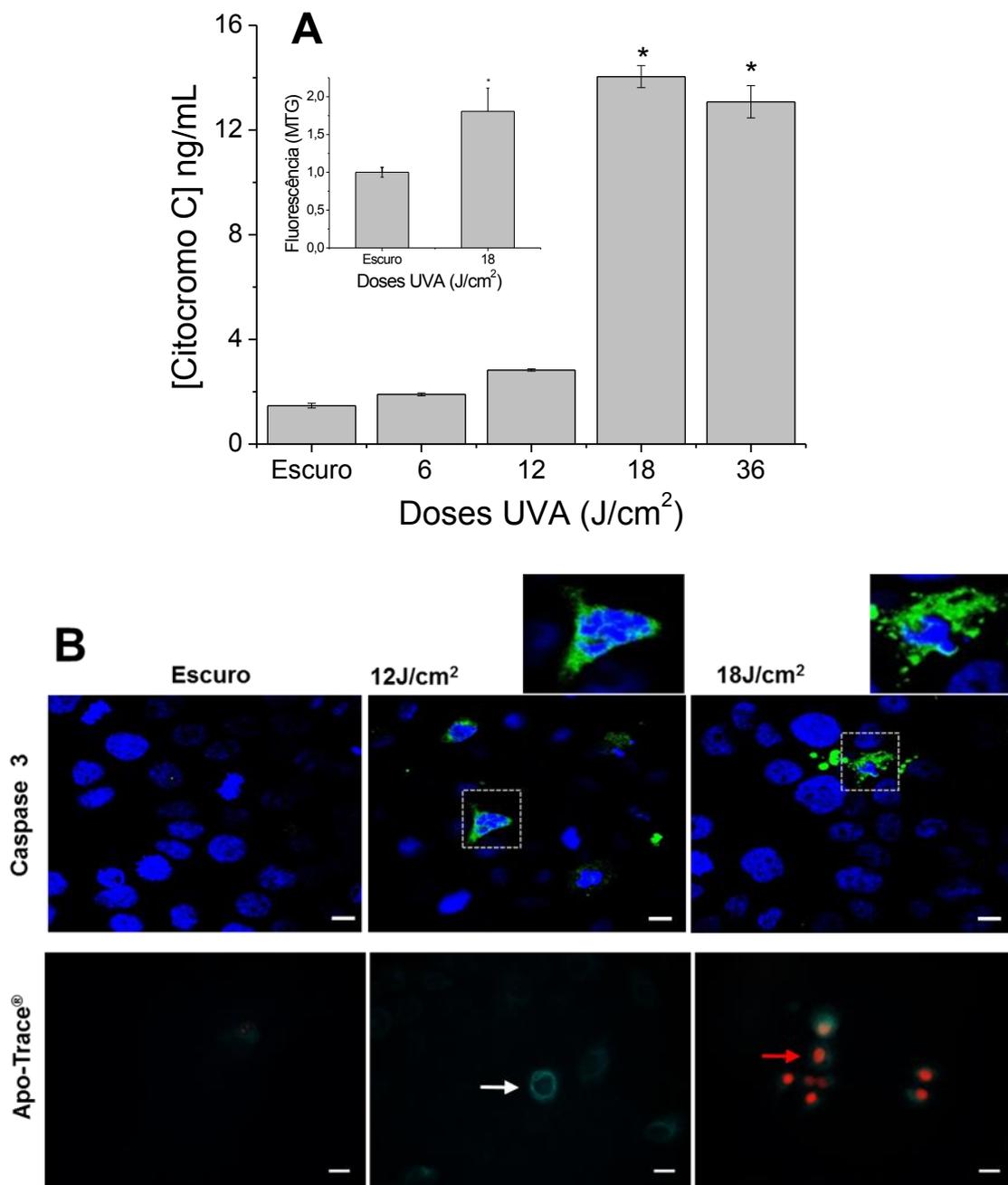


Figura 45: Luz UV-A induz Apoptose em células HaCaT.

O gráfico A mostra a liberação de Citocromo c da mitocôndria de células HaCaT irradiadas (0 a 36J/cm²). O gráfico interno da Figura A mostra a intensidade de fluorescência vermelha do marcador mitocondrial MytoTracker[®] Red oxidado por EROs das células no escuro (0J/cm²) e irradiadas (18J/cm²). As imagens microscópicas B mostram fragmentação de núcleo e coloração em verde de Caspase-3 ativa marcada conforme ampliado da Figura. As imagens da sonda Apo-Trace[®] acumulada no citoplasma é mostrada pela seta branca e a seta vermelha mostra acúmulo da sonda Apo-Trace[®] e do iodeto de propídeo no interior da célula necroapoptótica. As doses foram calculadas pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição 0, 60' e 90'. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P <0,05 (ANOVA) de três experimentos independentes em relação ao controle escuro.

A detecção de apoptose nas doses $12\text{J}/\text{cm}^2$ e $18\text{J}/\text{cm}^2$ mostrou que essas doses estão dentro da faixa de energia UV-A causadora do desbalanço redox. E por isso, além da apoptose, a autofagia está sendo ativada segundo o dano foto-induzido (Figura 44). Unidade Arbitrária de Autofagia (AAU) foi preliminarmente calculada como indicadora de autofagia [154] em células HaCaT irradiadas. Esta estratégia baseia-se na maior captação de vermelho neutro pelos lisossomas em caso de morte autofágica, uma vez que este corante tem afinidade por vacúolos ácidos, que estão presentes em maior quantidade em célula autofágica. Quando o valor de sobrevivência obtido por NRU é comparado com os valores de sobrevivência obtidos por CVS e MTT obtém-se o valor de AAU (do inglês *autophagy arbitrary units*). Valores de AAU acima de 1,0 indicam morte celular por autofagia [154] e quanto maior este valor, maior é a correlação com morte celular programada tipo II (autofagia).

A dose de luz UV-A $12\text{J}/\text{cm}^2$ desencadeou aumento de autofagia em células HaCaT mostrado pelo valor de AAU $>1,0$ (Figura 46A). Essa discrepância se deve à maior incorporação de NR por vacúolos ácidos autofágicos (autolisossomas) em células fotossensibilizadas em comparação ao controle escuro. Nota-se também que doses abaixo de $12\text{J}/\text{cm}^2$ não apresentaram AAU $> 1,0$ mostrando de fato que os mecanismos de morte começam a partir dessa dose UV-A.

Além do dado de AAU, incubamos as células com AO e quantificação dos pixels de fluorescência das imagens de células HaCaT no escuro e irradiadas nas doses 0, 12 e $18\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 46B). A fluorescência de AO das células irradiadas foi ~ 2 vezes maior que a células controle (ver dose 12 e $18\text{J}/\text{cm}^2$ da Figura 46B). Nota-se visualmente o acúmulo de laranja de

acridina (AO) nos vacúolos ácidos das imagens irradiadas da Figura 46C, as quais indicam que a autofagia não suporta a reciclagem de moléculas e organelas oxidadas levando a morte autofágica conforme marcação do DNA com IP observado pela seta na dose 18J/cm² (ver seta na imagem 18J/cm² da Figura 46C). A análise de marcação do DNA com IP na dose 18J/cm² foi confirmada por citometria de fluxo (Figura46D).

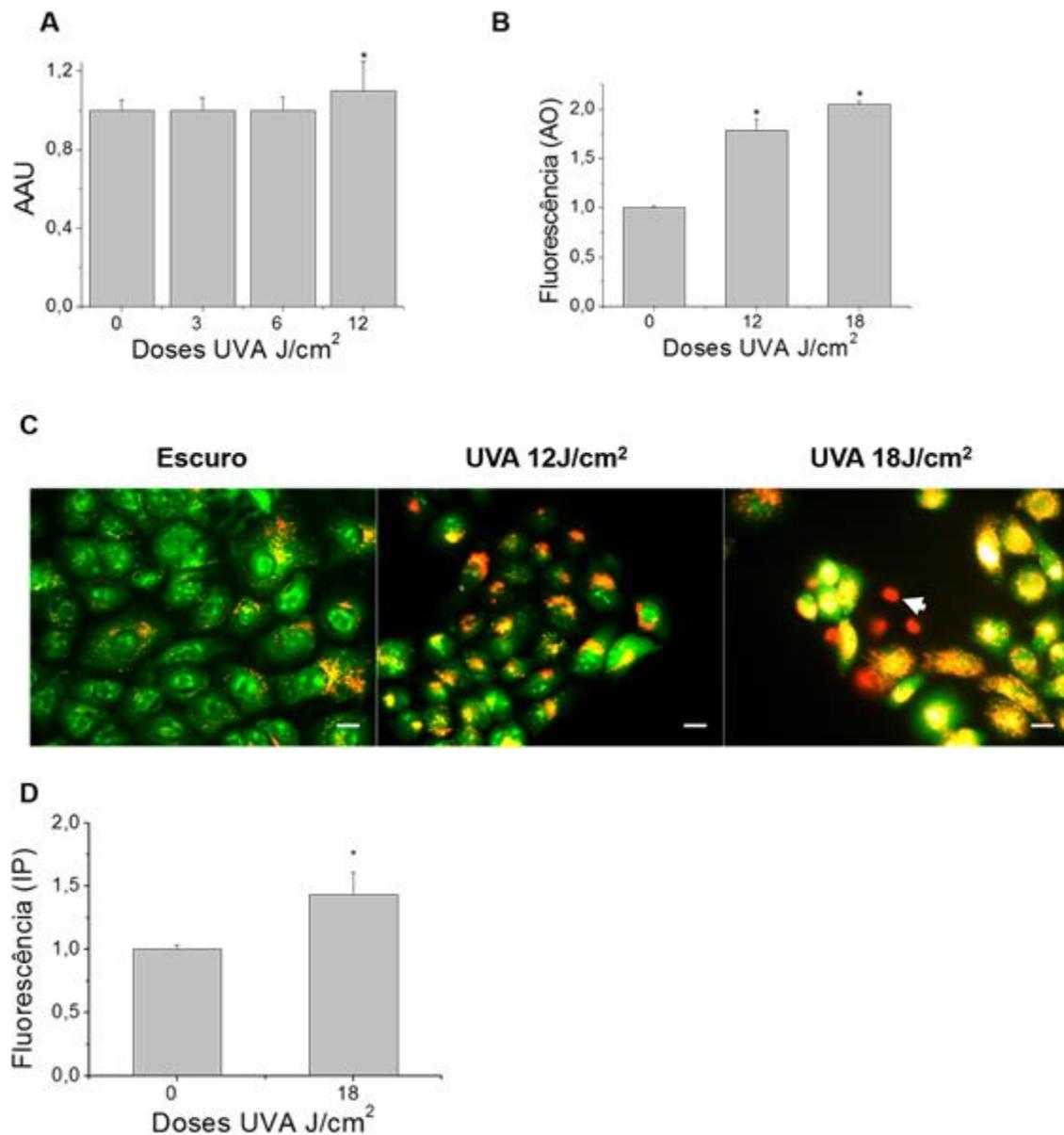


Figura 46: Luz UV-A induz Autofagia e Necro-autofagia em células HaCaT.

O gráfico A mostra unidade arbitrária de autofagia (AAU) em função das doses de luz UV-A. O gráfico B mostra a quantificação da fluorescência do laranja de acridina dentro dos vacúolos lisosomais das imagens microscópicas em função da dose de luz UV-A. As imagens de microscopia representadas pela letra C mostram células irradiadas nas doses 0J/cm² a 18 J/cm² desafiadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo. A seta branca mostra incorporação do iodeto de propídeo no DNA nuclear. O gráfico D mostra a intensidade de fluorescência detectada pela citometria de fluxo de iodeto de propídeo incorporado ao DNA em função da dose de luz UV-A. As doses foram calculadas pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição de 0, 15', 30', 60', 90'. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P <0,05 (ANOVA) de três experimentos independentes.

Vimos até aqui que a dose UV-A 36J/cm² causa necrose e que as doses 12J/cm² e 18J/cm² são suficientes para desencadear morte celular apoptótica e autofágica. É importante notar que a dose 18J/cm² causa morte tanto apoptótica quanto autofágica. Por isso, elegemos essa quantidade de energia UV-A (18J/cm²) para investigarmos com mais detalhes o processo de autofagia. Conforme observado na Figura 47, em concordância ao observado na Figura 46, há aumento significativo de vacúolos lisosomotrópicos marcados pela sonda LysoTracker Green (LTG), os quais são comumente considerados como vacúolos autofágicos tardios ou autolisossomas [200]. Interessantemente, após a irradiação sob a luz UV-A há um maior acúmulo de vacúolos autofágicos, os quais se mostraram intrinsicamente associados ao aumento do tamanho celular, conforme exemplificado no scatter-plott contour quadrante Q2 superior à direita (Figura 47A). Em contrapartida, o controle escuro apresentou apenas 13% de vacúolos ácidos na população total de células em comparação à condição irradiada, onde se observou mais 70% das células contendo vacúolos autofágicos. A quantificação da fluorescência mediana gerada pela sonda LTG está representada em valores relativos ao controle escuro, conforme gráfico de barras da Figura 47B.

A caracterização desses vacúolos autofágicos mostra-se evidente na Figura 47C, conforme imunomarcagem de LC3-II, biomarcador clássico para

identificação de vacúolos autofágicos. O acúmulo de vacúolos autofágicos modulado pela irradiação UV-A (Figura 47) corrobora o já evidenciado pela literatura [115].

