



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIELA BENEDITO MACHADO

Associação de Extratos Naturais à Fotobiomodulação
no tratamento do envelhecimento cutâneo: Estudo *in vitro*

SÃO PAULO, SP



Gabriela Benedito Machado

**Associação de Extratos Naturais à Fotobiomodulação
no tratamento do envelhecimento cutâneo: Estudo *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho,
para obtenção do título de Mestre em Biofotônica
aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Christiane Pavani

SÃO PAULO, SP

2019

Machado, Gabriela Benedito.

Associação de extratos naturais à fotobiomodulação no tratamento do envelhecimento cutâneo: estudo *in vitro*. / Gabriela Benedito Machado. 2019.

88 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Christiane Pavani.

1. Envelhecimento cutâneo. 2. LLLT. 3. Fotoenvelhecimento. 4. Fototerapia. 5. Extratos vegetais.

I. Pavani, Christiane. II. Título

CDU 615.831

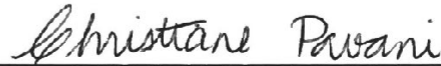
São Paulo, 08 de fevereiro de 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

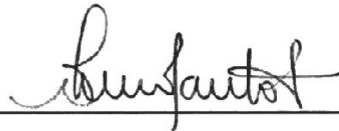
Aluno (a): Gabriela Benedito Machado

Título da Dissertação: "Associação de extratos naturais à fotobiomodulação no tratamento do envelhecimento cutâneo: Estudo *in vitro*"

Presidente: PROFª. DRª. CHRISTIANE PAVANI



Membro: PROFª. DRª. ADRIANA LINO SANTOS FRANCO



Membro: PROF DR BRENO PANNIA ESPÓSITO



Dedicatória

À Deus, que me permitiu caminhar e chegar a esta etapa e me dar paz e saúde, para assim continuar.

Aos meus pais, Maria da Penha e Rogerio Amaral por me permitirem todo o estudo adquirido até aqui.

Dedico também aos parentes e amigos que me compreenderam, acreditaram e incentivaram meus passos.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Deus que me guiar e iluminar meus passos e minha mente todos os dias desta jornada. Que mantem a minha fé para enfrentar as dificuldades e continuar caminhando, permitindo concluir mais essa etapa da minha vida.

A minha mãe Maria da Penha e familiares que sempre me incentivaram a progredir, sempre acreditando em meu potencial e investiram nos meus estudos.

Ao meu noivo Denis Ferreira por me apoiar, ser paciente, e ser compreensivo, e fazer dos meus sonhos os seus.

À Universidade Nove de Julho por me acolher como aluna, dando a oportunidade de continuar meus estudos, mesmo após a graduação. Ao programa de Pós-graduação *stricto sensu* por me aceitar no programa.

À minha orientadora, Professora Doutora Christiane Pavani por tanta paciência, carinho e compreensão, uma grande profissional que tem um magnetismo que inspira as pessoas ao seu redor.

Ao Professor Doutor Maurício da Silva Baptista –Universidade de São Paulo/USP - que gentilmente doou as células utilizadas no projeto.

À empresa Bioextract FarmaService por gentilmente fornecer os extratos naturais utilizados neste estudo.

Ao Dr. Divinomar Severino que idealizou e construiu o irradiador UVA utilizado nos experimentos.

Ao laboratório de pesquisa do Mestrado e Doutorado da Universidade Nove de Julho, por proporcionar condições necessárias para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas de laboratório, alunos de iniciação científica, técnicos e demais professores que contribuíram para um ambiente agradável e produtivo, sempre prestativos.

E a CAPES pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

*“Por trás de todo sutil, delicado e oponente movimento de uma de uma bailaria,
existem pés deformados, feridas nunca vista e sacrifícios desconhecidos”*

Autor desconhecido

RESUMO

As alterações que surgem como resultado do fotoenvelhecimento são atribuídas á geração contínua das espécies reativas de oxigênio (EROS) pela radiação ultravioleta, que provocam injúria tecidual, devido à alta reatividade com biomoléculas, principalmente lipídios, proteínas e o DNA. Extratos vegetais contêm diversos componentes que apresentam propriedades antioxidantes e que podem ser usados para o tratamento do fotoenvelhecimento por meio da redução da concentração de EROs no tecido. Já a Fotobiomodulação (FBM) é um tratamento baseado na ação exercida pela luz em tecidos, resultando em modificações bioenergéticas, bioelétricas e bioquímicas que culminam na modulação de diversas funções celulares. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da FBM com luz LED vermelha associada à extratos naturais com diferentes conteúdos polifenólicos, em queratinócitos humanos normais submetidos à radiação UVA. Foram avaliados os extratos de camomila e figo, FBM $640 \pm 12.5\text{nm}$ (1 J/cm^2) e radiação UVA $366 \pm 10 \text{ nm}$ (9 J/cm^2). A radiação UVA causou redução na viabilidade celular, sendo que a associação de extrato 0,3% com FBM não foi capaz de recuperar a viabilidade. O tratamento combinado foi repetido utilizando os extratos de Camomila e Figo 0,05%, Desta forma justamente por não ter sido observada melhora efetiva da viabilidade pela associação das terapias, optou-se por compreender os efeitos dos tratamentos, avaliando a expressão de mRNA enzimas antioxidantes (catalase) e genes de reparo de DNA associados aos diferentes mecanismos de reparo (ERCC2, ERCC1, OGG1, BRCA1, DBB1 e TP53). A radiação UVA reduziu a expressão da catalase e aumentou a expressão de OGG1, BRCA1e TP53, sem apresentar alterações em DBB1, ERCC1 e ERCC2 mostrando que houve ativação dos mecanismos de reparo de DNA, especialmente o mecanismo de reparo por excisão de bases e recombinação homóloga. O uso combinado dos extratos com FBM alterou de forma diferente os genes avaliados, sendo que o extrato de figo apresentou efeito protetor atingindo níveis de expressão de mRNA dos diversos genes maiores que do grupo exposto ao UVA.

Palavras-Chave: Envelhecimento cutâneo, Fotoenvelhecimento, Fototerapia, LLLT, Extratos vegetais.

ABSTRACT

The alterations that arise as a result of photoaging are attributed to the continuous generation of reactive oxygen species (ROS) by ultraviolet radiation, which cause tissue injury due to the high reactivity with biomolecules, mainly Lipids, proteins and DNA. Plant extracts contain several components that have antioxidant properties and can be used for the treatment of photoaging by reducing the concentration of ROS in the tissue. The Photobiomodulation (PBM) is a treatment based on the action exerted by light on tissues, resulting in bioenergetic, bioelectric and biochemical modifications that culminate in the modulation of several cellular functions. The objective of this work was to evaluate the effect of PBM with red LED light associated with natural extracts with different polyphenolic contents in normal human keratinocytes submitted to UVA radiation. The extracts of chamomile and fig, FBM 640 ± 12.5 nm (1 J/cm²) and UVA 366 ± 10 nm (9 J/cm²) were evaluated. The UVA radiation caused a reduction in cell viability, and the association of extract 0.3% with FBM was not able to regain viability. The combined treatment was repeated using the extracts of chamomile and fig 0.05%, thus precisely because there was no effective improvement of the viability by the Association of Therapies, it was decided to understand the effects of the treatments, evaluating the Expression of mRNA antioxidant enzymes (catalase) and DNA repair genes associated with different repair mechanisms (ERCC2, ERCC1, OGG1, BRCA1, DBB1 and TP53). The UVA radiation reduced the expression of catalase and increased the expression of OGG1, BRCA1e TP53, without presenting alterations in DBB1, ERCC1 and ERCC2 showing that there was activation of the mechanisms of DNA repair, especially the mechanism of repair by excision of bases and Homologous recombination. The combined use of the extracts with FBM altered differently the evaluated genes, and the fig extract had a protective effect reaching levels of mRNA expression of the various genes larger than the group exposed to UVA.

Keywords: Skin aging, Photoaging, Phototherapy, LLLT, Natural extracts.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	17
1.1 Justificativa do Trabalho.....	17
1.2 Estrutura e função da pele	17
1.3. Envelhecimento cutâneo	19
1.3.1. Estresse oxidativo.....	21
1.3.2 Enzimas antioxidantes.....	26
1.3.3. Reparo gênico	29
1.4. Tratamentos do Envelhecimento Cutâneo	34
1.4.1 Extratos vegetais	34
1.4.2. Fotobiomodulação	37
2. OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivos Gerais:.....	39
2.2 Objetivos Específicos:	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Material	40
3.1.1 Cultura celular.....	40
3.1.2. Sistemas de irradiação	40
3.1.3. Extratos naturais.....	42
3.2 Método	43
3.2.1 Desenho do estudo.....	43
3.2.2 Cultivo celular	44
3.2.3. Ensaio de viabilidade celular	45
3.2.4 Expressão Gênica	45
3.2.8. Análise Estatística	48
4. Resultados e discussão	49
4.1 Determinação da viabilidade celular por MTT	49
4.2. Avaliação da toxicidade dos extratos após dano UVA	54
4.3. Determinação da viabilidade celular por MTT	55
4.3 Expressão gênica da Catalase.....	56
4.4 Expressão Gênica de genes de reparo de DNA.....	58
4.4.1 <i>OGG1</i>	58
4.4.2 <i>TP53</i>	60
4.4.3 <i>BRCA1</i>	62
4.4.4 <i>ERCC1</i>	64
4.4.5 <i>ERCC2</i>	66
4.4.6 <i>DBB1</i>	68

5.	CONCLUSÕES.....	70
6.	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS.....	82
	Informações para membros externos de bancas	88

LISTA DE ABREVIATURAS

BRCA1 – do inglês, *Breast cancer gene 1*

BER – do inglês, *Base Excision Repair*, reparo por excisão de bases

BLB - Black light blue, luz negra que emite radiação UVA

CAT - Catalase

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CT - Controle

DBB1 – do inglês, *DNA damage-binding protein 1*

DEPC - Dietil pirocarbonato

DMEM- do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*,

DNA - Ácido desorribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DP- Desvio padrão

EDTA – do inglês *Ethylenediamine tetraacetid acid*, ácido etilenodiamino tetraacético

ER - Espécies reativas

NER - do inglês *Nucleotide Excision Repair*, reparo por excisão de nucleotídeos

ERCC1 – do inglês, *Excision repair cross Complementing 1*

ERCC2 – do inglês, *Excision repair cross Complementation Group 2*

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FBM - Fotobiomodulação

GAPDH – do inglês, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

GSSG - L-Glutaciona oxidada

GSH – L- Glutaciona reduzida

GSHPx - Glutathione peroxidase

HG - Veículo Hidroglicólico

LED – do inglês *Light emitting diode*, Diodo Emissor de Luz

MEC - Matriz extracelular

MMP – Membrana mitocondrial

mRNA – RNA mensageiro

MTT - (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5 difenil-2H-brometo de tetrazólio

NHEJ – do inglês, *non-homologous end joining*

OGG1 – do inglês, *8-Oxoguanine glycosylase DNA*, 8-oxoguanina DNA glicosilase

PBS – do inglês *Phosphate buffered saline*, Tampão fosfato salino

qPCR - PCR quantitativo

RTq- PCR – do inglês, *Reverse transcription polymerase chain reaction*, A reação de transcrição reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia