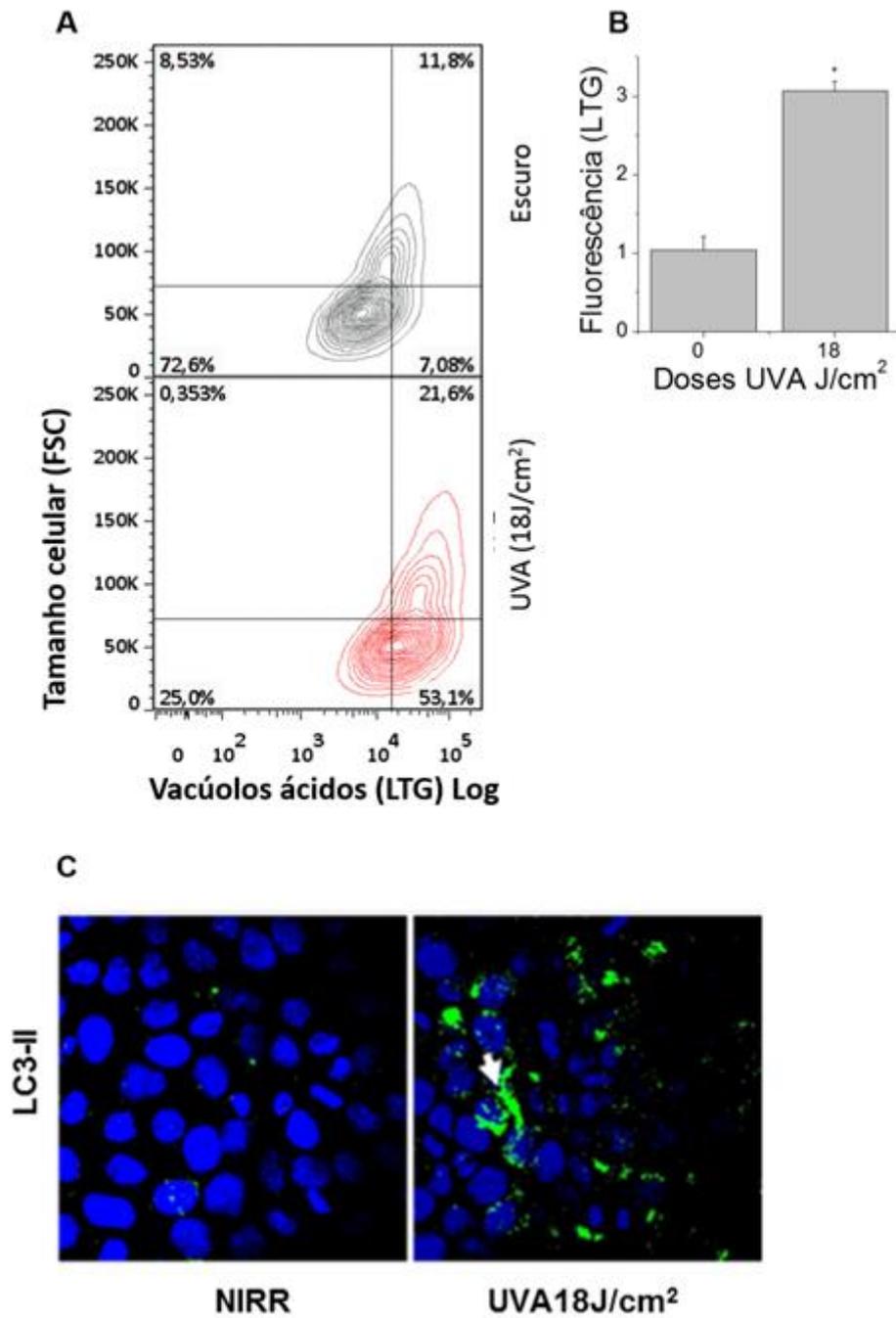


Figura 47: Luz UV-A bloqueia do fluxo autofágico em células HaCaT.

A) Relação da população de células segundo o acúmulo de vacúolos ácidos marcados com LysoTracker Green (LTG) e o tamanho celular dado por FSC, determinados por citometria de fluxo pós 24 horas à irradiação sob a luz UV-A $18\text{J}/\text{cm}^2$. B) Gráfico representando valores relativos à quantificação mediana da fluorescência desses vacúolos ácidos determinados pela fluorescência LTG. C) Imunofluorescência para a proteína LC3-II mostra marcação em verde de autofagossomas acumulados (seta branca) em células HaCaT irradiadas. As células foram mantidas no escuro a $0\text{J}/\text{cm}^2$ (NIRR) e irradiadas na dose UV-A $18\text{J}/\text{cm}^2$. As doses foram calculadas pela energia de $3,0\text{ mW}/\text{cm}^2$ e tempo de exposição de 0 e 90' respectivamente. “**” acima das barras de desvio mostra a significância estatística a $P < 0,05$ (ANOVA) de três experimentos independentes.

Como descrito na literatura, à medida que há dano mitocondrial há ativação de uma autofagia seletiva, denominada mitofagia, resolveu-se determinar essa relação segundo a irradiação sob a luz UV-A. Para isso, fizemos um experimento de microscopia confocal que revelou a localização dos corantes de lisossomos verde LysoTracker® Green(LTG) e de mitocôndria vermelho MytoTracker® Red(MTR) em células HaCaT irradiadas (ver dose UV-A $18\text{J}/\text{cm}^2$ da Figura 48A).

A colocação espacial de LTG (em verde) e MTR (em vermelho) evidencia a formação de vacúolos ácidos contendo mitocôndrias danificadas por EROs em células HaCaT irradiadas na dose UV-A $18\text{J}/\text{cm}^2$ (ver seta na Figura 48A), indicando que as mitocôndrias lesionadas se localizam no interior dos autofagolisossomos (marcador LTG-MTR no mesmo compartimento). Esse resultado sugere a ativação de mitofagia pela luz UV-A.

A confirmação da mitofagia foi comprovada por dupla-imunofluorescência específica para proteína LC3-II (marcador de autofagossomas) e COXIV (marcador de mitocôndria). Conforme demonstrado na Figura 48B, a colocação espacial de LC3-II (em verde) e COXIV (em vermelho) caracteriza o mitofagossoma (em amarelo) em células HaCaT irradiadas sob luz UV-A a $18\text{J}/\text{cm}^2$ (ver seta na Figura 48B).

Apesar de a irradiação UV-A inativar atividade lisossomal [115], as

mitocôndrias oxidadas pelo desbalanço redox (Figura 48A) ainda são direcionadas aos lisossomos para digestão intracelular (seta branca). Assim, o excesso de mitocôndrias oxidadas pode comprometer esse mecanismo fisiológico, já que conforme sugerido recentemente, a luz UV-A é capaz de inibir o fluxo autofágico, ao comprometer a atividade de hidrolases lisossômicas, tais como a catepsina B [115]. Sendo assim, é de se esperar que a digestão das mitocôndrias danificadas pelo estresse oxidativo UV-A-induzida esteja comprometida.

De fato, a incorporação de mitocôndrias danificadas pelo estresse UV-A a $18\text{J}/\text{cm}^2$ (seta branca da Figura 48A e quadrados pontilhados da Figura 48B) aumenta o processo autofágico. No entanto, a homeostase da digestão autofágica pode estar comprometida. Isso resulta em acúmulo de mitocôndrias no interior dos autofagolisossomas que podem estar associado à morte celular, conforme observado na Figura 48C.

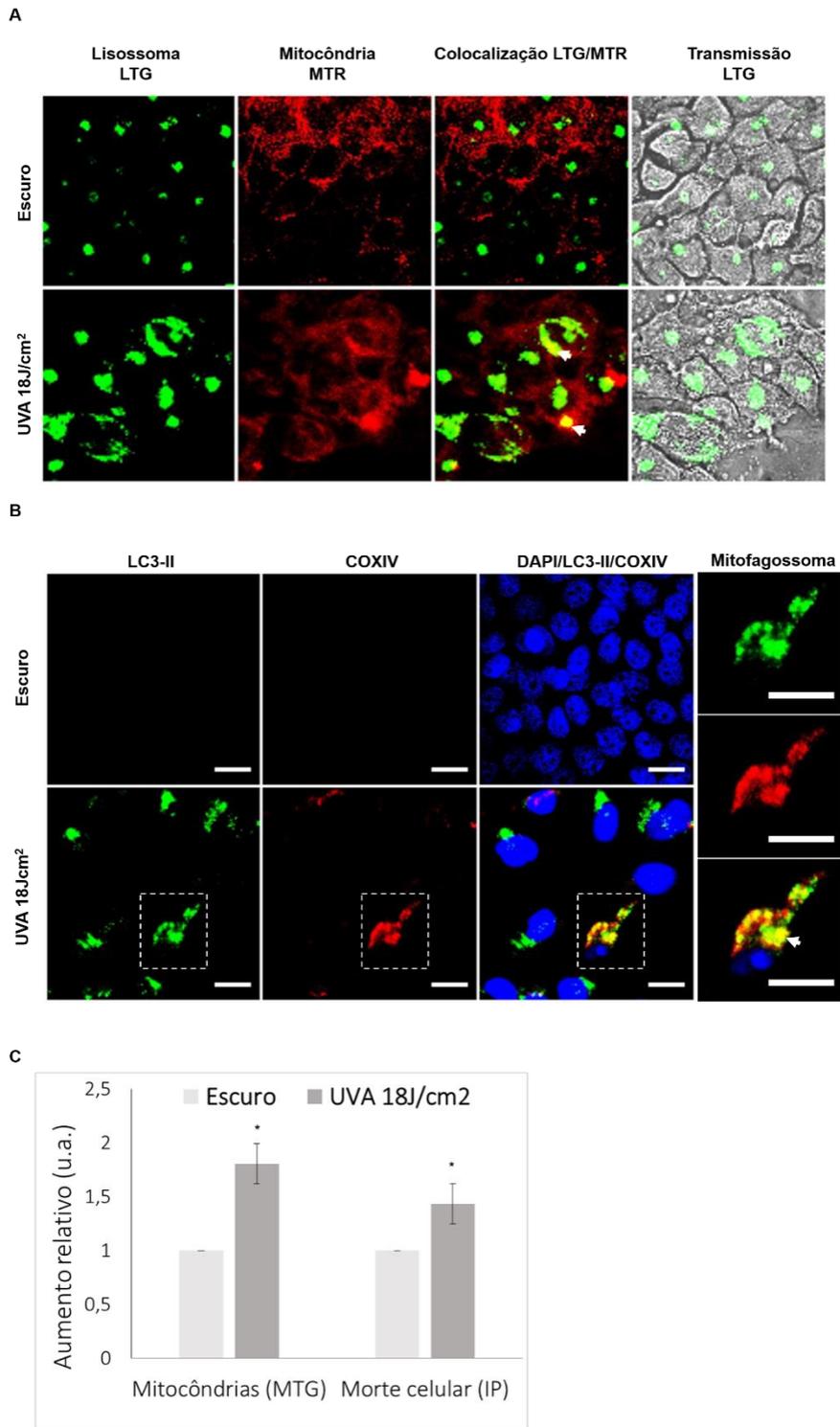


Figura 48: Luz UV-A induz mitofagia em células HaCaT.

A) Imagens confocal das células HaCaT incubadas com corante LysoTracker® Green(LTG) e MytoTracker® Red(MTR) após irradiação UV-A (18J/cm²). B) Imagens de imuno-fluorescência para LC3-II e COXIV de células HaCaT irradiadas na dose UV-A 18J/cm². C) Pós 48 horas à irradiação UV-A (18J/cm²), quantificou-se por citometria de fluxo a massa mitocondrial dada pela fluorescência de MytoTracker® Green FM(MTG) e morte celular (IP). As doses foram calculadas pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição de 0 e 90' respectivamente. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P <0,05 (ANOVA) de três experimentos independentes.

Os dados de mitofagia portanto, comprovaram morte induzida pelo bloqueio do fluxo autofágico em células HaCaT irradiadas. Acreditamos que o bloqueio do fluxo autofágico pode aumentar a geração de EROs pela luz UV-A e visível através do acúmulo de mitocôndrias danificadas e seus derivados da riboflavina (FMN, FADH₂) que são moléculas que absorvem a luz UV-A e visível e geram ¹O₂ [72,73].

4.5.3 Fotossensibilização no UV-A e visível: Papel da lipofuscina

A morte celular autofágica pode ter sido causada pela fotossensibilização tipo I de derivados endógenos da riboflavina. Para comprovar essa hipótese, 1) realizou-se um experimento com a Tarf-Me e luz UV-A e 2) realizou-se outro experimento utilizando-se apenas luz UV-A para investigar se ambos produzem lipofuscina (derivada de resíduo de tirosina oxidada a L-Dopa) que aumenta a geração de ¹O₂ [71,116,117] no autofagolisossomo não-funcional.

Para o experimento 1, irradiaram-se as células HaCaT na dose UV-A 6J/cm² devido à sobrecarga de Tarf-Me que causa morte celular próximo a IC₅₀ (Figuras 42 e 43). Já no experimento 2, irradiaram-se as células HaCaT sem sobrecarga de Tarf-Me na dose 18J/cm² devido aos resultados anteriores que mostraram bloqueio do fluxo autofágico na dose UV-A 18J/cm² (Figuras 47 e 48).

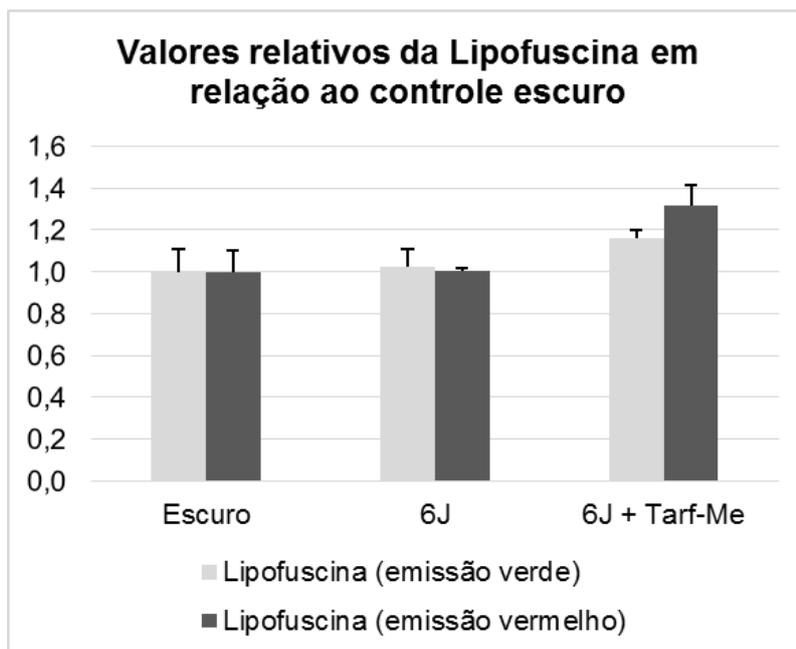


Figura 49: Luz UV-A e fotossensibilizadores endógenos aumentam a produção de lipofuscina em células HaCaT.

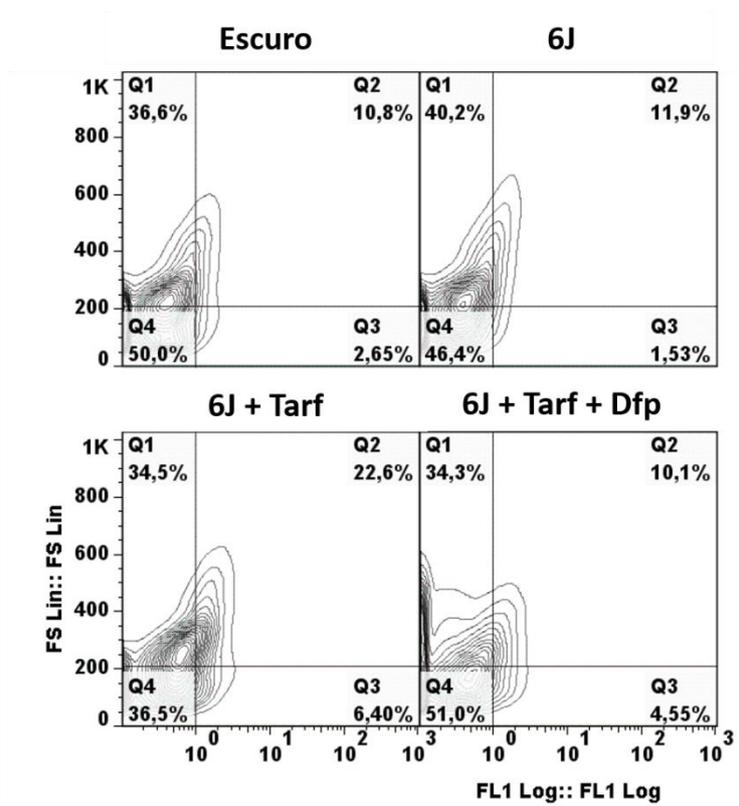
O gráfico mostra a autofluorescência verde (FL1, exc 488nm) e vermelha (FL3, exc 633nm) de lipofuscina das células HaCaT tratadas com Tarf-Me e irradiadas na dose UV-A 6 J/cm².

Foi demonstrado que o derivado da riboflavina (Tarf-Me) sofre fotossensibilização tipo I e II (Figuras 42 e 43), e causa morte celular autofágica devido ao bloqueio do fluxo autofágico. Além disso, após 24 horas da fotossensibilização, há acúmulo do fotossensibilizador endógeno lipofuscina (Figura 49). Supondo que poderia ocorrer uma sobreposição de fluorescência da Tarf-Me e lipofuscina pelo fato de ambas absorverem no azul (488 nm) (Figura 38B e 41A), a detecção da autofluorescência sob excitação 545nm (emissão vermelha) confirmou que a Tarf-Me irradiada com luz UV-A contribui para a produção de lipofuscina dentro do autofagolisossomo danificado fotoquimicamente (Figura 49).

Assim a lipofuscina pode ser mensurada pela sua emissão característica pela autofluorescência verde (Figura 38B) além de poder ser quantificada no

ambiente celular por citometria de fluxo considerando-se o tamanho celular detectado pelo FSC (*Forward Scatter Side*) (Figura 49). Deve-se notar que após 48 horas ao fotodano, há um aumento significativo de lipofuscina em células HaCaT tratadas com Tarf-Me e irradiadas (23%), as quais apresentam um aumento celular dado por FSC, quando comparado às condições (escuro, UV-A, UV-A+Tarf-Me) (Figura 50A). Isso indica que Tarf-Me absorve energia UV-A, levando ao desbalanço redox que conseqüentemente gera formação de lipofuscina devido provavelmente à supressão do fluxo autofágico. Curiosamente, essa geração de lipofuscina é ferro-dependente, já que em presença de Dfp há significativa supressão da lipofuscinogênese (30%), principalmente em células menores representadas no quadrante Q3 (44%) (Figura 50B), sendo essa diminuição relacionada ao aumento significativo de sobrevivência celular (Figura 43).

A



B

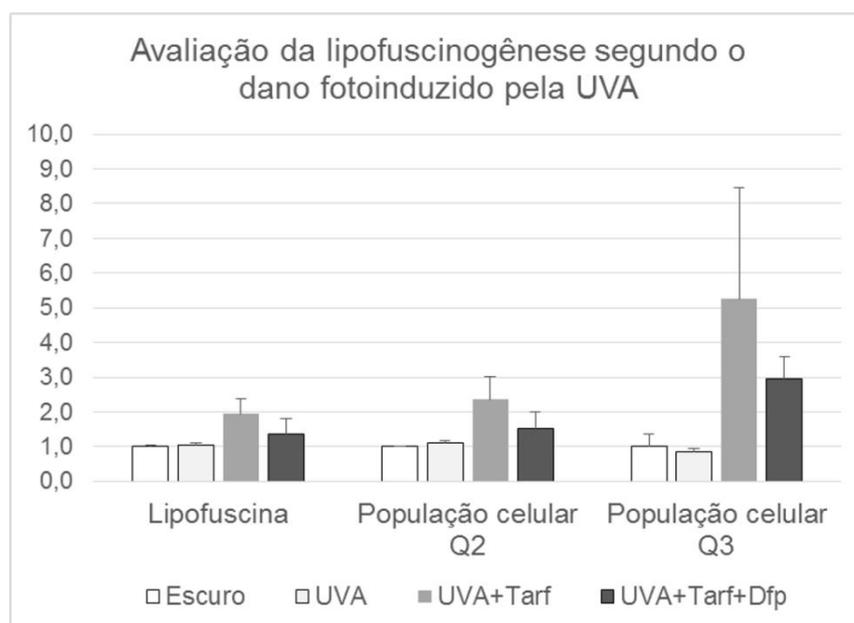


Figura 50: Luz UV-A ($6\text{J}/\text{cm}^2$) aumenta a produção de lipofuscina em células HaCaT em presença de Tar-Me.

(A) O scatter-plot contour mostra a autofluorescência verde da lipofuscina (FL1 Log) das células HaCaT tratadas com Tarf-Me e irradiadas na dose UV-A $6\text{ J}/\text{cm}^2$, segundo o tamanho celular (FSC). (B) valores médios da população representada no quadrante Q2, caracterizado por células com aumento de lipofuscina, cujo acúmulo alterou o tamanho celular.

Em detalhe, o experimento de autofluorescência da lipofuscina utilizando apenas luz UV-A na dose $18\text{J}/\text{cm}^2$ mostrou um aumento da fluorescência (verde, FL1 Log) da lipofuscina, conforme demonstrado na Figura 51A. Após a irradiação sob a luz UV-A há um maior acúmulo de lipofuscina, o qual se mostrou intrinsecamente associado ao aumento do tamanho celular em 33% das células, conforme exemplificado no scatter-plott contour quadrante Q2 superior à direita (Figura 51A). Isso indica que fotossensibilizadores endógenos das células HaCaT (como a riboflavina) absorvem energia UV-A, levando ao desbalanço redox que conseqüentemente leva à formação de lipofuscina devido provavelmente à supressão do fluxo autofágico.

Em contrapartida, o controle escuro apresentou apenas 6% de vacúolos ácidos na população total de células em comparação à condição irradiada, onde se observa quase 40% das células contendo lipofuscina. A média das populações representadas no quadrante superior à direita (Q2) está representada em gráfico de barras conforme Figura 51B.

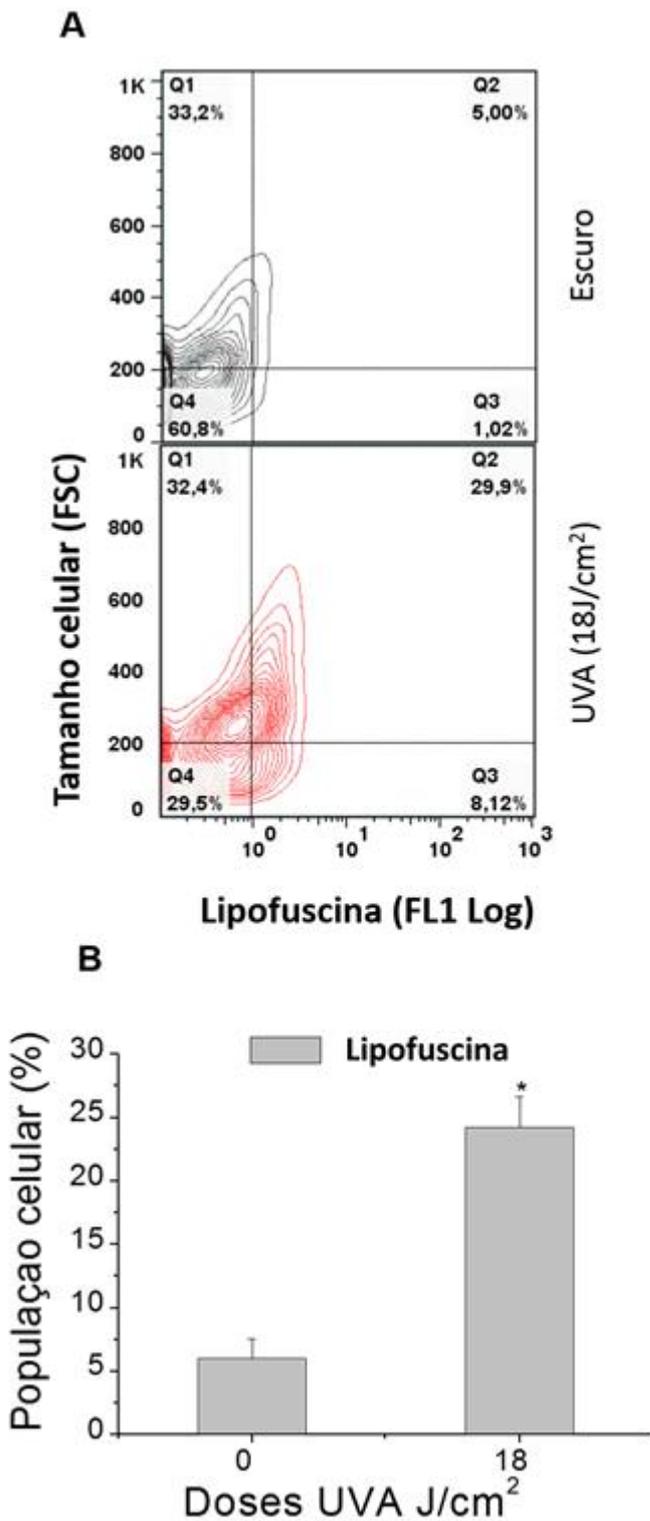


Figura 51: Luz UV-A aumenta a produção de lipofuscina em células HaCaT.

(A) O scatter-plot contour mostra a autofluorescência verde da lipofuscina (FL1 Log) segundo o tamanho celular (FSC) detectado por citometria de fluxo em função da energia UV-A (18J/cm²) e no escuro (0J/cm²). (B) valores médios da população representada no quadrante Q2, caracterizado por aumento de lipofuscina, cujo acúmulo alterou o tamanho celular. Células não irradiadas (0J/cm²) e irradiadas na dose UV-A ((18J/cm²). "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P <0,05 (ANOVA) de três experimentos independentes.

Estes dados (Figuras 49 e 50 e 51) correlacionam com os dados de Lamore e colaboradores publicados em 2012 e 2013 os quais demonstraram que o acúmulo de lipofuscina dentro dos autofagolisossomos compromete o fluxo autofágico e causa morte celular programada tipo II (morte autofágica) [114,115]. Nossa estratégia vai além da literatura porque mostramos que a melanina irradiada com luz visível gera $^1\text{O}_2$ e a lipofuscina é derivada da L-DOPA (intermediário da síntese de melanina) que gera $^1\text{O}_2$ na fotossensibilização [71,116,117]. Por isso nós irradiamos células na dose $12\text{J}/\text{cm}^2$ de luz UV-A, para estimular a produção de lipofuscina no autofagolisossomo sem comprometer drasticamente a viabilidade celular, e após 48 horas as mesmas receberam dose de $36\text{J}/\text{cm}^2$ de luz visível para que a lipofuscina atuasse como fotossensibilizador endógeno semelhante ao que observamos na fotossensibilização da melanina. A Figura 52A mostrou queda da viabilidade após irradiação UV-A (para gerar lipofuscina) e visível (para que a lipofuscina atue como fotossensibilizador), comprovando a hipótese de que a lipofuscina atua como um fotossensibilizador endógeno.

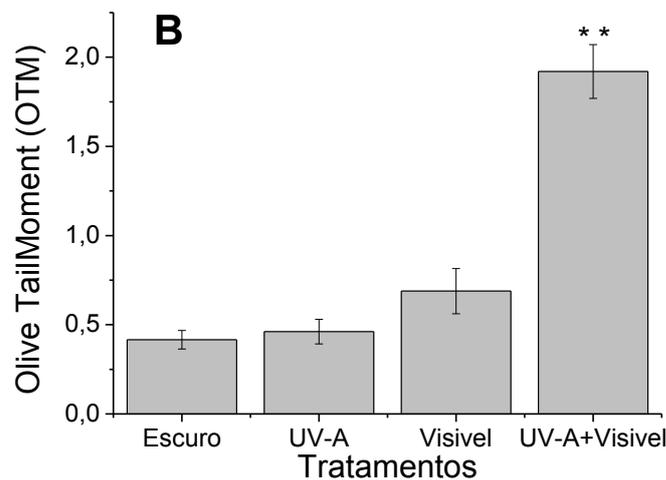
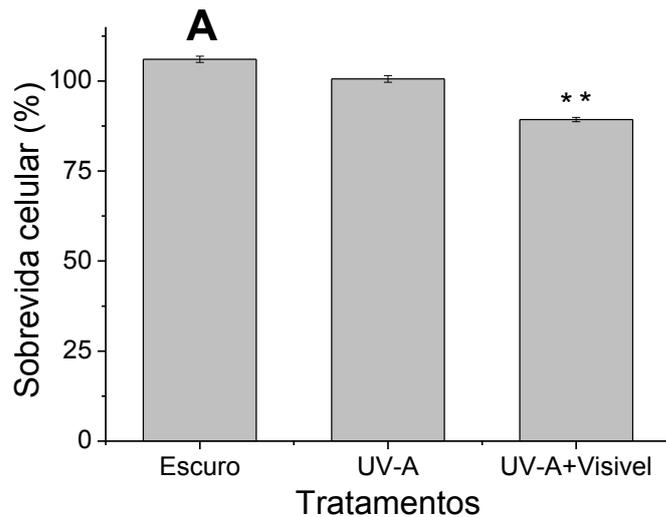


Figura 52: Lipofuscina causa fotodano na sobrevivência e no DNA das células HaCaT.