RNA - Ácido ribonucleico

SFB - Soro fetal bovino

TAE - Tris-Acetato-EDTA

TP53 – gene codificador da proteína p53

UV - Ultravioleta

UVA -Ultravioleta A

UVB - Ultravioleta B

UVC - Ultravioleta C

V - Volume

XPC – do inglês, *Xeroderma pigmentosum complementation C*

XPF – do inglês, *Xeroderma Pigmentosum complementation group F*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da pele humana e suas camadas: epiderme, derme e hipoderme. Adaptado. ⁴	18
Figura 2: Esquema da pele humana: subcamadas da epiderme. A epiderme apresenta as camadas: estrato córneo, camada granular, espinhosa e basal, formando a superfície da pele. Adaptado ⁶	19
Figura 3: Redução do oxigênio molecular (O₂) na mitocôndria até a formação de água (H₂O). (Esquema adaptado) ¹⁷	21
Figura 4: Diagrama de Jablonski. Formação de EROs na pele após a absorção de radiação UVA.....	23
Figura 5: Formas oxidada e reduzida da glutathiona, sob ação das enzimas glutathiona peroxidase, redutase e oxidase (adaptada) ²⁹	28
Figura 6: Esquema do balanço redox do organismo (adaptado) ^{15,16}	29
Figura 7: Mecanismos de reparo gênico. resumo dos tipos de mecanismos.	33
Figura 8: Mecanismo do fotoenvelhecimento (adaptado) ⁴⁷	34
Figura 9: Estrutura química dos compostos polifenólicos	36
Figura 10: Espectro de emissão do irradiador UVA	41
Figura 11: Sistema de Irradiação. Esquerda: Imagem do sistema LED ligado, Direita: Espectro de emissão do sistema LED.	42
Figura 12: Desenho Experimental do estudo	44
Figura 13: Viabilidade celular de queratinócitos expostos ao UVA e tratados com fotobiomodulação e extratos de camomila, figo, noqueira e mirtilo a 0,3% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. A) Camomila e Mirtilo B) Figo e Noqueira. Parâmetros UVA (366+10 nm, 2,5 mW/cm ² , 13,5 J/cm ² .) LED (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm ² , 1J/cm ²). Dados apresentados como média + DP, n=6, 04 experimentos independentes, n total de 24. Os dados apresentados como mediana e barras de erro indicam 5 e 95 percentis, n = 24. * P < 0,5 em comparação com o CT escuro; #P < 0,5 entre os tratamentos, ^o P < 0,5 em comparação com o UVA + PBM controle.	51
Figura 14: Viabilidade celular de queratinócitos expostos aos extratos (camomila e figo em diferentes concentrações) por 24 horas em DMEM 1 % SFB após exposição ao UVA. A) camomila B) figo. Parâmetros UVA (366+10 nm, 2,5 mW/cm ² , 13,5 J/cm ² .) Dados apresentados como média + DP, n=6, 03 experimentos independentes, n total de 18, *p<0,05 em relação aos demais tratamentos.	55
Figura 15: Viabilidade celular de queratinócitos expostos ao UVA e tratados com fotobiomodulação e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm ² , 13,5 J/cm ²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm ² , 1J/cm ²). Dados apresentados como	

mediana e percentis 5 e 95, n= 16, 3 experimentos independentes, n total de 48.
* p < 0,05 em comparação com o controle; #p < 0,05 entre os tratamentos 56

Figura 16: Expressão relativa do mRNA de CAT1 em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p< 0.05 em relação a FBM.
..... 57

Figura 17: Expressão relativa do mRNA de OGG1 em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p< 0.05 em relação a FBM.
..... 59

Figura 18: Expressão relativa do mRNA de TP53 em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p< 0.05 em relação a FBM.
..... 62

Figura 19: Expressão relativa do mRNA de BRCA1 em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p< 0.05 em relação a FBM.
..... 63

Figura 20: Expressão relativa do mRNA de ERCC1 em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p< 0.05 em relação a FBM.
..... 65

Figura 21: Expressão relativa do mRNA de *ERCC2* em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p< 0.05 em relação a FBM.

..... 67

Figura 22: Expressão relativa do mRNA de *DBB1* em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p< 0.05 em relação a FBM.

..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da radiação Ultravioleta ¹⁰	20
Tabela 2: Parâmetros do irradiador UVA	41
Tabela 3: Parâmetros do Sistema LED para fotobiomodulação	42
Tabela 4: dados dos extratos para o tratamento	42
Tabela 5: Genes alvo via reação em cadeia da polimerase quantitativa da transcriptase reversa, de acordo com o número de acesso do GenBank, sequência dos <i>primers</i> e temperatura de anelamento.....	48
Tabela 6: Teores totais de polifenóis (TPC) dos extratos utilizados.	49

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Justificativa do Trabalho

A fotobiomodulação é um tratamento baseado na interação da luz com os tecidos estimulando os processos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos. Uma terapia que tem sido estudada em diversas áreas da saúde, e na área da estética seus benefícios tem sido pouco a pouco relatados na literatura científica. Na área estética, em que muitas tecnologias são utilizadas mesmo sem a comprovação científica de sua eficácia e que várias técnicas de tratamento ou produtos cosméticos são empregados por profissionais em sua prática clínica, poucas são as comprovações dos benefícios destas associações por meio de embasamento científico.

O uso da fotobiomodulação como terapia para retardar os efeitos causados pela radiação ultravioleta, em especial, o fotoenvelhecimento tem sido amplamente divulgado por profissionais. A racionalidade da associação desta técnica com o uso de produtos cosméticos contendo extratos naturais baseia-se no fato da fotobiomodulação estimular o metabolismo celular e regeneração tecidual, enquanto os extratos naturais atuam como antioxidantes. Apesar disso, não existem relatos na literatura que comprovem a eficácia e segurança desta associação.

Diante deste contexto, este grupo de pesquisa optou por estabelecer uma metodologia *in vitro* para avaliar esta associação entre extratos naturais e fotobiomodulação no tratamento dos efeitos deletérios da radiação ultravioleta. A metodologia foi publicada e este é o primeiro estudo que avalia o efeito da associação destas terapias, focando especificamente em enzimas antioxidantes e reparo gênico.

1.2 Estrutura e função da pele

Há mais de 150 anos, a pele foi descrita por Virchow como um envoltório corporal com função de revestimento e proteção a órgãos mais complexos ¹. A pele exerce diversas funções tais como revestimento, controle de temperatura, absorção dos raios ultravioleta, eliminação de substâncias, entre outras. É considerada o maior órgão do corpo humano, responsável por 15% do peso

corporal e tem papel importante na defesa do organismo em face de agressões químicas, físicas e microbiológicas. A pele pode ser dividida em camadas: a epiderme de origem ectodérmica, que é a camada mais externa; a derme, camada endodérmica e a hipoderme, subcutânea, que é formada por tecido adiposo ^{2,3} (**Figura 1**).

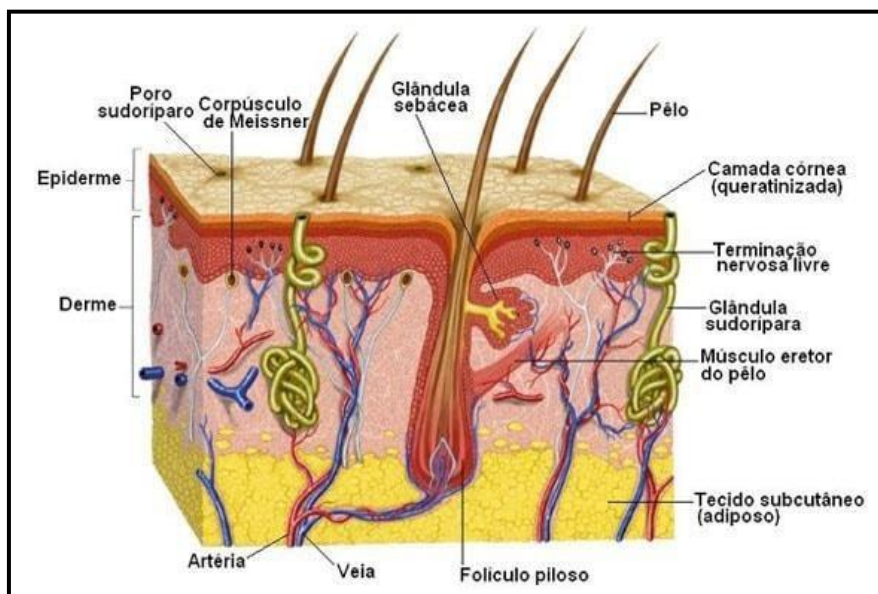


Figura 1: Esquema da pele humana e suas camadas: epiderme, derme e hipoderme. Adaptado.⁴

A epiderme é composta por 5 camadas nas quais os queratinócitos se encontram em diferentes estágios de diferenciação: basal, espinhosa, granulosa, córnea e lúcida, sendo que esta última se encontra em locais específicos como sola dos pés e palma das mãos ⁵. A renovação da epiderme e a nutrição das outras camadas ocorre na camada basal, onde há atividade mitótica. A camada espinhosa apresenta extensões citoplasmáticas que se aproximam e mantém as células unidas através de junções celulares (desmossomos). Na camada granulosa existem grânulos de queratotalina, filamentos de queratina agrupados e, além disso, o DNA e as organelas são degradados e a membrana plasmática é substituída pelo envelope cornificado. Por fim, a camada córnea é a mais fina e superficial, composta pelos queratinócitos diferenciados ⁵ (**Figura 2**).

A derme, devido à presença dos vasos sanguíneos, irriga a epiderme com nutrientes e abriga apêndices cutâneos (glândulas sebáceas e sudoríparas, folículo piloso e unhas). É constituída por um tecido resistente e elástico que proporciona proteção contra agressões mecânicas. Na derme estão presentes

células do sistema imunológicas como os mastócitos e os macrófagos, além fibroblastos que produzem as proteínas da matriz extracelular (MEC), tais como o colágeno, fibras elásticas, fibronectina, glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos ^{2,3}.

A hipoderme é uma camada de tecido conjuntivo frouxo que se localiza abaixo da derme. Esta camada contém tecido adiposo em quantidade variável dependendo do estado nutricional e da região do corpo.

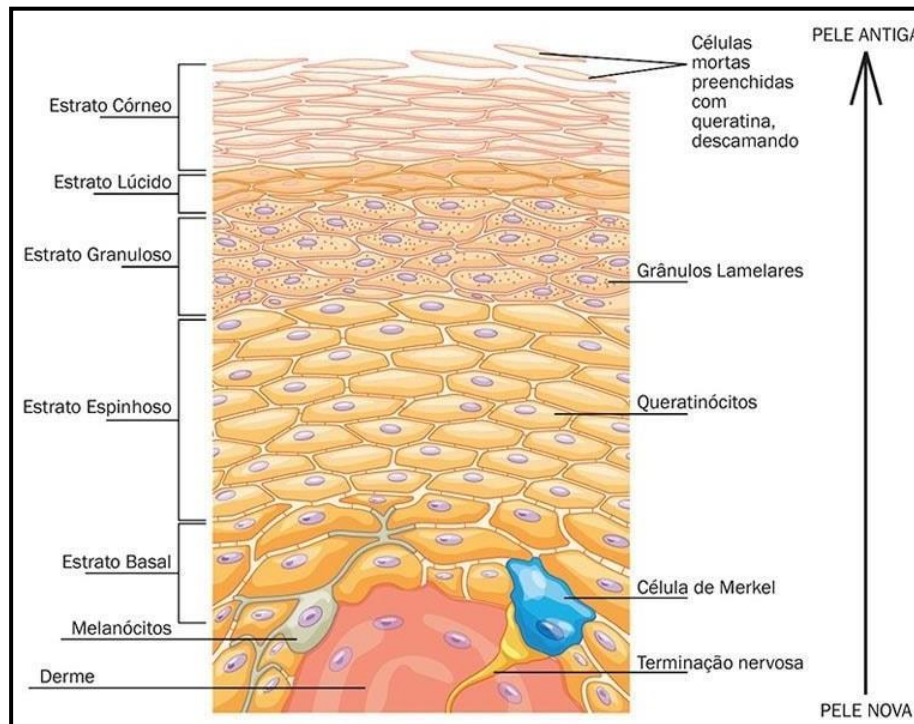


Figura 2: Esquema da pele humana: subcamadas da epiderme. A epiderme apresenta as camadas: estrato córneo, camada granular, espinhosa e basal, formando a superfície da pele. Adaptado ⁶

1.3. Envelhecimento cutâneo

Assim como os demais órgãos do corpo humano, a pele sofre alterações com o processo de envelhecimento. Na verdade, o envelhecimento pode ser definido como um conjunto de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas inevitáveis que ocorre progressivamente no organismo ao longo da vida. Essas alterações levam a perda gradativa das funções, aumentando a vulnerabilidade ao meio ambiente e diminuindo sua capacidade de homeostasia⁷. O envelhecimento cutâneo é definido pelas alterações da pele que podem ocorrer através do tempo (cronológico ou intrínseco) ou ambiental (extrínseco). A pele intrinsecamente envelhecida parece mais fina e frouxa com

mais rugas aparentes, tornando-se vulnerável à medida que algumas funções protetoras diminuem. E na derme as mudanças incluem a diminuição do colágeno e fibras elásticas e dilatação dos canais linfáticos. O envelhecimento extrínseco é resultado da exposição aos fatores ambientais, principalmente radiação ultravioleta (UV) e recebe o nome de fotoenvelhecimento.