O gráfico A mostra a sobrevivência celular e o gráfico B mostra a quantificação da fragmentação do DNA (Olive TailMoment - OTM) das células HaCaT. As células foram mantidas no escuro; irradiadas na dose UV-A 12J/cm² (UV-A); irradiadas apenas com luz visível (Visível); irradiadas a 12J/cm² de luz UV-A e após 48 horas irradiadas a 36J/cm² de irradiação visível (UV-A+visível). Ambas as doses foram calculadas pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de 60' para UV-A e 180' para visível. "**" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P < 0,05 (ANOVA) em relação ao escuro e luz UV-A dos três experimentos independentes em relação ao controle escuro.

A queda na viabilidade celular mostrada no Figura 52A está associada ao acúmulo de lipofuscina dos autofagossomas ou autolisossomas que comprometem o fluxo autofágico [201] originado pelo dano em lisossomos e

mitocôndrias das células irradiadas [71,195]. Nossa estratégia de irradiar as células com luz visível após indução de lipofuscina UV-A fotoinduzido confirmou não só os dados da fotossensibilização da melanina mostrado em capítulos anteriores como também abre perspectivas uma janela de estudo com os fotoprodutos gerados por luz UV-A que sofrem fotossensibilização por luz visível.

A comprovação desse argumento é mostrada no gráfico 52B através do cálculo da Oliver TailMoment (OTM) [202] em função dos tratamentos das células HaCaT com luz UV-A e visível. Após 48h da irradiação das células com dose UV-A $12\text{J}/\text{cm}^2$, o acúmulo de lipofuscina nos autofagolisossomos já foi o suficiente para absorver luz visível a $36\text{J}/\text{cm}^2$ e gerar possivelmente outras espécies que atacou o DNA fita dupla das células HaCaT (ver UV-A+visível do gráfico 52B). Isso é muito relevante para a fotoproteção da pele uma vez que estamos mostrando pela primeira vez um processo fotoquímico sinérgico entre a luz UV-A e visível causado pela fotossensibilização natural.

A fotossensibilização da lipofuscina com luz visível correlaciona com a fotossensibilização da melanina porque são estruturas fotoquimicamente semelhantes que geram estresse redox e morte celular por danos no DNA. Esses fenômenos começam a partir da dose UV-A $12\text{J}/\text{cm}^2$ que aumenta o estresse oxidativo que por sua vez diminuiu a viabilidade celular em 30% (Figura 39) correlacionando com o bloqueio do fluxo autofágico por meio da marcação da proteína LC3II (Figuras 47 e 48) e indução da mitofagia (Figura48). Esses dados, correlacionam com a autofluorescência da lipofuscina (Figura 50, 51 e 52) e com os dados de Lamore e colaboradores 2012 os quais

mostraram que a inibição da expressão da protease Catepsina B desencadeia a desregulação lisosomal autofágica [114], morte celular e dano no DNA (Figura 52B) pelo oxigênio singlete gerado na fotossensibilização da lipofuscina. A Figura 53 mostra uma representação esquemática da fotossensibilização UV-A e visível em modelo celular representativo.

Portanto, controlar os mecanismos de fotossensibilização de moléculas endógenas pode ser uma das estratégias para evitar a morte celular, fotoenvelhecimento da pele e a transformação maligna.

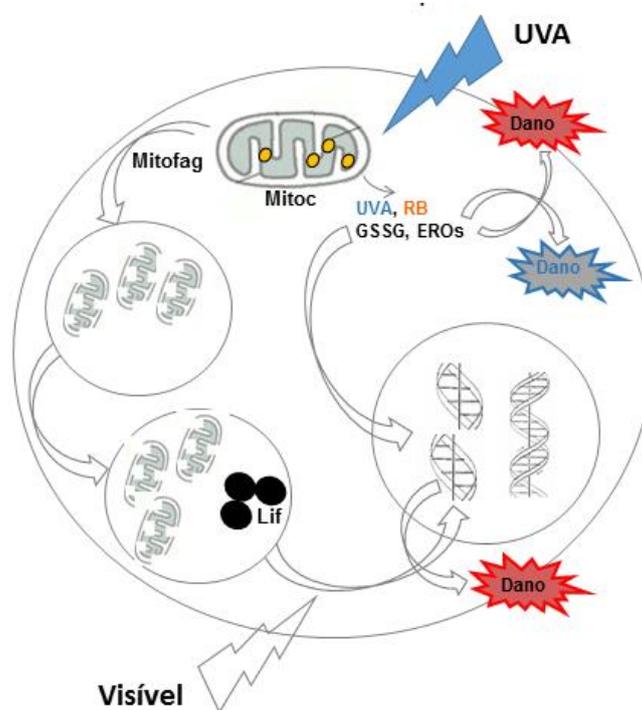


Figura 53: Representação esquemática da resposta celular frente as energias UV-A e visível.

O esquema representa uma célula que recebe luz UV-A, sofre fotossensibilização (RB) e gera EROs e desbalanço redox (GSSG) que causa dano em biomoléculas e organelas da célula. Mitocôndrias (Mito) lesionadas sofrem mitofagia que desencadeia na formação de lipofuscina (Li) que é foto excitada no visível e causa lesão no DNA e dano celular.

4.6 Liberação de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases

A sinalização inflamatória ocorre por ação das espécies reativas de oxigênio, como o 1O_2 , que pode reagir com lipídeos e proteínas de membrana, liberando ácido araquidônico, com consequente liberação das interleucinas IL-1 e IL-6, as quais sinalizam para expressão gênica de enzimas relacionadas à degradação de matrix extracelular como as MMPs [84]. Seguindo essa premissa, a geração de espécies reativas induzidas pela luz UV-A estimula a liberação de citocinas, que sinalizam para expressão de enzimas envolvidas na morte celular e no envelhecimento da pele. No entanto, a literatura carece de estudos que correlacionam a geração de EROs com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e envelhecimento da pele.

A liberação de citocinas pró-inflamatórias estimuladas por EROs recruta células do sistema imune na região afetada pelo fotodano mediada pela liberação de interleucinas (IL6). Em tal condição, as células se encontram em processo de morte programada I e II (apoptose e autofagia) em resposta ao estresse oxidativo foto-induzido. A liberação da interleucina IL6 por queratinócitos regula a produção de colágeno pelos fibroblastos [71,130,132], em resposta à atividade das metaloproteinases (MMP1 e MMP9) que caracterizam o fotoenvelhecimento da pele.

Essa sinalização celular é orquestrada pelo estresse oxidativo, produzido pela fotossensibilização das flavinas e flavoproteínas endógenas que absorvem luz numa região específica de comprimento de onda formando espécies reativas, através do processo de fotossensibilização tipo I e tipo II

(Figuras 41, 42 e 43), que podem comprometer a homeostase celular [85,196] e assim ativam a resposta inflamatória. A manutenção da sobrevivência celular é garantida pelas vias de reparo por excisão de bases (REB) e reparo por excisão de nucleotídeos (REN) como também a compartimentalização celular (membranas lipoproteicas) que protegem as células de danos. No entanto, quando ocorre o desbalanço redox, há ativação de algumas citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo de sinalização e nos mecanismos de morte celular controlada [104,196]. Em consequência do estresse oxidativo modulado pela luz UV-A, há liberação de ATP que se liga a receptores purinérgicos de membrana (P2Y) acoplados a proteína G que desencadeia na formação do segundo mensageiro AMP cíclico associados à liberação da citocina IL6 e enzima MMP1 que induzem apoptose e degradação do colágeno da pele [130,135,136].

Esses mecanismos foram investigados em células HaCaT através do aumento da liberação da interleucina pró-inflamatória IL-6 a partir de $3\text{J}/\text{cm}^2$ de luz UV-A (Figura 54A). A quantidade de fótons absorvidos pelas células na dose $12\text{J}/\text{cm}^2$ foi suficiente para desencadear desbalanço redox (Figura 40) e ativar a morte celular programada em algumas células (Figuras 45 E 46). Esse argumento se justifica pela sinalização máxima (pg/mL) de liberação de IL6 (dose $12\text{J}/\text{cm}^2$ da Figura 54A) associado a valores bem maiores (ng/mL) de liberação de enzima MMP1 mostrada partir das doses de $18\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 54B).

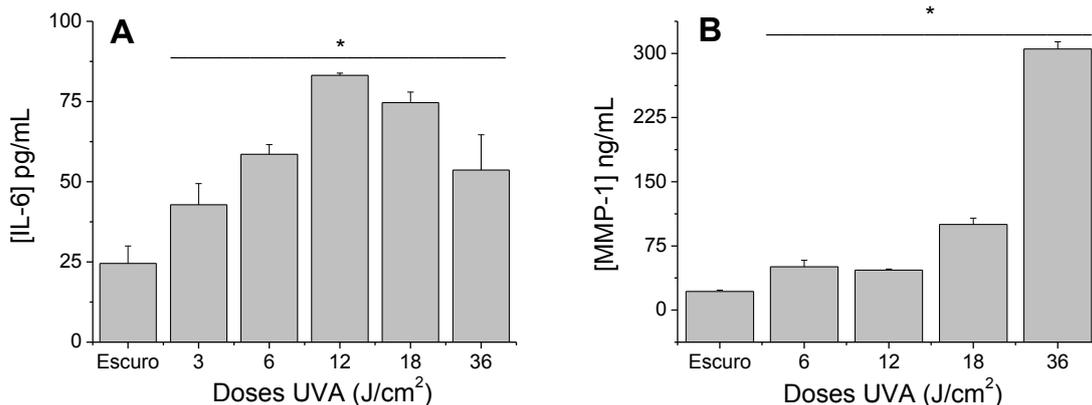


Figura 54: Luz UV-A induz liberação de Citocinas IL6 e Enzima MMP1 em células HaCaT.

O gráfico A mostra a concentração (pg/mL) da citocina IL-6 e o gráfico B mostra a concentração (ng/mL) da enzima metaloproteinase 1 (MMP1) em células HaCaT irradiadas nas doses UV-A. As doses foram calculadas pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição de 0, 15', 30', 60', 90' e 180', respectivamente. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P < 0,05 (ANOVA) dos três experimentos independentes em relação ao controle escuro.

A correlação entre a liberação de citocina pró-inflamatória IL-6 e MMP1 não só é sustentada pela literatura através do aumento na geração de EROs [130,135], como também mostrada pela Figura 54. Esse aumento ainda sustenta a indução de morte celular programada por apoptose (Figura 45). A diminuição de IL6 a partir das doses de 18 e 36J/cm² (Figura 54) pode estar correlacionada com a inativação de Catepsinas (B, L e S) [114,115] uma vez que estas enzimas também sinalizam para apresentação de antígenos e liberação de citocinas inflamatórias [203,204]. Com o bloqueio do fluxo autofágico induzido pelas doses UV-A (Figura 47 e 48), a Catepsina B está inativa e por sua vez não promove a remodelagem celular durante o processo de diferenciação celular dos queratinócitos ao longo da epiderme [205,206]. A estratégia realizada pelas células HaCaT, a partir da dose de 12J/cm², foi aumentar a excreção de MMP1 assim como ocorreria *in vivo*.

Dessa forma, esses queratinócitos localizados na camada basal da epiderme podem se diferenciar e migrar para a superfície da epiderme. Nesse processo há ativação de morte celular programada (cornificação) à medida que os queratinócitos se diferenciam à corneócitos. Além desse mecanismo caspase-14 dependente, destaca-se a autofagia para promover degradação do conteúdo citoplasmático (organelas e macromoléculas), o qual é preenchido por queratina e filamentos de filagrina ao longo do processo de cornificação.

Vale ressaltar que esse processo ocorre fisiologicamente, ao promover a diferenciação de queratinócitos a corneócitos queratinizados, os quais compõem a camada córnea da epiderme [4,5]. Contudo, sob condições de estresse celular modulado, por exemplo, pelo desbalanço redox UV-induzido, há ativação de uma cascada de eventos inflamatórios, os quais aceleram essa diferenciação programada a fim de restabelecer o tecido epidérmico.

Mecanismos de sinalização inflamatória de membrana mostraram que a compartimentalização celular foi importante para o controle do desbalanço redox, e suporte para o controle celular contra mutação no genoma, uma vez que receptores de TNF sinalizam geralmente para morte celular [207,208]. Paralelo à indução de morte celular pela sinalização redox, TNF- α estimula a expressão de enzimas metaloproteinases (MMP-1 e MMP-9) [130] as quais auxiliam no processo de diferenciação de queratinócitos e remodelagem da matriz extracelular da pele [131].

A dose de 36J/cm² UV-A causou morte celular não programada em células HaCaT e em macrófagos J774 (Figura 44) indicando que esta quantidade e energia é capaz de formar espécies reativas que causam

necrose. Esse tipo de resposta celular se correlaciona com a ativação do processo inflamatório por meio da liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) [207,208] e pela ativação do fator NF-kB [76,86,122–124].

Para avaliar essa premissa, utilizaram-se células de macrófagos J774, já que células HaCaT liberaram apenas IL6 (Figura 54) e não citocinas IL1 β e TNF- α quando irradiadas sob luz UV-A (dado não mostrado). Por outro lado, os macrófagos J774 liberaram altas concentrações de TNF- α (ver 600 pg/mL na Figura 55A) e IL1 β (ver 300 pg/mL na Figura 55B) na dose de 36J/cm². Essa maior excreção de citocinas se associa significativamente com o aumento de morte celular; por exemplo a necrose sob irradiação UV-A a 36J/cm² (Figura 44).

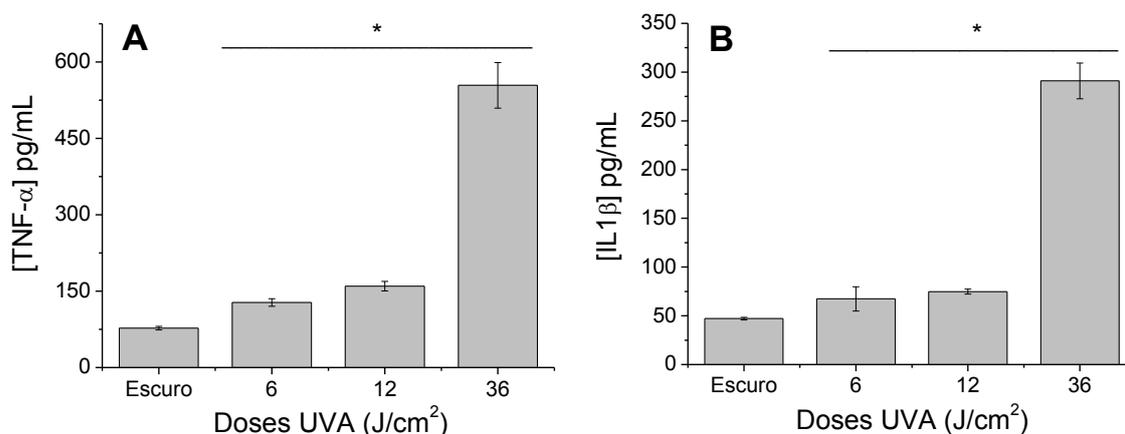


Figura 55: Liberação de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos J774 murinos irradiados nas doses UV-A.

(A) mostra a expressão e liberação de citocinas TNF- α e (B) mostra a expressão e liberação da citocina IL-1 β por células J774 irradiadas com doses UV-A. A energia de 3,0 mW/cm² foi usada para o cálculo das doses controle, 6 J/cm²; 12 J/cm² e 36 J/cm² em tempo de exposição de 0, 30', 60' e 180' respectivamente. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P <0,05 (ANOVA) dos três experimentos independentes em relação ao controle escuro.

Usaram-se também células de macrófagos humanos THP1, as quais após irradiação sob luz UV-A a 12J/cm² excretaram um pouco mais TNF- α (200

pg/mL) do que o observado para os macrófagos murinos J774. Tamañha sensibilidade desse tipo celular, que as espécies reativas geradas pela dose 36J/cm² provocou necrose das células THP1, cuja excreção de TNF- α não foi possível de ser mensurada (Figura 56A). Foi demonstrado também que macrófagos humanos THP1 liberaram MMP1 em doses UV-A crescentes (Figura 56B), em resposta à elevada atividade autócrina de TNF- α . [209].

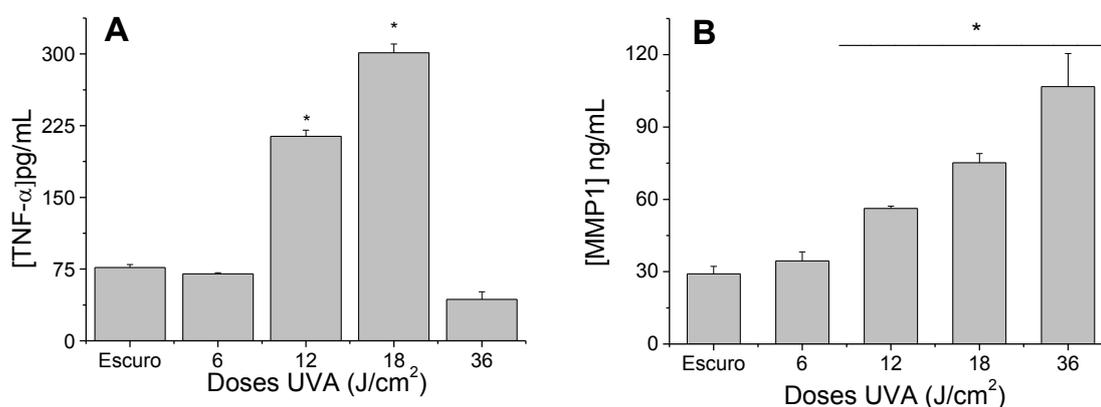


Figura 56: Luz UV-A induz liberação de Citocinas TNF- α e Enzima MMP1 em macrófagos THP1 humanos irradiados nas doses UV-A.

O gráfico A mostra a concentração (pg/mL) da citocina TNF- α e o gráfico B mostra a concentração (ng/mL) da enzima metaloproteinase 1 (MMP1) em células de macrófagos ativados THP1 irradiadas nas doses UV-A. As doses foram calculadas pela energia de 3,0 mW/cm² e tempo de exposição de 0', 30', 60', 90' e 180', respectivamente. "*" acima das barras de desvio mostra a significância estatística a P <0,05 (ANOVA) dos três experimentos independentes em relação ao controle escuro.

A liberação de MMP1 e TNF- α por macrófagos se correlaciona com o aumento da proteína MAPK^{erk1/2} [209] que são componentes da via de MAPK/ERK encontrados em células tumorais. Quando ocorre oxidação ou mutação em proteínas supressoras de tumores, mecanismos das vias de fosforilação ou desfosforilação são ativados por um processo de "on" ou "off" para evitar ativação de vias de desenvolvimento de câncer. Drogas que revertem ou interrompem a fosforilação "on" ou "off" estão sendo investigadas

como tratamentos de câncer [210]. Em muitos melanomas, por exemplo, um defeito na via de MAP/ERK leva ao crescimento descontrolado. Muitos compostos podem inibir passos na via da MAP/ERK, e, portanto, são potenciais fármacos para o tratamento de câncer [211–213]. MMPs, tais como a MMP9 podem estar envolvidos no desenvolvimento de várias malignidades humanas, tal como a degradação de colágeno tipo IV em membrana basal e da matriz extracelular que facilita a progressão tumoral, incluindo a invasão e metástase, [214].

A sinalização de fosforilação “on” e “off” dos fatores proteicos mutados responsáveis pelo controle do ciclo celular se destaca como meio de se evitar a tumorigênese. E isso se dá, provavelmente, através de processos biológicos orquestrados pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e pela ativação de mecanismos de morte celular programada.

5 CONCLUSÕES

GERAL: Há diversos fotossensibilizadores naturais (flavinas, melanina, lipofuscina), que atuam na região UV-A e visível do espectro de radiação solar, causando diversos efeitos deletérios. Aqui, foi mostrado pela primeira vez que a fotossensibilização da melanina pela luz visível causa danos em células de melanoma e melanócitos da pele. Foi demonstrado também de forma inédita que lipofuscina gerada pela luz UV-A age como um fotossensibilizador na luz visível e causa danos em células HaCaT. Esses efeitos causados pela luz visível deve ser levado em conta por profissionais da área de saúde bem como pela população em geral ao se expor à luz solar.

ESPECÍFICAS:

- ✓ Embora já se sabia que a melanina é fotoativa, foi observado pela primeira vez a emissão de $^1\text{O}_2$ proveniente da excitação da melanina por luz visível. A geração de $^1\text{O}_2$ com maior eficiência está relacionada com abertura da sua estrutura e a exposição dos seus resíduos fotoativos.
- ✓ Melanina localizada dentro da estrutura do cabelo humano gera e suprime $^1\text{O}_2$ sob excitação visível, sendo que a Feomelanina gera $^1\text{O}_2$ com mais eficiência que a Eumelanina; o que é uma forte evidência de que a eumelanina é a principal espécie de supressão de $^1\text{O}_2$ por suprimir $^1\text{O}_2$ com eficiência cinco vezes maior em cabelos pretos.
- ✓ Os dados obtidos das melaninas M^+ e UM^+ indicaram que a exposição dos cromóforos em uma localização subcelular ainda não conhecida pode esclarecer mais detalhes sobre os mecanismos que causam apoptose, necrose secundária e quebra o DNA genômico em células que sintetizaram melaninas M^+ e não em melanina UM^+ após excitação com luz visível. Dessa forma houve um grande avanço no conhecimento

norteado pelo fato da melanina UM⁺ promover pigmentação saudável atendendo à necessidade de um fotoprotetor contra luz visível.

- ✓ É interessante observar que nas doses UV-A maiores que 12J/cm² ocorreu mais morte em macrófagos J774 do que em queratinócitos HaCaT. Isso mostra que diferentes tipos celulares podem ativar mecanismos de sinalização distintos, mesmo com a mesma quantidade de energia de excitação conforme observado pela liberação de IL1 β , IL6, TNF- α , enzima MMP1 e indução de morte (MTT, NR e CVS).
- ✓ O aumento de lipofuscina no autofagolisossomo das células HaCaT estimuladas por luz UV-A nos fez mostrar pela primeira vez que a lipofuscina gerada pela luz UV-A atua como fotossensibilizador endógeno quando é fotoexcitada pela luz visível, causando dano no DNA e comprometendo a sobrevivência das células HaCaT.
- ✓ Mostrou-se pela primeira vez um processo fotoquímico sinérgico entre luz UV-A e visível causado pela fotossensibilização natural, sendo muito relevante para as novas estratégias de fotoproteção da pele.

6 REFERÊNCIAS

1. Spellberg B (2000) The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life sciences* 67: 477–502. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10993114>. Accessed 9 April 2014.
2. Wolk K, Witte K, Sabat R (2010) Interleukin-28 and interleukin-29: novel regulators of skin biology. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 30: 617–628. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712456>. Accessed 14 April 2014.
3. Wolpowitz D, Gilchrist BA (2006) The vitamin D questions: How much do you need and how should you get it? *Journal of the American Academy of Dermatology* 54: 301–317. Available: <Go to ISI>://000235068700014.
4. Forslind B (1995) The skin: upholder of physiological homeostasis. A physiological and (bio) physical study program. *Thrombosis research* 80: 1–22. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8578534>. Accessed 9 April 2014.
5. Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W (2009) Cell death in the skin. *Apoptosis* 14: 549–569. Available: <Go to ISI>://000264116600018.
6. Costin G-E, Hearing VJ (2007) Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21: 976–994. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17242160>. Accessed 14 April 2014.
7. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A (2013) Skin melanocytes: biology and development. *Postępy dermatologii i alergologii* 30: 30–41. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278043>. Accessed 28 June 2014.
8. Seiji M, SHIMAO K, BIRBECK MS, FITZPATRICK TB (1963) Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 100: 497–533. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13992624>. Accessed 14 April 2014.
9. Kushimoto T, Basrur V, Valencia J, Matsunaga J, Vieira WD, et al. (2001) A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 10698–10703. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=58529&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 14 April 2014.

10. Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, Schallreuter KU, Paus R, et al. (2005) Hair follicle pigmentation. *The Journal of investigative dermatology* 124: 13–21. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1201498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 28 June 2014.
11. Randall VA (2008) Androgens and hair growth. *Dermatologic therapy* 21: 314–328. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18844710>. Accessed 28 June 2014.
12. Tobin DJ (2011) The cell biology of human hair follicle pigmentation. *Pigment cell & melanoma research* 24: 75–88. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21070612>. Accessed 28 June 2014.
13. Commo S, Bernard BA (2000) Melanocyte subpopulation turnover during the human hair cycle: an immunohistochemical study. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 13: 253–259. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10952393>. Accessed 28 June 2014.
14. Nishimura EK (2011) Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment cell & melanoma research* 24: 401–410. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466661>. Accessed 28 June 2014.
15. Nogueira AC, Richena M, Dicelio LE, Joeques I (2007) Photo yellowing of human hair. *J Photochem Photobiol B* 88: 119–125. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627835>.
16. Santos Nogueira AC, Joeques I (2004) Hair color changes and protein damage caused by ultraviolet radiation. *J Photochem Photobiol B* 74: 109–117. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157906>.
17. Van der Mei IA, Blizzard L, Stankovich J, Ponsonby AL, Dwyer T (2002) Misclassification due to body hair and seasonal variation on melanin density estimates for skin type using spectrophotometry. *J Photochem Photobiol B* 68: 45–52. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208036>.
18. Bakos L (2006) Melanoma cutâneo: estudos de base populacional no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 81: 402–402. Available: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962006000500002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Accessed 3 August 2014.
19. Kolbe L (2012) How much sun protection is needed?: Are we on the way to full-spectrum protection? *The Journal of investigative dermatology* 132: 1756–1757. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695285>. Accessed 19 January 2014.

20. Liebel F, Kaur S, Ruvolo E, Kollias N, Southall MD (2012) Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. *The Journal of investigative dermatology* 132: 1901–1907. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318388>. Accessed 14 April 2014.
21. Mahmoud BH, Ruvolo E, Hexsel CL, Liu Y, Owen MR, et al. (2010) Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *The Journal of investigative dermatology* 130: 2092–2097. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410914>. Accessed 19 November 2013.
22. Takahashi T and N (2005) A study of the photolightening mechanism of red hair with visible and ultraviolet light: comparison with blond hair. *Journal of cosmetic science* 56: 47–56. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15744440>. Accessed 19 November 2013.
23. Hearing VJ, Tsukamoto K (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5: 2902–2909. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1752358>. Accessed 14 April 2014.
24. Wakamatsu K, Ito S (2002) Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 15: 174–183. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12028581>. Accessed 30 May 2014.
25. Duval C, Smit NPM, Kolb AM, Régnier M, Pavel S, et al. (2002) Keratinocytes control the pheo/eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 15: 440–446. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453186>. Accessed 14 April 2014.
26. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews* 84: 1155–1228. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383650>. Accessed 14 April 2014.
27. Ito S, Wakamatsu K (2008) Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochemistry and photobiology* 84: 582–592. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18435614>. Accessed 29 May 2014.
28. Grant WB, Garland CF, Holick MF (2005) Comparisons of estimated economic burdens due to insufficient solar ultraviolet irradiance and vitamin D and excess solar UV irradiance for the United States.