Fotoenvelhecimento aparece em áreas expostas cronicamente ao sol, possui características únicas e distintas do envelhecimento normal. As rugas são mais profundas e a pele apresenta manchas escuras. Muitos danos causados pelo sol ocorrem nas primeiras duas décadas de vida quando a pessoa se expõe ao sol, e estes danos são cumulativos ao longo de toda a vida. Conseqüentemente nas áreas mais expostas, como face e pescoço, mais de 85% das rugas são devidas à exposição ao sol ⁸.

As alterações que surgem como resultado do envelhecimento são atribuídas à geração contínua das espécies reativas de oxigênio (EROS) formadas durante o metabolismo celular oxidativo e devido à exposição à fatores ambientais como a radiação UV ^{7,8}. Dos raios UV oriundos do sol, 95% são UVA e 5% são UVB, enquanto os raios tipo UVC não atingem a superfície terrestre, pois são bloqueados pela camada de ozônio. A classificação da radiação UV é definida pelo comprimento de onda, conforme apresentado na **Tabela 1**. A radiação ultravioleta (UV) compreende cerca de 6% do espectro solar e é responsável por 90% dos danos causados por ele, podendo-se citar a redução na renovação celular, causando a perda da elasticidade da pele, devido ao aumento na quantidade das enzimas elastase e da colagenase ⁹.

Tabela 1: Classificação da radiação Ultravioleta ¹⁰.

Classificação	Faixa de Comprimento de onda (nm)
UVA	315-400
UVB	280-315
UVC	100-280

A formação de EROs na pele é induzida principalmente pela radiação UVA, uma vez que a radiação UVB é diretamente absorvida pelas moléculas de DNA, gerando danos em DNA que serão posteriormente mencionados. As EROs

são naturalmente eliminadas pelo sistema antioxidante, mas a exposição prolongada à luz UVA pode resultar em um desbalanço redox ¹¹. A radiação UVB atinge principalmente a epiderme enquanto UVA apresenta capacidade de penetração na epiderme e na derme. Desse modo, ao atingir a derme, contribui significativamente para o dano na pele e efeitos de envelhecimento ¹².

1.3.1. Estresse oxidativo

Os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidos naturalmente durante o processo de respiração celular aeróbia, pois uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzido, produzindo uma variedade de substâncias químicas muito reativas¹³⁻¹⁵. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O₂ sofre redução resultando na formação de H₂O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como o ânion radical superóxido ([•]O₂⁻), radical hidroperoxila ([•]HO₂) e hidroxila ([•]OH), e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Normalmente, a redução completa do O₂ ocorre na mitocôndria¹⁶ conforme etapas descritas na **Figura 3**.

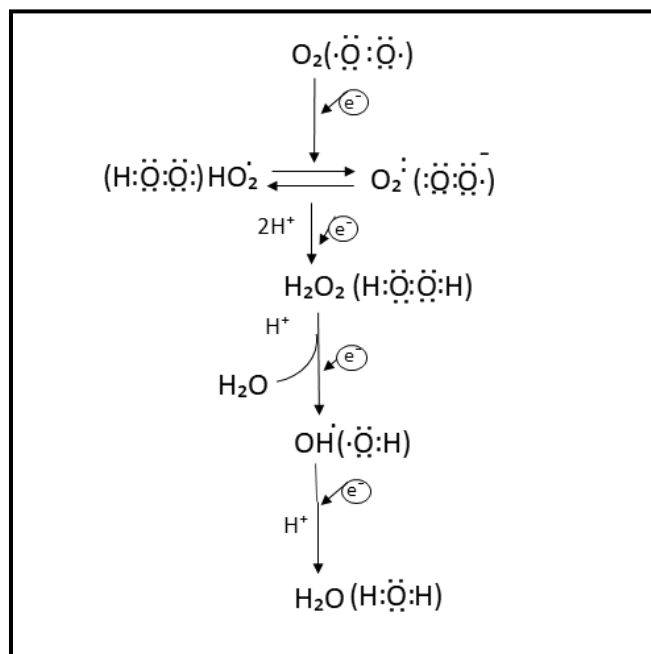


Figura 3: Redução do oxigênio molecular (O₂) na mitocôndria até a formação de água (H₂O). (Esquema adaptado)¹⁷

EROs podem provocar danos tecidual devido à alta reatividade com biomoléculas, principalmente lipídios e proteínas das membranas celulares e o DNA^{14,18}. Desta forma, resulta em disfunções biológicas, sendo que no caso da pele a exposição a fatores ambientais, como a radiação ultravioleta, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio ^{13,18}.

A radiação UV causa danos oxidativos na pele como consequência da absorção da luz por cromóforos endógenos (tais como DNA, ácido urocânico, riboflavina, melanina e seus precursores, entre outros), que desencadeia uma cascata de reações químicas diretas ou a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem causar danos aos lipídeos, proteínas e DNA ¹⁹⁻²¹.

Ao atingir a pele desprotegida, a radiação UV leva ao início de um processo fotoquímico, que se inicia com a absorção de luz por uma espécie química e resulta na transição de um elétron do estado fundamental para um estado excitado, cujo mecanismo pode ser representado por um diagrama de Jablonski (**Figura 4**). Na transição eletrônica, um elétron do orbital molecular ocupado de mais alta energia, passa a ocupar, no estado excitado, um orbital molecular de mais baixa energia não-ocupado, produzindo uma espécie química com características distintas daquelas do estado fundamental. A partir deste estado, por meio do cruzamento intersistemas, esta espécie química passa ao estado tripleto, no qual pode interagir com o oxigênio de duas maneiras: Reações do Tipo I, em que há transferência de elétrons, formando espécies como o radical superóxido e hidroxila e reações do Tipo II em que há transferência de energia, resultando na formação de oxigênio singlete. Diversas moléculas podem absorver a radiação UV na pele e sofrer alterações químicas devido a essa absorção. O DNA é uma das principais moléculas que absorve a radiação UV e, portanto, pode sofrer mutações que, posteriormente, podem resultar em transformações malignas da célula.^{22,23}

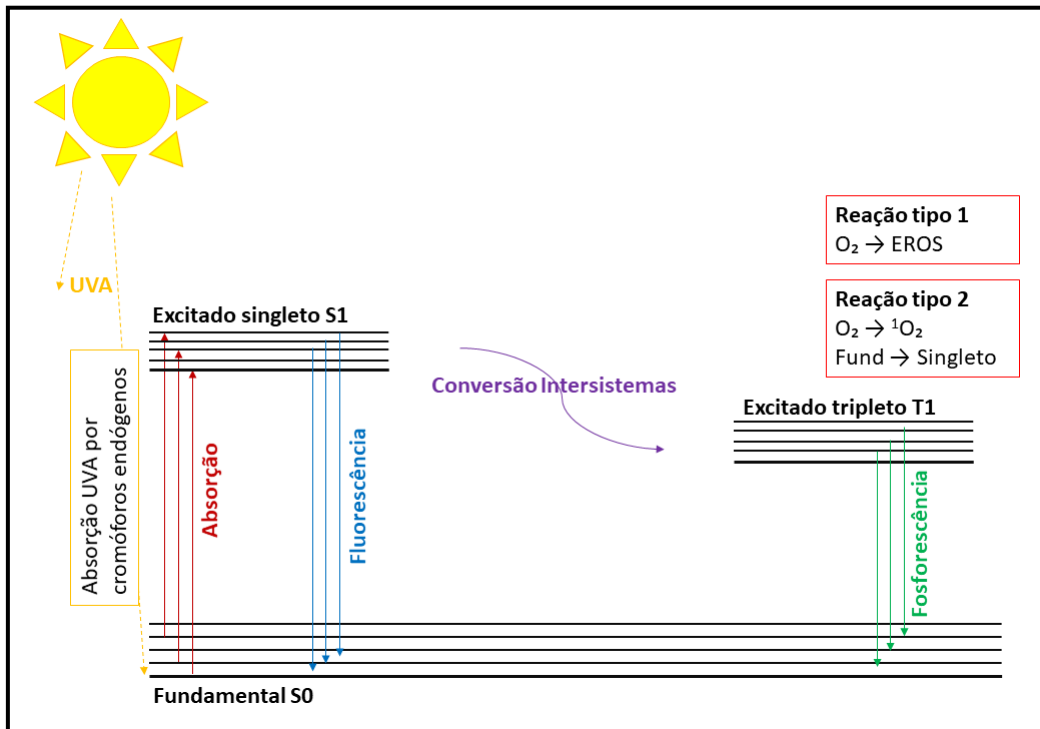


Figura 4: Diagrama de Jablonski. Formação de EROs na pele após a absorção de radiação UVA.

As principais EROs formadas na pele distribuem-se em dois grupos, os radicalares, como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e os não-radicalares, como oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)^{14,18}.

Ânion Radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$)

É formado após a primeira redução do O_2 com um elétron. Em condições fisiológicas, é gerado principalmente nas mitocôndrias, microssomas e peroxissomas. O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. É instável, com vida média de milissegundos e, em razão disso, dificilmente atravessa membranas. Entretanto, apresenta meia vida mais longa do que o radical hidroxila, sendo capaz de reagir com as moléculas por mais tempo¹⁶. É instável em meio aquoso e pode sofrer dismutação espontânea ou enzimática para produzir peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas¹⁶.

É um agente oxidante fraco, incapaz de causar peroxidação lipídica. No entanto, o $\cdot\text{O}_2^-$ pode reduzir o ferro iônico e seus complexos proteicos, podendo

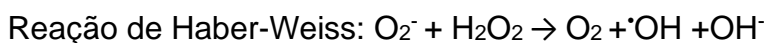
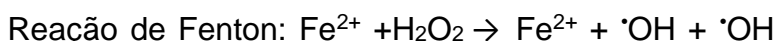
causar danos aos aminoácidos ou então causar perda da função proteica. Apesar disso, a sua maior toxicidade está na capacidade de produzir outros radicais livres ou EROs mais citotóxicos e reativos que ele próprio ¹⁶.

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Peróxido de hidrogênio é um oxidante relativamente estável e ausente de carga, o que facilita a passagem através da bicamada lipídica da membrana celular. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente importante porque participa como intermediário na reação que produz o radical hidroxila. Pode ser formado a partir da redução de dois elétrons do oxigênio ou a dismutação do superóxido catalisada pela enzima superóxido SOD ²⁴.