- Photochem Photobiol 81: 1276–1286. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16159309>.
29. Scrima A, Konícková R, Czyzewski BK, Kawasaki Y, Jeffrey PD, et al. (2008) Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell* 135: 1213–1223. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2676164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 8 November 2013.
 30. Swalwell H, Latimer J, Haywood RM, Birch-Machin MA (2012) Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free radical biology & medicine* 52: 626–634. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178978>. Accessed 24 November 2013.
 31. Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, Hoang MP, et al. (2012) An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature* 491: 449–453. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3521494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 29 July 2014.
 32. Nofsinger JB, Liu Y, Simon JD (2002) Aggregation of eumelanin mitigates photogeneration of reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 32: 720–730. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937298>. Accessed 24 June 2014.
 33. Kvam E, Tyrrell RM (1999) The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology* 113: 209–213. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469305>. Accessed 2 June 2014.
 34. Bandyopadhyay D, Medrano EE (2000) Melanin accumulation accelerates melanocyte senescence by a mechanism involving p16INK4a/CDK4/pRB and E2F1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 908: 71–84. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911949>. Accessed 24 June 2014.
 35. Medrano EE, Yang F, Boissy R, Farooqui J, Shah V, et al. (1994) Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. *Molecular biology of the cell* 5: 497–509. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=301058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 24 June 2014.
 36. Jenkins NC, Grossman D (2013) Role of melanin in melanocyte dysregulation of reactive oxygen species. *BioMed research international* 2013: 908797. Available:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3600250&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 17 October 2014.

37. Duthie MS, Kimber I, Norval M (1999) The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *British Journal of Dermatology* 140: 995–1009. Available: <Go to ISI>://000080981100002.
38. Hussein MR (2005) Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *Journal of cutaneous pathology* 32: 191–205. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701081>. Accessed 16 May 2014.
39. Schuch AP, Garcia CCM, Makita K, Menck CFM (2013) DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 12: 1259–1272. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525255>. Accessed 15 October 2014.
40. Lin JY, Fisher DE (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445: 843–850. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314970>. Accessed 18 January 2014.
41. Niida H, Nakanishi M (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21: 3–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314342>. Accessed 31 May 2014.
42. Rouse J, Jackson SP (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science (New York, NY)* 297: 547–551. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142523>. Accessed 23 December 2013.
43. Lehmann B, Meurer M (2010) Vitamin D metabolism. *Dermatologic therapy* 23: 2–12. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20136904>. Accessed 31 May 2014.
44. Silva BCC, Camargos BM, Fujii JB, Dias EP, Soares MMS (2008) Prevalência de deficiência e insuficiência de vitamina D e sua correlação com PTH, marcadores de remodelação óssea e densidade mineral óssea, em pacientes ambulatoriais. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 52: 482–488. Available: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302008000300008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Accessed 22 April 2014.
45. Corrêa M de P, Godin-Beekmann S, Haefelin M, Bekki S, Saiag P, et al. (2013) Projected changes in clear-sky erythemal and vitamin D effective UV doses for Europe over the period 2006 to 2100. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 12: 1053–1064.

Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23549360>. Accessed 18 November 2013.

46. Norval M, Björn LO, de Grujil FR (2010) Is the action spectrum for the UV-induced production of previtamin D₃ in human skin correct? *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 9: 11–17. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20062839>. Accessed 18 December 2013.
47. Shorrocks J, Paul ND, McMillan TJ (2008) The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 128: 685–693. doi:10.1038/sj.jid.5701037.
48. Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, et al. (2007) Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis. *Am J Prev Med* 32: 210–216. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296473>.
49. Hagenau T, Vest R, Gissel TN, Poulsen CS, Erlandsen M, et al. (2009) Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int* 20: 133–140. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458986>.
50. Holick MF (2005) The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr* 135: 2739S–48S. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251641>.
51. Shorrocks J, Paul ND, McMillan TJ (2008) The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 128: 685–693. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17762856>.
52. Dixon KM, Sequeira VB, Camp AJ, Mason RS (2010) Vitamin D-fence. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 9: 564–570. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354652>. Accessed 24 November 2013.
53. Gilchrest BA (2008) Sun exposure and vitamin D sufficiency. *Am J Clin Nutr* 88: 570S–577S. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18689404>.
54. Vile GF, Tyrrell RM (1995) UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free radical biology & medicine* 18: 721–730.

Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7750796>. Accessed 15 March 2014.

55. Berneburg M, Grether-Beck S, Kürten V, Ruzicka T, Briviba K, et al. (1999) Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *The Journal of biological chemistry* 274: 15345–15349. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10336420>. Accessed 15 March 2014.
56. Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, et al. (2004) The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4954–4959. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=387355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 15 March 2014.
57. Halliday GM, Agar NS, Barnetson RSC, Ananthaswamy HN, Jones AM (2005) UV-A fingerprint mutations in human skin cancer. *Photochemistry and photobiology* 81: 3–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15335275>. Accessed 15 March 2014.
58. Kvam E, Tyrrell RM (1997) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 18: 2379–2384. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450485>. Accessed 19 January 2014.
59. Kielbassa C, Roza L, Epe B (1997) Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 18: 811–816. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111219>. Accessed 19 January 2014.
60. Uchoa AF, Knox PP, Turchielle R, Seifullina Nk, Baptista MS (2008) Singlet oxygen generation in the reaction centers of Rhodobacter sphaeroides. *Eur Biophys J* 37: 843–850. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286272>.
61. Sekar R, Dichristina TJ (2014) Microbially Driven Fenton Reaction For Degradation of the Widespread Environmental Contaminant 1,4-Dioxane. *Environmental science & technology*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313646>. Accessed 15 October 2014.
62. Foote CS (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 162: 963–970. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4972417>.

63. Ronsein GE, Oliveira MCB, Miyamoto S, Medeiros MHG, Di Mascio P (2008) Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [O₂(¹Δ_g): mechanistic studies using ¹⁸O-labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements. *Chemical research in toxicology* 21: 1271–1283. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457429>. Accessed 14 April 2014.
64. Baptista MS, Indig GL (1998) Effect of BSA binding on photophysical and photochemical properties of triarylmethane dyes. *Journal of Physical Chemistry B* 102: 4678–4688. Available: <Go to ISI>://000074153300028.
65. Henderson BW, Dougherty TJ (1992) How Does Photodynamic Therapy Work. *Photochemistry and Photobiology* 55: 145–157. Available: <Go to ISI>://A1992HB08500021.
66. Ochsner M (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 39: 1–18. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9210318>.
67. Wainwright M (1996) Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. *Chemical Society Reviews* 25: 351–+. Available: <Go to ISI>://A1996VZ78000007.
68. Matas A, Sowa MG, Taylor G, Mantsch HH (2002) Melanin as a confounding factor in near infrared spectroscopy of skin. *Vibrational Spectroscopy* 28: 45–52. Available: <Go to ISI>://000175313100006.
69. Jung MY, Kim SK, Kim SY (1995) Riboflavin-Sensitized Photooxidation of Ascorbic-Acid - Kinetics and Amino-Acid Effects. *Food Chemistry* 53: 397–403. Available: <Go to ISI>://A1995RF83100009.
70. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T (2004) Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye (London, England)* 18: 718–722. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14739922>. Accessed 23 December 2013.
71. Terman A, Kurz T, Navratil M, Arriaga EA, Brunk UT (2010) Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants & redox signaling* 12: 503–535. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2861545&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 19 November 2013.
72. Speck WT, Chen CC, Rosenkranz HS (1975) In vitro studies of effects of light and riboflavin on DNA and HeLa cells. *Pediatric research* 9: 150–153. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1121420>. Accessed 31 May 2014.
73. Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, et al. (2006) Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous

- photosensitizers. *Biophysical journal* 91: 1452–1459. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1518628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 31 May 2014.
74. Joshi PC (1989) Ultraviolet radiation-induced photodegradation and $1O_2$, O_2^- production by riboflavin, lumichrome and lumiflavin. *Indian journal of biochemistry & biophysics* 26: 186–189. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2620914>. Accessed 23 December 2013.
75. Muñoz MA, Pacheco A, Becker MI, Silva E, Ebensperger R, et al. (2011) Different cell death mechanisms are induced by a hydrophobic flavin in human tumor cells after visible light irradiation. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 103: 57–67. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21306911>. Accessed 23 December 2013.
76. Roberts OL, Holmes K, Muller J, Cross DA, Cross MJ (2009) ERK5 and the regulation of endothelial cell function. *Biochem Soc Trans* 37: 1254–1259. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909257>.
77. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, et al. (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337: 1419–1428. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358139>.
78. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 5: 415–418. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256882>. Accessed 25 June 2014.
79. McConkey DJ (1998) Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology letters* 99: 157–168. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862281>. Accessed 25 June 2014.
80. Henderson BW, Dougherty TJ (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and photobiology* 55: 145–157. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1603846>. Accessed 25 June 2014.
81. Zhang XJ, Khan SI, Foote CS (1995) Reactions of Singlet Oxygen and N-Phenyl-1,2,4-Triazoline-3,5-Dione with Adamantylidenecyclopentadiene - O-O Homolytic Vs C-N Heterolytic Cleavage of the Initial [2+4]-Cycloadducts. *Journal of Organic Chemistry* 60: 4102–4107. Available: <Go to ISI>://A1995RK22600029.
82. Galvez C, Ho DG, Azod A, Selke M (2001) Reaction of a coordinated cysteinato ligand with singlet oxygen: photooxidation of (cysteinato-N,S)bis(ethylenediamine)cobalt(III). *Journal of the American Chemical Society* 123: 3381–3382. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457080>. Accessed 14 April 2014.

83. Cosa G, Scaiano JC (2004) Laser techniques in the study of drug photochemistry. *Photochem Photobiol* 80: 159–174. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15307807>.
84. Klotz LO, Kroncke KD, Sies H (2003) Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci* 2: 88–94. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12664966>.
85. Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CCX, et al. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radical Biology and Medicine* 32: 841–859. Available: <Go to ISI>://000175291200008.
86. Gonsette RE (2008) Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci* 274: 48–53. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684473>.
87. Valenzano DP (1987) Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochem Photobiol* 46: 147–160. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3303072>.
88. Caetano W, Haddad PS, Itri R, Severino D, Vieira VC, et al. (2007) Photo-induced destruction of giant vesicles in methylene blue solutions. *Langmuir* 23: 1307–1314. Available: <Go to ISI>://000243684100057.
89. Prado FM, Oliveira MCB, Miyamoto S, Martinez GR, Medeiros MHG, et al. (2009) Thymine hydroperoxide as a potential source of singlet molecular oxygen in DNA. *Free radical biology & medicine* 47: 401–409. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426799>. Accessed 14 April 2014.
90. Cadet J, Douki T, Ravanat J-L (2011) Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. *Mutation research* 711: 3–12. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21329709>. Accessed 12 November 2013.
91. Cadet J, Wagner JR (2013) DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23378590>. Accessed 8 November 2013.
92. Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27: 247–254. Available: <Go to ISI>://000167304200012.
93. Rouse J, Jackson SP (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297: 547–551. Available: <Go to ISI>://000177054200036.

94. Zhang Z, Leonard SS, Huang C, Vallyathan V, Castranova V, et al. (2003) Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G(2)/M phase arrest. *Free radical biology & medicine* 34: 1333–1342. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12726921>. Accessed 3 August 2014.
95. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany* 91 Spec No: 179–194. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509339>. Accessed 3 August 2014.
96. Aruoma OI (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 32: 671–683. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8045480>. Accessed 3 August 2014.
97. Abordo EA, Minhas HS, Thornalley PJ (1999) Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochemical pharmacology* 58: 641–648. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413301>. Accessed 23 December 2013.
98. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N (2005) Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 204: 263–273. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845418>. Accessed 23 December 2013.
99. Brigelius-Flohé R (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free radical biology & medicine* 27: 951–965. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569628>. Accessed 23 December 2013.
100. Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology & medicine* 30: 1191–1212. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368918>. Accessed 18 December 2013.
101. James SJ, Melnyk S, Fuchs G, Reid T, Jernigan S, et al. (2009) Efficacy of methylcobalamin and folinic acid treatment on glutathione redox status in children with autism. *The American journal of clinical nutrition* 89: 425–430. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2647708&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 23 December 2013.
102. Roberts OL, Holmes K, Muller J, Cross DAE, Cross MJ (2009) ERK5 and the regulation of endothelial cell function. *Biochemical Society Transactions* 37: 1254–1259. Available: <Go to ISI>://000272646000020.

103. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415–418. Available: <Go to ISI>://000166859100002.
104. Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CCX, et al. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free radical biology & medicine* 32: 841–859. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978486>. Accessed 25 June 2014.
105. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 324 (Pt 1: 1–18). Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164834>.
106. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT (1999) Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free radical biology & medicine* 27: 1151–1163. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10641706>. Accessed 24 June 2014.
107. Muller HK, Bucana CD, Kripke ML, Cox PA, Saijo S, et al. (1994) Ultraviolet-Irradiation of Murine Skin Alters Cluster Formation between Lymph-Node Dendritic Cells and Specific T-Lymphocytes. *Cellular Immunology* 157: 263–276. Available: <Go to ISI>://A1994NZ09300022.
108. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, et al. (1994) Sunburn and P53 in the Onset of Skin-Cancer. *Nature* 372: 773–776. Available: <Go to ISI>://A1994PY21200051.
109. Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK (2001) Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunology and Cell Biology* 79: 547–568. Available: <Go to ISI>://000179817300003.
110. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770–776. Available: <Go to ISI>://000089773900051.
111. Nicholson DW, Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 299–306. Available: <Go to ISI>://A1997XR12800010.
112. Boatright KM, Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 725–731. Available: <Go to ISI>://000187109200011.
113. Glick D, Barth S, Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *221*: 3–12. doi:10.1002/path.2697.Autophagy.
114. Lamore SD, Wondrak GT (2012) Autophagic-lysosomal dysregulation downstream of cathepsin B inactivation in human skin fibroblasts exposed to UVA. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for*

- Photobiology 11: 163–172. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21773629>. Accessed 9 April 2014.
115. Lamore SD, Wondrak GT (2013) UVA causes dual inactivation of cathepsin B and L underlying lysosomal dysfunction in human dermal fibroblasts. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 123: 1–12. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23603447>. Accessed 9 April 2014.
 116. Rodgers KJ, Hume PM, Morris JGL, Dean RT (2006) Evidence for L-dopa incorporation into cell proteins in patients treated with levodopa. *Journal of neurochemistry* 98: 1061–1067. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16771833>. Accessed 19 November 2013.
 117. Dunlop RA, Brunk UT, Rodgers KJ (2009) Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB life* 61: 522–527. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19391165>. Accessed 19 November 2013.
 118. Sparrow JR, Wu Y, Nagasaki T, Yoon KD, Yamamoto K, et al. (2010) Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 9: 1480–1489. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20862444>. Accessed 21 May 2014.
 119. Wlaschek M, Wenk J, Brenneisen P, Briviba K, Schwarz A, et al. (1997) Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro. *FEBS Lett* 413: 239–242. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9280289>.
 120. Ghildiyal R, Dixit D, Sen E (2013) EGFR inhibitor BIBU induces apoptosis and defective autophagy in glioma cells. *Molecular carcinogenesis* 52: 970–982. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753156>. Accessed 14 April 2014.
 121. Noworyta-Sokołowska K, Górska A, Gołombiowska K (2013) LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacological reports: PR* 65: 863–869. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145080>.
 122. Herrlich P, Böhmer FD (2000) Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochemical pharmacology* 59: 35–41. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605932>. Accessed 23 December 2013.

123. Godar DE (2000) Singlet oxygen-triggered immediate preprogrammed apoptosis. *Methods Enzymol* 319: 309–330. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10907523>.
124. Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Poppelmann B, et al. (1998) Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 140: 171–182. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9425165>.
125. Li N, Karin M (2000) Signaling pathways leading to nuclear factor-kappa B activation. *Methods Enzymol* 319: 273–279. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10907518>.
126. Klotz LO, Pellieux C, Briviba K, Pierlot C, Aubry JM, et al. (1999) Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur J Biochem* 260: 917–922. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10103024>.
127. Kroncke KD, Klotz LO, Suschek C V, Sies H (2002) Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger-dependent transcription. Unique role for NO. *J Biol Chem* 277: 13294–13301. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796720>.
128. Klotz L-O (n.d.) Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biological chemistry* 383: 443–456. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12033434>. Accessed 19 November 2013.
129. Girotti AW, Korytowski W (2000) Cholesterol as a singlet oxygen detector in biological systems. *Singlet Oxygen, Uv-a, and Ozone* 319: 85–100. Available: <Go to ISI>://000089101100009.
130. Steenport M, Khan KMF, Du B, Barnhard SE, Dannenberg AJ, et al. (2009) Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF-alpha and cyclooxygenase-2. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 183: 8119–8127. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3621723&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 23 December 2013.
131. Büth H, Luigi Buttigieg P, Ostafe R, Rehders M, Dannenmann SR, et al. (2007) Cathepsin B is essential for regeneration of scratch-wounded normal human epidermal keratinocytes. *European journal of cell biology* 86: 747–761. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651862>. Accessed 15 May 2014.
132. Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A (2009) Keratinocyte-conditioned media regulate collagen expression in dermal fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology* 129: 340–347. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18787532>. Accessed 19 November 2013.

133. Zhong JL, Yiakouvaki A, Holley P, Tyrrell RM, Pourzand C (2004) Susceptibility of skin cells to UVA-induced necrotic cell death reflects the intracellular level of labile iron. *The Journal of investigative dermatology* 123: 771–780. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15373784>. Accessed 5 June 2014.
134. Kang R, Tang D, Lotze MT, Zeh HJ (2012) AGER/RAGE-mediated autophagy promotes pancreatic tumorigenesis and bioenergetics through the IL6-pSTAT3 pathway. *Autophagy* 8: 989–991. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3427269&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 14 April 2014.
135. Inoue K, Hosoi J, Denda M (2007) Extracellular ATP has stimulatory effects on the expression and release of IL-6 via purinergic receptors in normal human epidermal keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 127: 362–371. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16946718>. Accessed 23 December 2013.
136. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B (2011) Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 119: 3–19. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829425>. Accessed 23 December 2013.
137. Haywood RM, Lee M, Andrady C (2008) Comparable photoreactivity of hair melanosomes, eu- and pheomelanins at low concentrations: low melanin a risk factor for UVA damage and melanoma? *Photochemistry and photobiology* 84: 572–581. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18399925>. Accessed 19 January 2014.
138. Tadokoro T, Kobayashi N, Zmudzka BZ, Ito S, Wakamatsu K, et al. (2003) UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17: 1177–1179. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692083>. Accessed 19 January 2014.
139. Ito S, Wakamatsu K (2003) Quantitative Analysis of Eumelanin and Pheomelanin in Humans, Mice, and Other Animals: a Comparative Review. *Pigment Cell Research* 16: 523–531. Available: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1034/j.1600-0749.2003.00072.x>. Accessed 18 November 2013.
140. Ito S (1989) Optimization of conditions for preparing synthetic pheomelanin. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 2: 53–56. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2497445>. Accessed 24 June 2014.

141. Beltrán-García MJ, Prado FM, Oliveira MS, Ortiz-Mendoza D, Scalfio AC, et al. (2014) Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in black Sigatoka disease of bananas. *PloS one* 9: e91616. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3960117&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 19 June 2014.
142. Kongshoj B, Mikkelsen ND, Kobayasi T, Lerche CM, Wulf HC (2007) Ammonium chloride and L-tyrosine enhance melanogenesis in vitro but not in vivo even in combination with ultraviolet radiation. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 23: 197–202. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17803599>. Accessed 29 November 2013.
143. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248–254. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
144. Daghasanli NA, Itri R, Baptista MS (2008) Singlet oxygen reacts with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and contributes to the formation of 2',7'-dichlorofluorescein. *Photochemistry and Photobiology* 84: 1238–1243. Available: <Go to ISI>://000258785500024.
145. Takanashi T, Ogura Y, Taguchi H, Hashizoe M, Honda Y (1997) Fluorophotometric quantitation of oxidative stress in the retina in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science* 38: 2721–2728.
146. Ganguly A, Das B, Roy A, Sen N, Dasgupta SB, et al. (2007) Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death. *Cancer research* 67: 11848–11858. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1615.
147. Yoon YH, Cho KS, Hwang JJ, Lee S (2010) Chloroquine induces lysosomal dilatation, arrested autophagy and cell death in cultured ARPE-19 cells: 1–42.
148. Oyama Y, Hayashi A, Ueha T, Maekawa K (1994) Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain research* 635: 113–117.
149. Zielonka J, Kalyanaraman B (2010) Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free radical biology & medicine* 48: 983–1001. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3587154&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 23 December 2013.

150. Pendergrass W, Wolf N, Poot M (2004) Efficacy of MitoTracker Green and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 61: 162–169. doi:10.1002/cyto.a.20033.
151. Carmichaell J, Mitchell JB, Degraff WG, Gamson J, Gazdarl AF (1988) Chemosensitivity testing of human lung MTT assay lines using the. 547: 540–547.
152. Martins WK, Severino D, Souza C, Stolf BS, Baptista MS (2013) Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. *Biotechnology journal* 8: 730–737. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420785>. Accessed 14 April 2014.
153. Collier AC, Pritsos CA (2003) The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochemical pharmacology* 66: 281–287. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826270>. Accessed 23 December 2013.
154. Martins WK, Severino D, Souza C, Stolf BS, Baptista MS (2013) Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. *Biotechnology journal* 8: 730–737. doi:10.1002/biot.201200306.
155. Damianovich M, Ziv I, Heyman SN, Rosen S, Shina A, et al. (2006) ApoSense: a novel technology for functional molecular imaging of cell death in models of acute renal tubular necrosis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 33: 281–291. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1998881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 14 April 2014.
156. Ormerod MG, Sun XM, Brown D, Snowden RT, Cohen GM (1993) Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 32: 417–424. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8369130>. Accessed 14 April 2014.
157. Insińska-Rak M, Sikorska E, Bourdelande JL, Khmelinskii I V., Prukala W, et al. (2007) New photochemically stable riboflavin analogue—3-Methyl-riboflavin tetraacetate. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 186: 14–23. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603006003790>. Accessed 15 April 2014.
158. Insińska-Rak M, Sikorska E, Bourdelande JL, Khmelinskii I V., Prukala W, et al. (2007) New photochemically stable riboflavin analogue—3-Methyl-riboflavin tetraacetate. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 186: 14–23. doi:10.1016/j.jphotochem.2006.07.005.
159. Cabantchik ZI, Munnich A, Youdim MB, Devos D (2013) Regional siderosis: a new challenge for iron chelation therapy. *Frontiers in*

- pharmacology 4: 167. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3875873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 15 April 2014.
160. Galus R, Sajjad E, Niderla J, Borowska K, Włodarski K, et al. (2009) Fluvastatin increases tyrosinase synthesis induced by UVB irradiation of B16F10 melanoma cells. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 47: 363–365. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164019>. Accessed 23 June 2014.
161. Vieira VC, Severino D, Oliveira Jr. ON, Pavinatto FJ, Zaniquelli ME, et al. (2009) Langmuir films of petroleum at the air-water interface. *Langmuir* 25: 12585–12590. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19702245>.
162. Katritzky AR, Akhmedov NG, Denisenko SN, Denisko O V (2002) ¹H NMR spectroscopic characterization of solutions of Sepia melanin, Sepia melanin free acid and human hair melanin. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 15: 93–97. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11936275>. Accessed 12 May 2014.
163. Chiarelli-Neto O, Pavani C, S Ferreira A, Uchoa AF, Severino D, et al. (2011) Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. *Free radical biology & medicine* 51: 1195–1202. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.013.
164. Michaeli A, Feitelson J (1994) Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochemistry and photobiology* 59: 284–289. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8016206>. Accessed 12 May 2014.
165. Igarashi N, Onoue S, Tsuda Y (2007) Photoreactivity of amino acids: tryptophan-induced photochemical events via reactive oxygen species generation. *Anal Sci* 23: 943–948. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690425>.
166. Toffoletti A, Conti F, Sandron T, Napolitano A, Panzella L, et al. (2009) Time-resolved EPR observation of synthetic eumelanin-superoxide radical pairs. *Chemical communications (Cambridge, England)*: 4977–4979. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668821>. Accessed 25 November 2013.
167. Rees JL (2003) Genetics of hair and skin color. *Annual review of genetics* 37: 67–90. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14616056>. Accessed 19 January 2014.
168. Liu Y, Hong L, Wakamatsu K, Ito S, Adhyaru B, et al. (2005) Comparison of structural and chemical properties of black and red human hair

- melanosomes. *Photochemistry and photobiology* 81: 135–144. doi:10.1562/2004-08-03-RA-259.
169. Barnicot NA, Birbeck MSC (1958) The electron microscopy of human melanocytes and melanin granules. In *Biology of Hair Growth*: 239–252.
 170. Liebmann J, Born M, Kolb-Bachofen V (2010) Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *The Journal of investigative dermatology* 130: 259–269. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19675580>. Accessed 25 November 2013.
 171. Nogueira ACS, Richena M, Dicelio LE, Joekes I (2007) Photo yellowing of human hair. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 88: 119–125. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627835>. Accessed 24 November 2013.
 172. Nogueira AC, Dicelio LE, Joekes I (2006) About photo-damage of human hair. *Photochem Photobiol Sci* 5: 165–169. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16465301>.
 173. Hennessy A, Oh C, Diffey B, Wakamatsu K, Ito S, et al. (2005) Eumelanin and pheomelanin concentrations in human epidermis before and after UVB irradiation. *Pigment Cell Res* 18: 220–223. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15892719>.
 174. Ito S, Wakamatsu K (2003) Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res* 16: 523–531. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950732>.
 175. Liu Y, Simon JD (2003) Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 16: 606–618. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14629718>. Accessed 23 April 2014.
 176. Forest SE, Simon JD (1998) Wavelength-dependent photoacoustic calorimetry study of melanin. *Photochemistry and photobiology* 68: 296–298. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9747585>. Accessed 24 June 2014.
 177. Chin KK, Trevithick-Sutton CC, McCallum J, Jockusch S, Turro NJ, et al. (2008) Quantitative determination of singlet oxygen generated by excited state aromatic amino acids, proteins, and immunoglobulins. *Journal of the American Chemical Society* 130: 6912–6913. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18459785>. Accessed 24 June 2014.

178. Redmond RW, Gamlin JN (1999) A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol* 70: 391–475. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10546544>.
179. Ito S (2003) The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 16: 230–236. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753395>. Accessed 24 June 2014.
180. Wilkinson F, Helman WP, Ross AB (1995) Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *J Phys Chem Ref Data* 24: 663–678. doi:doi:10.1063/1.555965.
181. Heo S-J, Ko S-C, Cha S-H, Kang D-H, Park H-S, et al. (2009) Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 23: 1123–1130. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490939>. Accessed 30 November 2013.
182. Dixon KM, Sequeira VB, Camp AJ, Mason RS (2010) Vitamin D-fence. *Photochem Photobiol Sci* 9: 564–570. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354652>.
183. Hussein MR (2005) Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *Journal of Cutaneous Pathology* 32: 191–205. Available: <Go to ISI>://000226857100001.
184. Virador VM, Kobayashi N, Matsunaga J, Hearing VJ (1999) A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Analytical biochemistry* 270: 207–219. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334838>. Accessed 18 November 2013.
185. Tadokoro T, Kobayashi N, Zmudzka BZ, Ito S, Wakamatsu K, et al. (2003) UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB J* 17: 1177–1179. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692083>.
186. Foote CS, Wexler S, Ando W, Higgins R (1968) Chemistry of Singlet Oxygen .4. Oxygenations with Hypochlorite-Hydrogen Peroxide. *Journal of the American Chemical Society* 90: 975–&. Available: <Go to ISI>://A1968A629300025.
187. Prado FM, Oliveira MCB, Miyamoto S, Martinez GR, Medeiros MHG, et al. (2009) Thymine hydroperoxide as a potential source of singlet

molecular oxygen in DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 47: 401–409. Available: <Go to ISI>://000268386100008.