Radical hidroxila (•OH)

O radical hidroxila é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, pois apresenta alta afinidade por biomoléculas no seu sítio de produção, uma vez que possui meia-vida muito curta (< 1 μs)²⁵. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metálicos (Fe²⁺ ou Cu⁺), onde o radical hidroxila é formado pela fissão homóloga da ligação O-O da molécula de peróxido de hidrogênio, por meio de sua reação com o íon ferroso (Fe²⁺), conhecida como reação de Fenton, ou pela interação do H₂O₂ peróxido de hidrogênio com o radical superóxido (•O₂⁻), pela reação de Haber-Weiss:¹³



O radical hidroxila reage amplamente com aminoácidos, DNA e ácido ribonucleicos (RNA). Além disso, pode inativar várias proteínas (de membrana celular ou enzimas) ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação)¹⁶.

Oxigênio singlete (1O_2)

Semelhante aos radicais hidroxila, os (1O_2) têm aproximadamente 2 μ s de vida e são altamente destrutivos, reagindo com a maioria das moléculas biológicas.²⁵ Oxigênio singlete reage facilmente com ligações duplas, devido à sua eletrofilicidade, podendo reagir com compostos insaturados, sulfetos e aminas, sendo que ácidos graxos insaturados, DNA e proteínas representam importantes alvos biológicos^{13,16}. Nas proteínas reage especialmente com os aminoácidos histidina, metionina, triptofano e cisteína²⁵. Possuem dois tipos, dependendo da camada na onde se encontra o elétron.

O equilíbrio entre a formação e a remoção das espécies oxidantes pode sofrer ação de agentes exógenos ou endógenos, induzindo um estado de estresse oxidativo. Estas espécies oxidativas são fundamentais em diversos processos fisiopatológicos e bioquímicos, mantendo a sobrevivência e a homeostase celular. Porém, devido à alta reatividade para biomoléculas, a sua formação em excesso apresenta efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas e DNA^{14,18}.

O excesso de espécies oxidantes é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos pela dieta. Antioxidantes são substâncias que tem como característica diminuir ou bloquear as reações de oxidação, sendo, portanto, agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Naturalmente, nosso organismo possui substâncias que tem como objetivo determinar o equilíbrio na presença das moléculas oxidantes, os antioxidantes e a pele. Esta última, por sua área extensa e função protetora do organismo ao meio, fica muito exposta ao ataque radicalar, sendo a defesa antioxidante constantemente requisitada^{26,27}.

Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, não enzimaticamente a exemplo da glutathione reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e ubiquinol-2. Os antioxidantes provenientes da dieta, são como o exemplo, o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitaminaC), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides¹⁴.

1.3.2 Enzimas antioxidantes

O organismo humano possui mecanismos naturais de proteção, a fim de controlar a ação das EROs, que pode inativar, eliminar ou impedir a transformação dos radicais em produtos mais tóxicos para as células ²⁷. O mecanismo de ação dos antioxidantes permite ainda classificá-los como antioxidantes de prevenção (impedem a formação de radicais livres), varredores (impedem o ataque de radicais livres às células) e de reparo (favorecem a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas)²⁸.

O sistema antioxidante é formado por substâncias enzimáticas e não-enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx), esta última sendo mais abundante no corpo humano ¹⁵.

Superóxido dismutase (SOD)

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas que tem a função de proteger as células aeróbicas contra a ação do superóxido. É um dos mecanismos antioxidantes mais eficientes, converte superóxido em peróxido de hidrogênio, prevenindo os danos que poderiam ser causados por este radical. Em meio aquoso, ela catalisa a reação de dismutação do superóxido com extrema rapidez, aproximadamente 10 milhões de vezes mais rápida que a dismutação espontânea não enzimática ²⁵.

Diferentes tipos de SOD são descritos na literatura, podendo estar localizadas no citosol, em organelas celulares específicas ou extracelularmente, e cujos sítios ativos podem conter diferentes íons (como cobre, zinco, manganês ou ferro). Em humanos existem três formas de superóxido dismutase. SOD1 encontra-se no citoplasma e em algumas organelas denominadas peroxissomas, SOD2 nas mitocôndrias e SOD3 no líquido extracelular. A primeira é um dímero (consiste em duas subunidades), enquanto que as outras são tetrâmeros (quatro subunidades). SOD1 e SOD3 contêm cobre e zinco em seus sítios ativos, enquanto que SOD2 tem manganês no seu centro reativo¹³.

Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio, formado pela ação da superóxido dismutase, a decomposição resulta em água e oxigênio ¹³.

É encontrada predominantemente no interior das células nos peroxissomas, mas pode também ser encontrada livre no citoplasma e nos fagolisossomos ¹³. Tem afinidade apenas por moléculas de baixo peso molecular, tais como o peróxido de hidrogênio, não metabolizando moléculas grandes como os peróxidos lipídicos, produtos da peroxidação lipídica.

Glutathione

Glutathione, é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular.²⁹

A glutathione é um agente redutor de numerosas enzimas. As enzimas que participam do ciclo incluem, entre elas, a glutathione peroxidase (GSHPx) e a glutathione redutase (GR). O ciclo redutor da glutathione é o principal mecanismo de remoção de hidroperóxidos, lipoperóxidos e, assim como a catalase, do peróxido de hidrogênio^{13,27}.

A GSHPx é uma enzima que contém selênio em seu sítio ativo e é responsável pela redução dos peróxidos orgânicos e inorgânicos, utilizando glutathione reduzida (GSH) como substrato doador de elétron, transformando-a em glutathione oxidada (GSSG). Uma vez oxidada, a GSSG é convertida em GSH pela GR (**Figura 5**).

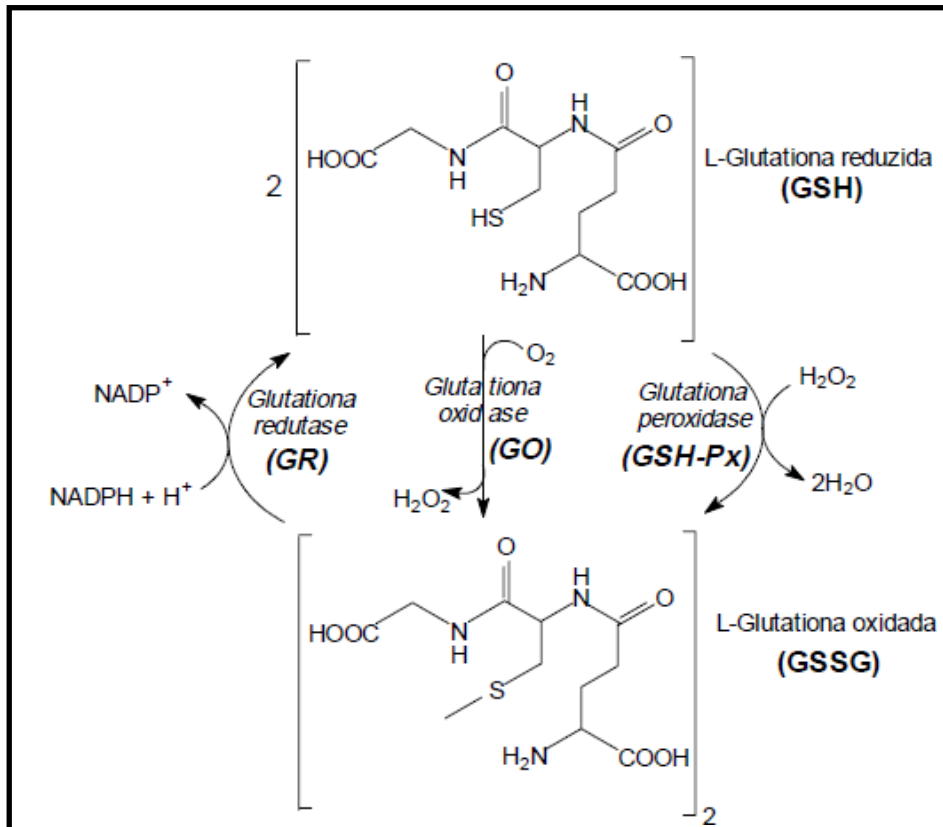


Figura 5: Formas oxidada e reduzida da glutathiona, sob ação das enzimas glutathiona peroxidase, redutase e oxidase (adaptada)²⁹.

Contudo, apesar do engenhoso maquinário de defesa antioxidante, esse potencial antioxidante natural vai reduzindo sua função ao longo dos anos. Além disso, devido aos hábitos de vida em termos de alimentação e exposição solar, por exemplo, faz com que o sistema oxidante exceda a capacidade antioxidante do organismo levando ao acúmulo de danos oxidativos em lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos que podem levar ao envelhecimento e desenvolvimento de doenças (**Figura 6**)¹⁵.

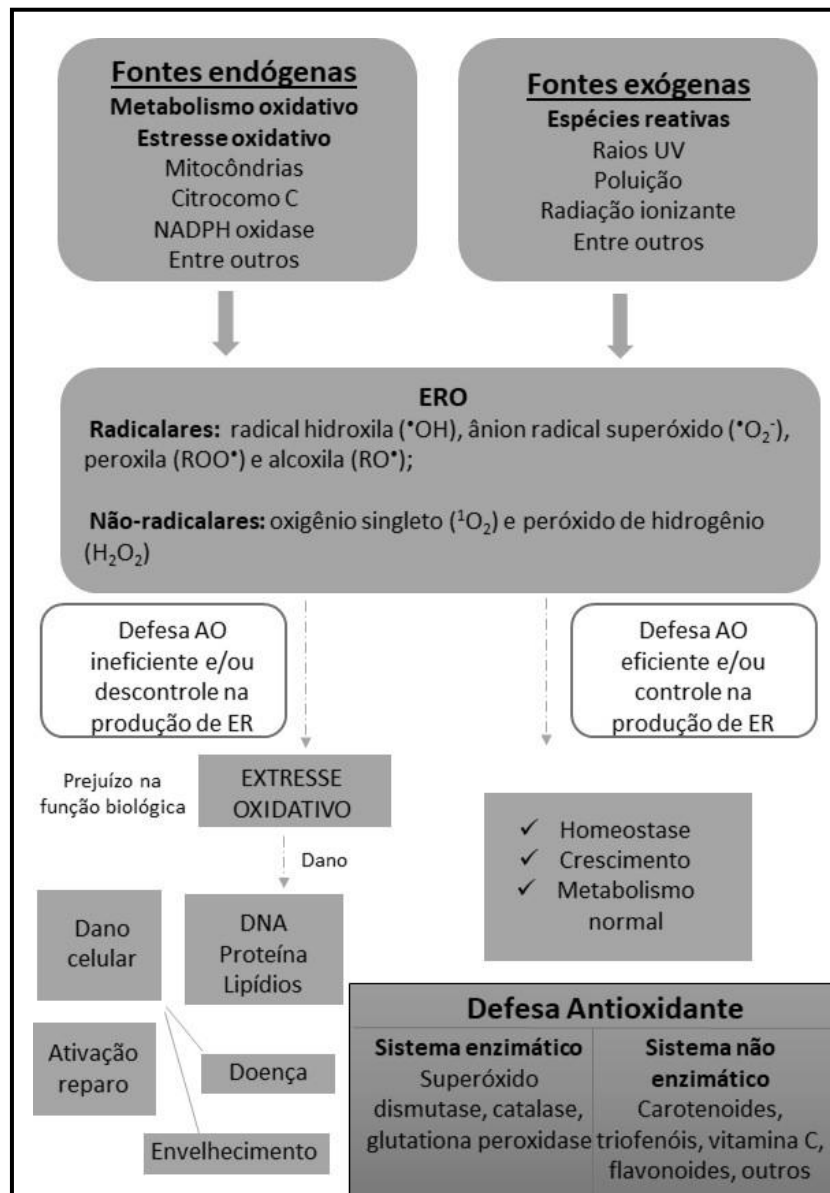


Figura 6: Esquema do balanço redox do organismo (adaptado)^{15,16}.

Além de todo o sistema antioxidante endógeno, um eficiente mecanismo de reparo de DNA entra em ação caso os danos tenham ocorrido.

1.3.3. Reparo gênico

Os danos causados ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio disparam respostas celulares como ativação de sistemas de reparo e enzimas controladoras do ciclo celular, alguns dos quais iniciam um processo de sinalização celular, modificando a expressão gênica^{18,30}. Se o reparo não for o adequado, o dano acumulado ao DNA interfere na divisão e funções celulares, levando a falhas homeostáticas, assim como desencadeia mutações nas células

em divisão ³⁰. Desta forma, tem papel importante no processo de tumorigênese e envelhecimento.

Os principais tipos de lesão de DNA envolvem a alquilação de bases (induzida por compostos N-nitrosos como tabaco e conservantes, gás mostarda e alguns quimioterápicos), dupla quebra (causada por raios gama), formação de dímeros de pirimidina (devido à radiação ultravioleta), *Cross-link* (consequência da lipoperoxidação ou ação de compostos de platina como a cisplatina) e oxidação de bases (resultado do metabolismo mitocondrial e NADPH oxidases)³¹. Após o reconhecimento do sitio danificado, proteínas que desencadeiam a interrupção do ciclo celular são ativadas, enquanto enzimas envolvidas diretamente com a correção do dano são recrutadas³².

Os mecanismos de reparo de DNA envolvem o reparo de danos que ocorrem na fita simples ou na fita dupla. Os principais mecanismos de reparo de DNA na fita simples incluem reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* NER) e reparo por excisão de bases (*base excision repair* BER), enquanto o reparo na fita dupla do DNA ocorre via mecanismo de recombinação homóloga ou a junção de pontas não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*)³³.

Os efeitos da radiação UVB ao DNA são a formação de fotoprodutos chamados dímeros de pirimidina ciclo-butano e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona. A remoção destes fotoprodutos ocorre pela via chamada de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Esta via reconhece lesões que causam distorção na dupla hélice do DNA, seguida pela excisão de 30 nucleotídeos da fita danificada, que é reconstruída pela ação de um DNA ligase ³¹. Por outro lado, a ação da radiação UVA está mais associada à produção de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo leva à formação de oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) como fotoproduto, principalmente pela ação de oxigênio singlete e radical hidroxila. Isto ocorre pois a guanina apresenta o menor potencial de oxidação dentre as bases de DNA ^{34,35}. Este fotoproduto também pode sofrer ação de moléculas oxidantes. Desta forma, 8-oxoG e seus produtos de oxidação são as lesões de DNA mais abundantes devido à ação do estresse oxidativo.

Sabe-se que bases oxidadas do DNA são primeiramente corrigidas pelo mecanismo de reparo por excisão de bases (BER), conhecido por atuar,

principalmente, em modificações causadas por agentes endógenos ^{34,36}. A via de BER é capaz de tratar lesões decorrentes de oxidação, alquilação ou desaminação que resultam em alteração na estrutura do nucleotídeo. É um processo de várias etapas que envolvem a atuação de várias proteínas, sendo caracterizado pelas seguintes etapas principais: (i) reconhecimento da base modificada e excisão de uma base inadequada por uma glicosilase de DNA, (ii) incisão no sítio abásico por uma endonuclease, (iii) substituição da base, (iv) processamento da (s) extremidade (s) terminal (is) e (v) selagem de uma DNA ligase. Portanto, o reparo por excisão de base é iniciado pela ação de enzimas glicosilases, que reconhecem a lesão e promovem a remoção da base alterada, por meio da hidrólise da ligação N-glicosil. Desta forma, aparece um sítio abásico que é reconhecido por uma AP-endonuclease que atua no sítio, removendo a pentose e o fosfato que restavam do nucleotídeo. Em seguida, a DNA polimerase preenche o espaço deixado, utilizando como molde a fita complementar não danificada ³⁷. Este é o principal mecanismo de reparo da lesão 8-oxoG. A 8-oxoG é reconhecida e excisada do DNA pela proteína 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1), que é codificada pelo gene *OGG1*.

O mecanismo de NER é considerado um mecanismo mais geral e flexível (em relação ao BER) pois o reconhecimento da lesão não se baseia em sua natureza química, mas no grau de distorção promovido na hélice do DNA. Este mecanismo repara danos que provocam distorção da dupla hélice e interferência no pareamento de bases, que obstruem a transcrição e replicação. O gene *DBB1* está associado a este mecanismo. O gene *DBB1* (*DNA damage-binding protein 1*) liga-se ao *DDB2* para formar o complexo de proteínas de ligação ao DNA danificadas por UV (o complexo UV-DDB). O complexo UV-DDB pode reconhecer danos no DNA induzidos por UV, ligando-se à fita e recrutando proteínas da via de reparo de excisão de nucleotídeos (a via NER) para iniciar o reparo de DNA ³⁸.

A NER atua em a presença de enzimas, como o complexo *ERCC1* e *ERCC2* ^{39,40}. A proteína *ERCC1* (*Excision repair cross Complementing 1*) tem papel importante no mecanismo de excisão de nucleotídeos e também no mecanismo de recombinação, estando envolvida também no reparo de quebras de fitas duplas de DNA. Ela atua posicionando a endonuclease XPC que catalisa a incisão do DNA na porção 5' na fita lesionada. Após a incisão na fita, ocorre a

remoção dos nucleotídeos pelas DNA polimerases, que também resintetizam o DNA usando como molde a fita não danificada. Baixa expressão de *ERCC1* está associada ao risco aumentado de câncer enquanto elevada expressão associa-se à “resistência” ao quimioterápico.^{39,41}

O gene de reparo *ERCC2* (Excision repair cross Complementation Group 2) codifica a proteína ERCC2, também chamada de XPD, que atua no processo como o helicase provisória, em busca de lesões do DNA causadas por radicais livres e conseqüentemente, a remoção da lesão. A remoção da lesão se dá por um heterodímero constituído das proteínas ERCC1 e XPF³⁹.

O reparo de fita duplas pode ocorrer por mecanismo de recombinação homóloga ou NHEJ. O acionamento destas vias é dependente da presença de uma cópia da região lesionada para a homologia necessária ao reestabelecimento da informação perdida no local da quebra. No processo de reparo por recombinação, a fita complementar não danificada é utilizada como molde na substituição do fragmento lesado.⁴²

Na via de recombinação homóloga uma seção de DNA é removida no processo de ressecção. Em seguida, proteínas específicas se juntam aos filamentos simples de DNA e “invadem” uma fita homóloga, formando estruturas em forma de cruz nas quais a união das extremidades não homólogas e a recombinação homóloga são utilizadas na correção de quebras de dupla fita de DNA⁴². A extremidade 3’ do filamento anelar é estendida pela ação da DNA polimerase, por meio da utilização de uma das fitas da molécula homóloga como molde, o que promove o retorno da molécula invadida ao emparelhamento normal⁴². Devido à necessidade da fita homóloga, este mecanismo é ativo somente durante as fases S e G2 do ciclo celular.⁴³

No mecanismo NHEJ algumas etapas sequenciais ocorrem: (I) reconhecimento do final de fita de DNA e estabilização do complexo NHEJ na quebra da fita dupla do DNA; (II) Preenchimento do final da fita de DNA e promoção da estabilidade final; (III) processamento do final da fita de DNA; e (IV) ligação das extremidades quebradas e dissolução do complexo NHEJ.⁴³

O gene *BRCA1* (*Breast cancer gene 1*) é supressor tumoral, atua nos mecanismos de reparo de DNA por recombinação e NHEJ atuando na transcrição e regulação do ciclo celular. Este gene é expresso quando há instabilidade genômica mediada por estrogênio^{44,45}. BRCA1 é uma proteína

mediadora de diversos processos associados ao reparo de DNA e regulação do ciclo celular e compõe com outras proteínas um complexo proteico que se acumula próximo ao dano da fita dupla. ^{44,45} (Figura 7)

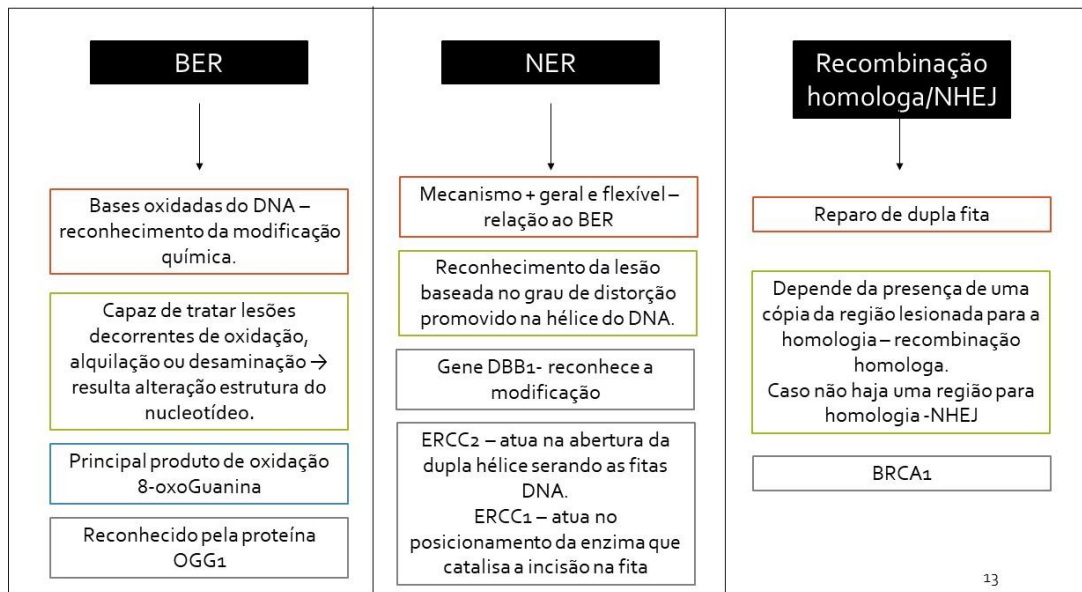


Figura 7: Mecanismos de reparo gênico. resumo dos tipos de mecanismos.

Outras proteínas também estão envolvidas na regulação do maquinário de checagem de danos em DNA. Por exemplo, *TP53* é o gene que codifica a produção da proteína p53. A proteína p53 está localizada no núcleo das células em todo o corpo, onde se liga diretamente ao DNA. Quando o DNA de uma célula é danificado por agentes como produtos químicos tóxicos, radiação ou raios ultravioletas (UV) da luz solar, essa proteína desempenha um papel crítico na determinação se o DNA será reparado ou se a célula danificada se autodestruirá, pelo mecanismo de morte celular (apoptose). Ao impedir que as células com DNA mutante ou danificado se dividam, a p53 ajuda a prevenir o desenvolvimento de tumores. O gene *TP53* atua como um fator de transcrição regulando a expressão de genes que controlam a progressão do ciclo celular, angiogênese e apoptose.⁴⁶

A proteína p53 induz parada de ciclo celular, senescência e apoptose em resposta aos diferentes tipos de estresse. Portanto, em situação de estresse os níveis da proteína p53 são elevados devido ao aumento da taxa de transcrição do gene *TP53* e diminuição da degradação da proteína p53 ⁴⁶.