188. Ronsein GE, Oliveira MCB, Miyamoto S, Medeiros MHG, Di Mascio P (2008) Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [O-2 ((1)Delta(g))]: Mechanistic studies using O-18-labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements. *Chemical Research in Toxicology* 21: 1271–1283. Available: <Go to ISI>://000256806600013.
189. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA (2009) Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and molecular life sciences*: CMLS 66: 1493–1506. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153661>. Accessed 12 May 2014.
190. Trapp C, Reite K, Klungland A, Epe B (2007) Deficiency of the Cockayne syndrome B (CSB) gene aggravates the genomic instability caused by endogenous oxidative DNA base damage in mice. *Oncogene* 26: 4044–4048. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213818>. Accessed 29 November 2013.
191. Enninga IC, Groenendijk RTL, Filon AR, Zeeland AA van, Simons JWIM (1986) The wavelength dependence of u.v.-induced pyrimidine dimer formation, cell killing and mutation induction in human diploid skin fibroblasts. *Carcinogenesis* 7: 1829–1836. Available: <http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/7.11.1829>. Accessed 29 November 2013.
192. Matsunaga T, Hieda K, Nikaido O (1991) WAVELENGTH DEPENDENT FORMATION OF THYMINE DIMERS AND (6-4)PHOTOPRODUCTS IN DNA BY MONOCHROMATIC ULTRAVIOLET LIGHT RANGING FROM 150 TO 365 nm. *Photochemistry and Photobiology* 54: 403–410. Available: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1991.tb02034.x>. Accessed 29 November 2013.
193. Rosenstein BS, Mitchell DL (1987) ACTION SPECTRA FOR THE INDUCTION OF PYRIMIDINE(6-4)PYRIMIDONE PHOTOPRODUCTS AND CYCLOBUTANE PYRIMIDINE DIMERS IN NORMAL HUMAN SKIN FIBROBLASTS. *Photochemistry and Photobiology* 45: 775–780. Available: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1987.tb07881.x>. Accessed 29 November 2013.
194. Chiarelli-Neto O, Pavani C, Ferreira AS, Uchoa AF, Severino D, et al. (2011) Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. *Free radical biology & medicine* 51: 1195–1202. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723388>. Accessed 18 November 2013.
195. Brunk UT, Terman A (2002) Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free radical biology &*

- medicine 33: 611–619. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208347>. Accessed 23 December 2013.
196. Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97: 1634–1658. Available: <Go to ISI>://000238144200010.
 197. Cieplik F, Späth A, Leibl C, Gollmer A, Regensburger J, et al. (2013) Blue light kills *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* due to its endogenous photosensitizers. *Clinical oral investigations*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24297656>. Accessed 23 December 2013.
 198. Cardoso DR, Libardi SH, Skibsted LH (2012) Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. *Food & function* 3: 487–502. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406738>. Accessed 28 May 2014.
 199. Grebel JE, Pignatello JJ, Mitch WA (2011) Sorbic acid as a quantitative probe for the formation, scavenging and steady-state concentrations of the triplet-excited state of organic compounds. *Water research* 45: 6535–6544. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22027384>. Accessed 15 May 2014.
 200. Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ (2012) The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2: a009357. doi:10.1101/cshperspect.a009357.
 201. Kroemer G, Jäättelä M (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature reviews Cancer* 5: 886–897. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239905>. Accessed 23 December 2013.
 202. Cadet J, Douki T (2011) Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. *The Journal of investigative dermatology* 131: 1005–1007. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21494240>. Accessed 19 June 2014.
 203. Bylaite M, Moussali H, Marciukaitiene I, Ruzicka T, Walz M (2006) Expression of cathepsin L and its inhibitor hurpin in inflammatory and neoplastic skin diseases. *Experimental dermatology* 15: 110–118. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16433682>. Accessed 15 May 2014.
 204. Schönefuss A, Wendt W, Schattling B, Schulten R, Hoffmann K, et al. (2010) Upregulation of cathepsin S in psoriatic keratinocytes. *Experimental dermatology* 19: e80–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19849712>. Accessed 15 May 2014.

205. Büth H, Luigi Buttigieg P, Ostafe R, Rehders M, Dannenmann SR, et al. (2007) Cathepsin B is essential for regeneration of scratch-wounded normal human epidermal keratinocytes. *European journal of cell biology* 86: 747–761. doi:10.1016/j.ejcb.2007.03.009.
206. Schönefuss A, Wendt W, Schattling B, Schulten R, Hoffmann K, et al. (2010) Upregulation of cathepsin S in psoriatic keratinocytes. *Experimental dermatology* 19: e80–8. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00990.x.
207. Girotti AW (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 63: 103–113. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684457>.
208. Pierlot C, Aubry JM, Briviba K, Sies H, Di Mascio P (2000) Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Singlet Oxygen, Uv-a, and Ozone* 319: 3–20. Available: <Go to ISI>://000089101100001.
209. Steenport M, Khan KMF, Du B, Barnhard SE, Dannenberg AJ, et al. (2009) Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF-alpha and cyclooxygenase-2. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 183: 8119–8127. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3621723&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 19 November 2013.
210. Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 3: 11–22. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509763>. Accessed 27 June 2014.
211. Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25: 511–518. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12566895>. Accessed 27 June 2014.
212. Sebolt-Leopold JS (2008) Advances in the development of cancer therapeutics directed against the RAS-mitogen-activated protein kinase pathway. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 14: 3651–3656. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559577>. Accessed 27 June 2014.
213. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, et al. (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1773: 1263–1284. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2696318&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 27 June 2014.
214. Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M (2012) The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the

development of esophageal cancer. *Folia histochemica et cytobiologica* / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society 50: 12–19. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22532131>. Accessed 27 June 2014.

7 CURRICULUM VITAE

Orlando Chiarelli Neto

Dado Pessoais

Data e local de nascimento: 05 de Junho de 1980, Colatina, Espírito Santo, Brasil

Endereço comercial:

Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces

Departamento de Bioquímica

Instituto de Química

Universidade de São Paulo (USP)

Av. Lineu Prestes 748, Bloco 12, Sala 1262, Butantã (05508-900), São Paulo, Brasil

Telefone: 55-11-3091-8951

e-mail: orlandobqi@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA:

Graduação: Bacharel em Bioquímica (2007-1): Universidade Federal de Viçosa-MG: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Monografia: Análise do DNA de diferentes isolados brasileiros de Circovírus Suíno 2.

Mestrado: Mestre em Bioquímica (2009-1): Universidade Federal de Viçosa-MG: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Dissertação de mestrado: Estudo filogeográfico e Construção de uma Vacina Recombinante do Circovírus suíno 2;

Doutorado: Doutorado em Bioquímica (2014-2): Universidade de São Paulo-USP: Instituto de Química: Departamento de Bioquímica.

Tese de doutorado: Efeitos da luz UV-A e visível em células da pele e no cabelo

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

8 ATIVIDADES DIDÁTICAS

Universidade de São Paulo, USP, Brasil: Vínculo institucional (2013 – 2013)

Monitor de Bioquímica e Biologia Molecular: Odontologia, Carga horária semanal: 8 horas

Universidade de São Paulo, USP, Brasil: Vínculo institucional (2012 – 2012)

Monitor de Bioquímica e Biologia Molecular: Educação Física e Esporte, Carga horária semanal: 8 horas

Universidade de São Paulo, USP, Brasil: Vínculo institucional (2011 – 2011)

Monitor de Bioquímica Metabólica e Biologia Molecular: Nutrição, Carga horária semanal: 8 horas

9 APRESENTAÇÕES ORAIS

Apresentação do trabalho **“Stimulus of melanin production without causing toxicity to melanocytes”**. In 27^a IFSCC, South África, 15-18 Coobe 2012.

Participação como ministrante do Seminário **“Fotoquímica do cabelo”** como parte integrante da disciplina QBQ 0215 – Bioquímica, estrutura de Biomoléculas e Metabolismo realizada pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, no período de 22 de setembro de 2011, sob coordenação do Prof. Dr. Bayard Baptista Torres.

Participação como ministrante do Seminário “**Bioquímica da melanina e do cabelo**” realizado pelo **Centro de Engenharia Biomédica - Unicastelo**, São José dos Campos no período de 14 de março de 2012, sob coordenação do Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro.

Participação como ministrante do **VI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular** realizado pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, no período de 10 a 14 de janeiro de 2011, com duração de 40 horas sob coordenação do Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres.

Participação como monitor do **VI Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular** realizado pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, no período de 04 a 15 de julho de 2011 sob coordenação do Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

Chiarelli-Neto, Orlando, Viotto, Ana Claudia Silva, Alan S. Ferreira, Christiane Pavani, Martins, Waleska Kerllen Gardesani, Severino, Divinomar, Baptista, Mauricio da Silva. Phototoxicity of melanin in skin cells upon visible light: In 27^a IID, Edinburgh, 8-11 May 2013.

Orlando Chiarelli-Neto, Ana Claudia Viotto, Alexandre V. Silva, Raul X. Nascimento, Divinomar Severino, Maurício S. Baptista. Quantification of UV-A Dose, Oxidative Stress and Release of Inflammatory Cytokines: In XLII Annual Meeting of SBBq, Foz do Iguaçu, 18-21 May 2013.

Raul X. Nascimento, Orlando Chiarelli-Neto, Alexandre V. Silva, Maurício S. Baptista. UVA and Visible Light Induce Similar Yields of Oxidative Stress and Cell Death in Macrophage Cells: In 27^a SBBq, Foz do Iguaçu, 18-21 May 2013.

Maurício S. Baptista, Orlando Chiarelli-Neto, Christiane Pavani, Alan S. Ferreira, Divinomar Severino. Photosensitization of melanin and generation of singlet oxygen: Effect of visible light in hairs and skin. In: 27^a IFSCC, South Africa, 15-18 October 2012.

Christiane Pavani, Orlando Chiarelli-Neto, Ana Claudia Viotto, Maurício S. Baptista. UV-A and visible light cause opposite effects on hair color and chamomile extract protect against UV-A induced color. In: 27^a IFSCC, South África, 15-18 Coobe 2012.

Chiarelli-Neto, Orlando; Severino, Divinomar; Silva, Daniela Rodrigues; Martins, Waleska Kerllen Gardesani; Viotto, Ana Claudia; Rocha, Cleidiane de Sousa; Baptista, Mauricio da Silva. Potencial anti-inflamatório de extratos polifenólicos em células da pele. In: 26^a Congresso Brasileiro de Cosmetologia, São Paulo, 2012.

Chiarelli-Neto, Orlando; Pavani, Christiane; Viotto, Ana Claudia ; da Silva Baptista, Mauricio. Effect of Lipopolysaccharide and UV-A on the ROS Generation and Cell Viability of Macrophages. In: SFRBM's 18th Annual Meeting, Atlanta, 2011.

Silva, Alexandre.V.; Chiarelli-Neto, O; Baptista, M.S. Synthesis and Studies of Riboflavin Derivatives on Cell Photodamage. In: 17th Intl Symposium on Flavins and Flavoproteins, 2011, Berkeley. 17th Intl Symposium on Flavins and Flavoproteins, 2011.

Silva Jr., A.; Chiarelli-Neto, O.; Moraes.M.P.; Simão, G.R.; Fausto, M.C ; Vidigal, P.M.P.; Silva, F.M.F.; Oliveira, L.L.; Fietto, J.L.R.; Almeida, M.R. Cellular response and protective effect of the capsid protein of Porcine circovirus-2 expressed in a recombinant adenovirus in mice.. In: 30th Annual Meeting of American Society for Virology, 2011, Minneapolis, Minnesota. ASV Scientific Program & Abstracts, 2011. p. 118-118.

Chiarelli-Neto, O.; Viotto, Ana Claudia; Baptista, M.S. Profile of proinflammatory cytokines after photodynamic therapy. In: I São Paulo Advanced School on Redox Processes in Biomedicine and VII Meeting of South American Group of the SFRBM., 2011, São Pedro. Free Radicals Brazil, 2011. p. 112-112.

Chiarelli-Neto, O.; Pavani, C.; Ferreira, A.S.; Severino, D.; Baptista, M.S. Generation and suppression of singlet oxygen in hairs by photosensitization of melanin. In: 21st I-APS Inter-American Photochemical Society. Mendoza, 2011.

10 PRÊMIOS E TÍTULOS

Prêmio “Qualidade em Publicação realizado pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da USP pelo artigo **Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanina**. Free Radical Biology&Medice, 51, 1195-1202, 2011.

Menção Honrosa como o melhor trabalho do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB), Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2010.

Prêmio Arthur Bernardes de Mérito em Iniciação Científica como o melhor trabalho do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2010.

11 PUBLICAÇÕES

Schleh, Frederico A., Chiarelli-Neto, Orlando, Fontes, Mayara N., Najjar, Renato, Espósito, Breno P. Phytate Decreases Oxidative Damage Caused by Labile Forms of Iron in Solution, Blood Plasma and in HeLa Cells. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 25, p. 1036-1040, **2014**.

Baccan, Mayara Marinovic ;Chiarelli-Neto, Orlando ; Pereira, Regina Mara Silva ; Espósito, Breno Pannia. Quercetin as a shuttle for labile iron. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 107, p. 34-39, **2012**.

Chiarelli-Neto, Orlando ; Pavani, Christiane ; S. Ferreira, Alan ; Uchoa, Adjaci F. ; Severino, Divinomar ; Baptista, Maurício S. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. Free Radical Biology & Medicine, v. 51, p. 1195-1202, **2011**.

Silva, F.M.F., Silva Jr., A., Peternelli, E.F.O., Viana,V.W, Chiarelli-Neto, O., Fietto, J.L.R, VILORIA, M. I. V., Nero, L. A, Almeida, M.R. Retrospective study on Porcine circovirus-2 by nested PCR and real time PCR in archived tissues from 1978 in Brazil.. Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)., v.42, p.1156 - 1160, **2011**.

Chiarelli-Neto, O., Yotoko, K.S.C., VIDIGAL, P.M.P., Silva, F.M.F., Castro, L.A., Fietto, J.L.R., Silva Jr., A., Almeida, M.R. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. Virus Research (Print). , v.140, p.57 - 63, **2009**.

Silva Júnior, Abelardo, Castro, Luiza A., Chiarelli-Neto, O., Silva, Fernanda M.F., Vidigal, Pedro M.P., Moraes, Mauro P., Almeida, Márcia R. Development and evaluation of a recombinant DNA vaccine candidate expressing porcine circovirus 2 structural protein. Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso).v.29, p.76 - 82, **2009**.

Chiarelli-Neto, O., Silva Jr., A., Castro, L.A., Viana,V.W, Silva, F.M.F., Bonfá. G., Moraes. M.P., Almeida, M.R. Detecção do Circovírus Suíno Tipo2 (PCV2) em animais de abate no centro norte do Estado do Espírito Santo.. Scientia (Vila Velha). , v.7, p.33 - 44, **2006**.

12 ANEXO 1

1. Artigo publicado.