As alterações biomoleculares causadas pela ação da radiação ultravioleta podem ser reparadas via o sistema de reparo de DNA descrito acima, porém no caso da falha deste mecanismo algumas alterações são replicadas, de modo a codificar proteínas disfuncionais, que levam ao envelhecimento (**Figura 8**).

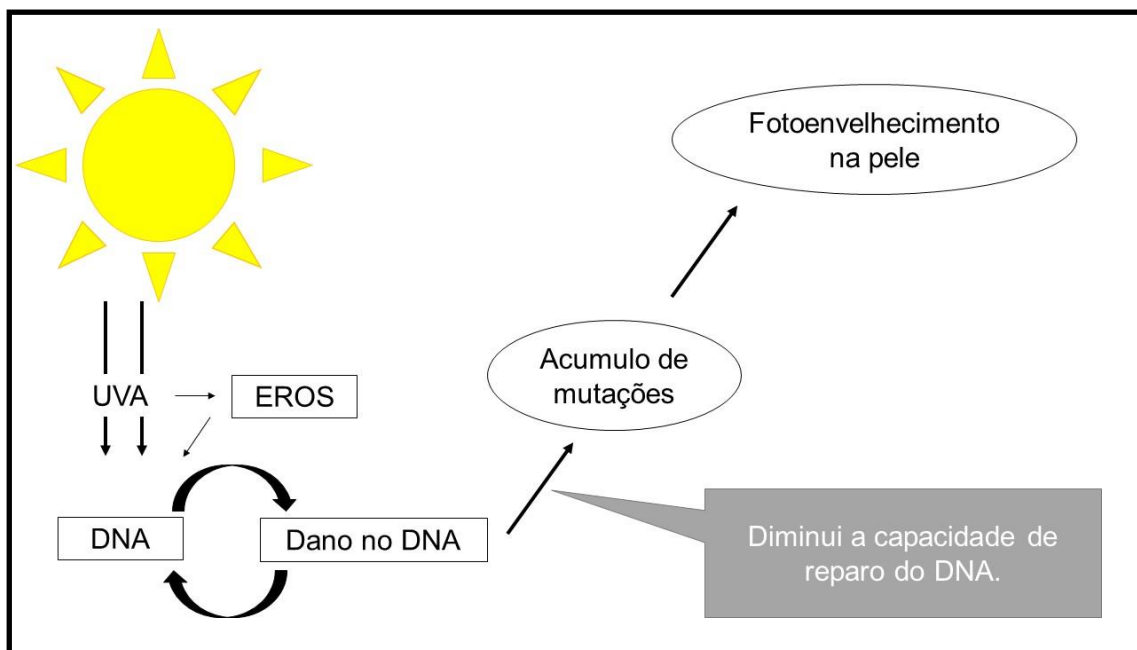


Figura 8: Mecanismo do fotoenvelhecimento (adaptado) ⁴⁷.

1.4. Tratamentos do Envelhecimento Cutâneo

1.4.1 Extratos vegetais

Extratos vegetais tem sido cada vez mais empregados em produtos cosméticos. Eles são incorporados em concentrações que variam entre 3 a 10% em função de sua atividade como, por exemplo, em antirrugas, regeneradores, anti-acne entre outras ⁴⁸

Extratos vegetais contém diversos componentes que apresentam propriedades antioxidantes e atribui-se esta característica ao processo evolutivo destas espécies como proteção natural aos radicais livres formados pela radiação necessária à fotossíntese ²⁷. Estes componentes antioxidantes podem proteger a pele do fotoenvelhecimento por meio da redução da concentração de espécies oxidantes no tecido, redução da resposta inflamatória⁴⁹, ativação da resposta imune⁵⁰, estímulo à produção de colágeno ⁵¹, produção de matriz

extracelular por fibroblastos⁵², estímulo à proliferação e diferenciação celular, entre outros mecanismos. Desta forma, os extratos são empregados com o objetivo de estimular a renovação celular ou inibir processos bioquímicos que levam à danos, e em alguns casos, ambos ⁵³. Diversos extratos vegetais quando aplicados em modelos animais ou cultura de células neutralizam a reatividade radicalar, diminuindo lesões celulares, a proteínas, lipídeos, ácidos graxos²⁷.

A camomila conhecida como *Matricaria recutita*, um membro da família da margarida, tem sido usada há séculos, internamente e externamente, mais notavelmente em sintomas gastrointestinais, inflamações orais e de pele, dermatites, propriedades sedativas, antibacterianas e antifúngicas, e cerca de 120 constituintes químicos foram identificados na camomila como metabólitos secundários, incluindo 28 terpenóides, 36 flavonóides e 52 compostos adicionais com potencial atividade farmacológica ^{54,55}.

As propriedades e aplicações da camomila como importante fitoterápico são: antiespasmódica, antiflogística, sedativa, antialérgica, vermífuga e também auxilia no aumento da menstruação ⁵⁵ e atividade anti-inflamatória, a atividade antiinflamatória da planta está relacionada à presença de óleo essencial constituído de matricina e alfa-bisabolol, enquanto a elevada concentração de flavonoides ⁵⁶.

Já o figo conhecido como *Ficus carica L.*, pertence a uma árvore da família Moraceae, é uma das mais antigas árvores frutíferas cultivadas.⁵⁷ Desde a antiguidade as figueiras fizeram parte do cotidiano da humanidade e suas folhas eram utilizadas na medicina popular. A Bíblia descreve sua existência desde a criação do mundo (Gn 3:7), e descreve o relato de um fato onde o profeta Isaías disse para o rei Ezequias fazer uma pasta de figo e colocar sobre sua úlcera e esta sarou (2 Reis 20:7).

O figo apresenta características quando ao seu potencial antioxidante, o figo é fonte de dois grandes grupos principais de compostos fenólicos com grandes concentrações de polifenóis, com ação antioxidante potente, como: flavonoides, como a quercetina e catequina além de ácidos fenólicos, como o ácido gálico. ⁵⁷

Um antioxidante é qualquer substância capaz de retardar ou impedir à oxidação ⁵³. Antioxidantes agem nos organismos vivos por meio de diferentes mecanismos. Dentre estes, podem ser citados: a complexação de íons

metálicos, a captura de radicais livres, a decomposição de peróxidos, a inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a modulação de vias sinalizadoras celulares ⁷. A atividade antioxidante de compostos fenólicos de plantas deve-se às suas propriedades REDOX e estruturas químicas, que possibilitam a estes compostos exercerem a função de neutralizar radicais livres ⁵⁸.

De maneira geral, os antioxidantes são formados por composição fenólica e carotenóide ⁵³. A atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Alguns destes compostos encontrados e extraídos de vegetais são os polifenóis, os flavonoides, entre outros. Os compostos fenólicos formam o maior grupo de antioxidantes extraído de vegetais²⁷. Flavonóides, fenilpropanóides e outros compostos aromáticos ⁵⁸, os compostos polifenólicos, apresentam atividade fotoprotetora, bem como atividade reparadora, cujo mecanismo de ação se baseia na captura de radicais livres, inibição da atividade de enzimas que participam da produção de EROs, complexação de íons metálicos, bem como na interrupção da cascata de reações radiculares ⁵⁹.(Figura 9)

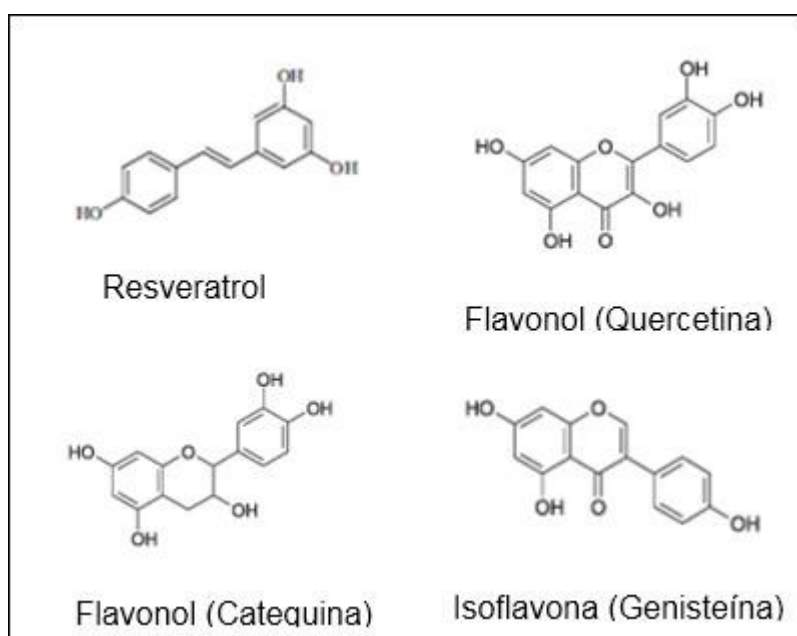


Figura 9: Estrutura química dos compostos polifenólicos.

Existem relatos a respeito dos efeitos benéficos do tratamento com extratos vegetais como por exemplo, chá verde, chá branco e Aloe ⁶⁰⁻⁶², após a exposição solar em modelos de células e animais. Porém a maioria dos estudos estão associados com a melhora/redução dos efeitos causados pela radiação ultravioleta B, sendo que são escassos os estudos com radiação UVA ^{63,64} Pouco se sabe a respeito dos efeitos da aplicação dos extratos após a exposição à radiação ultravioleta, em especial a UVA, que é a principal causadora do fotoenvelhecimento e tem suas consequências associadas à exposição cumulativa.

1.4.2. Fotobiomodulação

Fotobiomodulação (FBM) é um tratamento baseado na ação exercida pela luz em tecidos. Neste processo, o fóton incidente é absorvido, resultando em modificações bioenergéticas, bioelétricas e bioquímicas que culminam na modulação de diversas funções das células ⁶⁵. Desta forma, a luz induz aumento da atividade celular, aumento na produção de ATP mitocondrial, liberação de fatores de crescimento e proliferação, estimula a divisão celular, produção de matriz extracelular, migração de células epiteliais, fibroblastos e leucócitos, aumento da atividade fagocitária de macrófagos ^{66,67} além disso, induz atividade mitótica das células do epitélio e estimula microcirculação local ⁶⁸.

A molécula do citocromo C oxidase existente nas mitocôndrias é considerada a responsável pela absorção da radiação e o principal mediador da produção de moléculas que participam da cascata de sinalização ^{69,70}. O efeito fotobiomodulador da luz está diretamente relacionado com suas propriedades, tais como o comprimento de onda, frequência e dose ⁷¹.

Em termos do efeito rejuvenescedor da FBM, existem relatos do efeito do LED vermelho na redução de rugas moderadas, melhora na textura da pele, estímulo à síntese de colágeno e elastina, aumento da elasticidade da pele, além de inibição da atividade de metaloproteinases, tanto em casos *in vivo* com *in vitro* (45-47) Em um estudo clínico realizado por Ferolla e colaboradores foi observada melhora clínica na maior parte dos pacientes com diferentes fototipos de pele, sendo observada melhora na flacidez, textura, cor, elasticidade e redução da rugas superficiais em grupos tratados com LED (630 nm, 100 mW/cm², intensidade de saída 3100 mW/cm²).⁷⁵

Diante deste contexto, considera-se que são necessários estudos para avaliar a resposta dos queratinócitos com FBM e extratos naturais, aplicados de forma isolada e combinada, após uma indução de estresse oxidativo por radiação UVA, em termos de retardar os efeitos do fotoenvelhecimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

Avaliar o efeito da FBM com luz LED vermelha associada à extratos naturais com diferentes conteúdos polifenólicos, em queratinócitos humanos normais expostos à radiação UVA.

2.2 Objetivos Específicos:

Avaliar em queratinócitos humanos normais imortalizados em cultura, previamente expostos à radiação UVA e pós-tratados com extratos naturais em associação com FBM (UVA+extrato+LED):

- A viabilidade celular por MTT
- A expressão gênica de enzimas antioxidantes
- A expressão de genes de reparo de DNA

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Cultura celular

A linhagem de queratinócitos normais HaCaT foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista, do laboratório de Processos Induzidos e Interfaces do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

O meio de cultura DMEM contendo 4,5 g/L de glicose e 2 mM de L-glutamina (Vitrocell-Campinas, Brasil) foi adquirido em sachês e preparado com água ultrapura, ajustando-se o pH em 6,9 e esterilizado por filtração em sistema a vácuo com membrana de 0,22 μm (Sartorius Stedim Biotech, Gottingen, Alemanha). O DMEM foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB- Vitrocell-Campinas, Brasil) a 1 % (para os tratamentos com extratos) e 10 % (para as demais manipulações). Após filtragem, o DMEM foi suplementado com solução penicilina-estreptomicina com antimicótico (Vitrocell- Campinas, Brasil) a 0,1 %. O tampão fosfato salino (PBS) 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4 pH 7,2, foi preparado com água ultrapura e esterilizado por autoclavação. Para o processo de subcultivo foi utilizado o tampão acima contendo 0,05 % de EDTA. Todos os sais e o EDTA foram adquiridos da Labsynth (Diadema, Brasil).

A tripsina foi adquirida da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) e a mesma foi utilizada na concentração de 0,25 % em PBS filtrada em sistema a vácuo com membrana de 0,22 μm (Sartorius Stedim Biotech-Gotinga, Alemanha) armazenada sob congelamento.

As garrafas de cultura utilizadas (75 cm^2) foram adquiridas da Sarsted (Nümbrecht, Alemanha), as placas de cultura de 48 poços tratadas foram adquiridas da KASVI (Curitiba/Brasil) e as placas de 35mm com aderência foram adquiridas pela Sarsted (Nümbrecht, Alemanha).

3.1.2. Sistemas de irradiação

Irradiador ultravioleta

Para a irradiação na região do UVA foi utilizado um irradiador não comercial, personalizado, composto por 9 lâmpadas emitindo na região de 366 ± 10 nm (**Figura 10**), com os parâmetros a apresentados na **Tabela 2**:

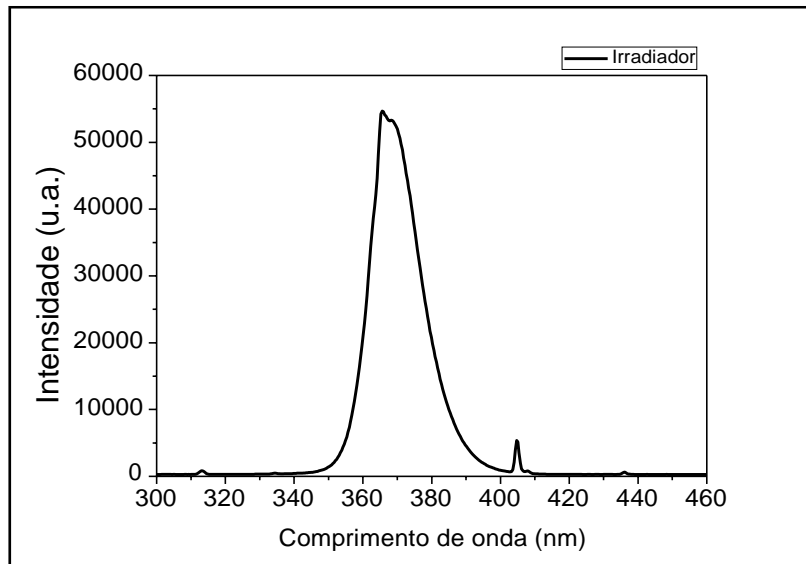


Figura 10: Espectro de emissão do irradiador UVA.

Tabela 2: Parâmetros do irradiador UVA.

Parâmetro (unidade)	Valor
Comprimento de onda (nm)	366 ± 10
Irradiância (mW/cm ²)	2,5
Exposição Radiante (J/cm ²)	9
Tempo de exposição (minutos)	90
Distância de irradiação (cm)	23
Número de lâmpadas	9
Tipo de lâmpadas	BLB, 8 watts, 30cm
Homogenização	4 espelhos laterais

Sistema de irradiação LED

Foi utilizado um refletor de LED (**Figura 11**) da marca Condulai (São Paulo/SP) com máximo de emissão em 640 nm ± 12 nm, com os parâmetros a apresentados na

Tabela 3:

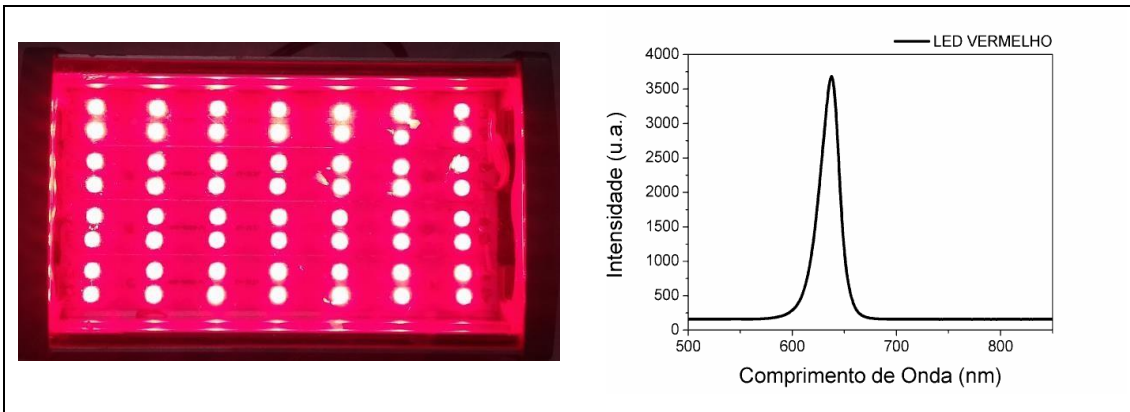


Figura 11: Sistema de Irradiação. Esquerda: Imagem do sistema LED ligado, Direita: Espectro de emissão do sistema LED.

Tabela 3: Parâmetros do Sistema LED para fotobiomodulação.

Parâmetro (unidade)	Valor
Comprimento de onda (nm)	640 ± 12
Irradiância (mW/cm ²)	2,6
Exposição Radiante (J/cm ²)	1
Tempo de exposição (minutos)	7
Distância de irradiação(cm)	0
Número de LEDs	56

3.1.3. Extratos naturais

Os extratos foram cedidos pela empresa Bioextract, na onde todos os extratos são veiculados em meio HG (água, etanol e propilenoglicol), na onde todos os extratos possuem validade e em todo os experimentos a validade de cada extrato foi respeitada. Segue abaixo:

Tabela 4: dados dos extratos para o tratamento

	Validade	Lote
Camomila HG	02/2019	33311 – 0217
Figo HG	03/2020	33406 - 0317

3.2 Método

3.2.1 Desenho do estudo

Este trabalho contou com 6 grupos de tratamento com extratos:

Grupo Controle: Sem tratamento com extratos

Grupo HG: Tratamento das células com veículo Hidroglicólico

Grupo Camomila: Tratamento das células com extrato de camomila.

Grupo Mirtilo: Tratamento das células com extrato de mirtilo.

Grupo Figo: Tratamento das células com extrato de figo.

Grupo Nogueira: Tratamento das células com extratos de noqueira.

Todos os grupos descritos acima foram expostos a 4 condições experimentais:

(Figura 12)

Escuro: Células que recebem o tratamento *sham* para UVA e FMB

UVA: Células que foram expostas à radiação ultravioleta UVA e recebem FMB *sham*;

FBM: Células que sem exposição à radiação ultravioleta UVA (UVA *sham*) e recebem o tratamento por FBM;

UVA + FBM: Células são expostas à radiação ultravioleta UVA e recebem o tratamento por FBM.

Desta forma, no total foram utilizados 24 grupos experimentais.

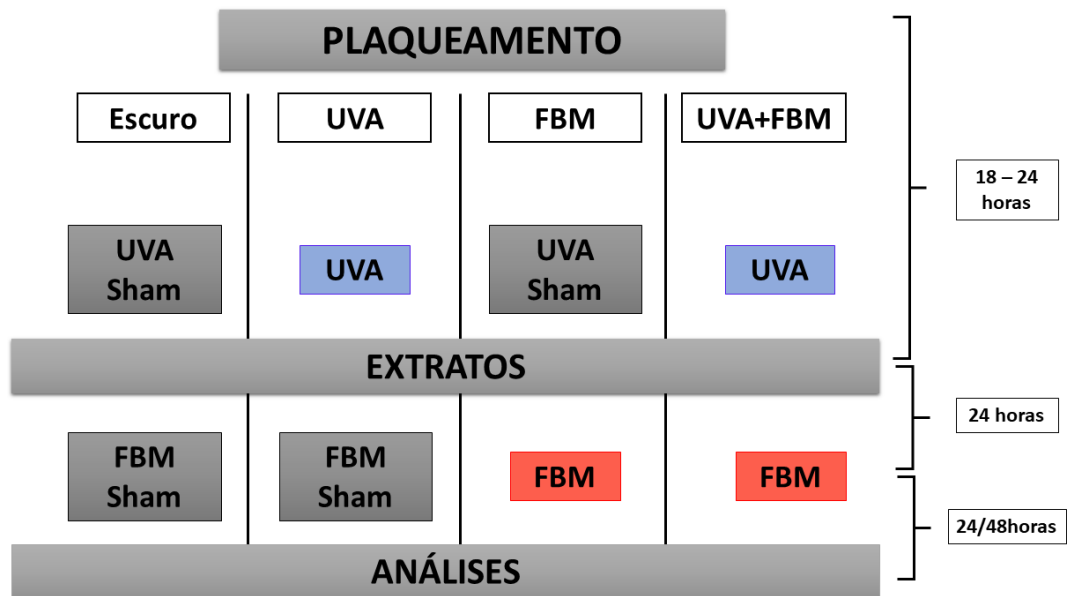


Figura 12: Desenho Experimental do estudo.

3.2.2 Cultivo celular

As células HaCat foram armazenadas sob criopreservação na densidade de $1,0 \times 10^6$ células/mL, sobre meio DMEM suplementado a 10%, SFB e DMSO. O processo de descongelamento contemplou a transferência total do conteúdo de um tubo criogênico para um tubo contendo 10 mL de DMEM suplementado a 10% SFB e 0,1% de antibiótico. As células então foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 1.200 rpm e ressuspensas em 10 mL de DMEM a 10% SFB, transferidas para uma garrafa de 75 cm² e mantidas em estufa (37°C, 5 % CO₂, atmosfera úmida).

Observando-se confluência em torno de 85 % da garrafa as células foram submetidas ao processo de subcultivo, no qual as células são lavadas e mantidas em PBS com EDTA, duas vezes, a primeira vez foi desprezado o PBS e a segunda foi mantido 5 minutos em incubadora para, em seguida, desprezar o PBS e adicionar 2 mL da solução de tripsina incubando-se por 5 minutos. A ação da tripsina foi inativada com a adição de 8 mL de DMEM com 10 % SFB. Em seguida, é retirada uma alíquota para contagem das células utilizando a câmara de Neubauer.

3.2.3. Ensaio de viabilidade celular

Após cultura celular apresentando em torno de 85 % de confluência as células HaCaT foram semeadas no meio de DMEM 10% em placas de 48 poços na densidade de 60.000 células/poço. Após 18-24 horas, o meio de cultivo foi retirado, as células foram lavadas PBS e mantidas em de PBS. Duas placas foram submetidas ao UVA e duas placas foram mantidas no escuro, cobertas com papel alumínio, durante 90 minutos. Ao término deste período, o PBS foi retirado, as células foram tratadas com extratos naturais em diferentes concentrações (de 0,3 a 0,01% v/v) em DMEM 1% SFB durante 24 horas. Por fim, as placas foram lavadas com PBS e mantidas em PBS, sendo que 2 placas foram irradiadas com LED e outras 2 mantidas no escuro (cobertas com papel alumínio). Ao término do tratamento, o PBS foi retirado e aplicado DMEM 10% SFB, mantendo as placas e incubadora por 48 horas. Para determinação da viabilidade celular foi realizado o ensaio colorimétrico com uso do MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio, com algumas modificações ⁷⁶. As células foram lavadas em PBS, e tratadas com MTT 75 µg/mL em DMEM 1 % SFB por 2 horas em incubadora. As soluções foram aspiradas com cuidado e foi adicionado isopropanol aos poços. Para determinação da porcentagem de células viáveis foi realizada a leitura de absorbância em 620 nm em um leitor de placas (Spectramax – Molecular devices) e os valores de absorbância para as células controle foram considerados como 100 % de células viáveis e comparados aos valores das amostras.

3.2.4 Expressão Gênica

As células HaCaT foram semeadas no meio de DMEM 10% em 12 placas de 35mm na densidade de 150.000 células/poço. Após 18-24 horas, o meio de cultivo foi retirado, as células foram lavadas PBS e mantidas em PBS, 8 placas foram submetidas ao UVA e 8 placas foram mantidas no escuro, cobertas com papel alumínio, durante 90 minutos. Ao término deste período, o PBS foi retirado, foram aplicados os extratos vegetais (Camomila e Figo) a 0,05% v/v diluídos DMEM 1% SFB durante 24 horas. Por fim, as placas foram lavadas com PBS e mantidas em PBS, sendo que 8 placas foram irradiadas com LED e outras 8

mantidas no escuro (cobertas com papel alumínio). Ao término do tratamento, o PBS foi retirado e aplicado DMEM 10% SFB, mantendo as placas e incubadora por 24 horas. Após as 24 horas foi realizada extração de RNA. As análises de expressão gênica foram realizadas na Universidade de São Paulo, no laboratório liderado pelo Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes.

Extração total de RNA

Para extração do RNA total das amostras, as células foram lavadas com PBS gelado e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente em 0,5 mL de TRIzol (Thermo Fisher). Após a lise celular, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase. Foram adicionados 0,100mL de clorofórmio gelado em cada amostra, agitando por 15s. Incubou-se por 3min em temperatura ambiente, centrifugando em seguida (12.000g, 15 min, 4°C). A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos estéreis nos quais foram adicionados 0,250 mL de álcool isopropílico gelado, incubando por 10 min a temperatura ambiente. Os tubos foram novamente centrifugados (12.000g, 15 min, 4°C), sendo que ao término da centrifugação foi possível observar o precipitado de RNA no tubo. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 0,300mL de etanol 75% gelado aos tubos. Após centrifugação (6.000g, 5 min), o álcool foi descartado e o RNA foi ressuspensão em água DEPC. A concentração e pureza do RNA foi determinada no Nanodrop 2000 (ThermoFisher, USA) avaliando as absorvâncias em comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

Previamente à síntese de cDNA, um micrograma do RNA total foi incubado com a enzima *DNase I Amplification Grade* (Thermo Fisher, USA) por 15 min em temperatura ambiente. Para a síntese do cDNA utilizou-se o *High Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas em termociclador (Termociclador Matercyler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e submetidas a

ciclos de 10 min à 25°C, seguidos de 120 min à 37°C e 5 min à 85°C. O cDNA foi armazenado em freezer a -20°C até o momento de sua utilização.

RT- PCR quantitativo (RT- qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se o termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), *primers* específicos para os genes *ERCC1*, *ERCC2*, *DBB1*, *BRCA1*, *TP53*, e *OGG1* e o gene constitutivo *GAPDH* e *CAT* (Invitrogen™). Os *primers* foram desenhados utilizando-se o software Gene Tool 2.0 (Biotools Incorporated, Edmonton, Alberta, Canada).

O cDNA serviu de molde para a amplificação por qPCR, sendo todas as reações realizadas num volume final de 10 µL em tubos óticos com os *primers sense* e *antisense* para cada gene (400nM), 5 µL de Sybr Green Master Mix® (Applied Biosystems), cDNA (1 µL) e água. Para cada par de *primers* foi realizada qPCR utilizando-se água estéril (*blank*) para avaliação de sua possível contaminação. O processo de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg e 60°C por 1 min para todos os genes de análise. Para o gene constitutivo *GAPDH*, o processo de ciclagem constituiu em desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg, 60°C por 30seg e 72 °C por 40seg. Todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação ao final do último ciclo, conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação. As sequências dos *primers* utilizados bem como as condições das reações de qPCR específicas para cada gene estão descritas na Tabela 5.

A análise quantitativa da expressão foi realizada de acordo com o método matemático de Livak e Schmittgen⁷⁷. A expressão gênica para cada gene foi calculada por meio da equação $E = 2^{-\Delta\Delta CT}$, na qual 'E' é a expressão gênica. Foi calculado o ΔCT de cada amostra, subtraindo-se o CT (limiar do ciclo) do gene controle (*GAPDH*) dos valores do gene alvo. Escolheu-se como amostra normalizadora o grupo Controle escuro, em que as células HaCaT não foram expostas a nenhum agente químico ou luz. Realizou-se o cálculo do ΔCT da amostra (subtraindo-se o CT do gene *GAPDH* dos valores do gene alvo para a

amostra normalizadora). Em seguida, calculou-se o $\Delta\Delta CT$ de cada amostra, subtraindo-se o ΔCT da amostra normalizadora do ΔCT da amostra. Por fim, após determinado o $\Delta\Delta CT$ aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 5: Genes alvo via reação em cadeia da polimerase quantitativa da transcriptase reversa, de acordo com o número de acesso do GenBank, sequência dos *primers* e temperatura de anelamento.

Gene	Banco de genes	Primer 5'→3'	Temperatura de anelamento (C°)
BRCA1	NM_004656.4	F: GATACGTCCGTGATTGATGATGA	60
		R: TGAGTTGCACAAGAGTTGGGTA	
ERCC1	XM_017026460.2	F: CCTTATTCCGATCTACACAGAGC	62
		R: TATTCGGCGTAGGTCTGAGGG	
ERCC2	XM_017026467.1	F: AGAAGGTGATTGAAGAGCTTCG	60
		R: ACCTCAGGGTGAATACACAAGT	
DBB1	NM_001923.4	F: ACCGGACACTTTACTTCGGC	60
		R: TCGGCGGTGACCACATAGA	
TP53	NM_001126118.1	F: CAGCACATGACGGAGGTTGT	50
		R: TCATCCAAATACTCCACACGC	
OGG1	XM_017006499.2	F: ATGGGGCATCGTACTCTAGC	60
		R: CTCCTCCACCGAAAGAT	
CAT	NM_001752.4	F: TGGGATCTCGTTGGAAATAACAC	61
		R: TCAGGACGTAGGCTCCAGAAG	

Os experimentos foram realizados no laboratório na do Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes na instituição Universidade de São Paulo, FOU SP.

3.2.8. Análise Estatística

O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados. Os dados gaussianos foram expressos em média e desvio padrão (média DP), enquanto os dados não paramétricos foram expressos em mediana e percentis 5 e 95. Para análise inferencial, foi utilizado um teste ANOVA One-Way e o teste post hoc de Tukey para dados gaussianos, e um teste de Kruskal-Wallis seguido por um Mann Whitney para os dados não paramétricos. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O software utilizado para os testes e gráfico de preparação foi GraphPad Prism 6, versão 6,1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros utilizados para este estudo foram previamente determinados em nosso grupo de pesquisa (Elineides Santos Silva, Dissertação de Mestrado). Os parâmetros estabelecidos foram: exposição radiante de 9J/cm² de UVA para simular o dano causado pela exposição solar, promovendo uma queda na viabilidade de aproximadamente 20%; FBM com exposição radiante de 1 J/cm²; e extratos a 0,3% concentração em que os mesmos não apresentam toxicidade no escuro. O veículo dos extratos é o meio HG (mistura de água, etanol e propilenoglicol em uma proporção que varia dependendo do extrato utilizado) sendo que este não apresenta toxicidade nas concentrações testadas (até 0,5%).

Inicialmente, os extratos foram selecionados por suas classes fitoquímica, ou seja, apresentaram um conteúdo maior de um determinado tipo de polifenóis. No entanto, analisando o teor total de polifenóis (TPC) dos extratos (tabela 1), foi possível verificar a que os extratos que apresentaram as maiores toxicidades foram aqueles que apresentou o maior TPC, independentemente do tipo de polifenol que eles continham, estes dados foram reprotados e discutidos no artigo Silva ES, Machado GB, Lino-dos-Santos-Franco A, Pavani C. Combination of Natural Extracts and Photobiomodulation in Keratinocytes Subjected to UVA Radiation. Photochem Photobiol. 2018;Anexo A⁷⁸.

Tabela 6: Teores totais de polifenóis (TPC) dos extratos utilizados.

Extratos Naturais	* TPC (g Kg⁻¹)
Nogueira HG	4,22 ± 0,19
Camomila HG	0,92 ± 0,01
Mirtilo HG	0,78 ± 0,04
Figo HG	0,19 ± 0,00

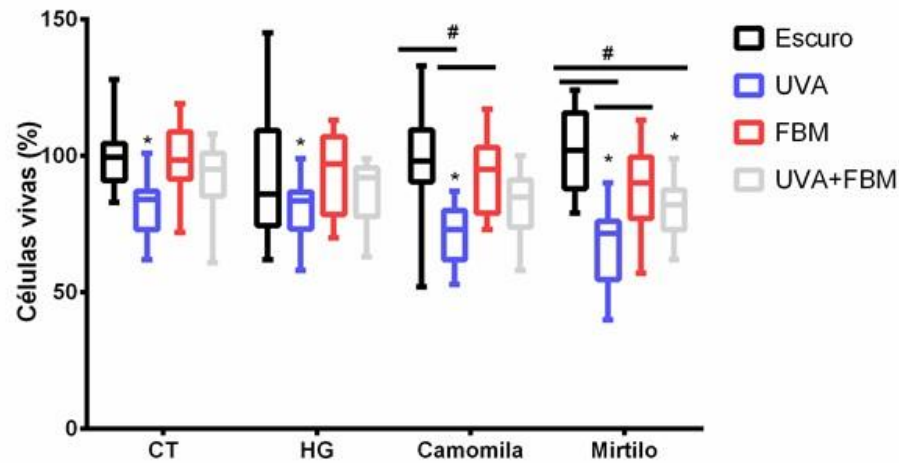
HG, hidroglylica. * TPC é apresentado em equivalente ácido gálico (GAE).

4.1 Determinação da viabilidade celular por MTT

Utilizando os parâmetros citados acima foram avaliados os extratos de Camomila, Figo, Mirtilo e Nogueira (**Figura 13**) a 0,3%. O veículo hidroglicólico (HG) utilizado a 0,3% não influenciou os resultados, apresentando valores de

viabilidade similares ao controle. Avaliando somente o grupo controle dos diferentes tratamentos (escuro, UVA, FBM e UVA+FBM) observa-se que houve uma diminuição de aproximadamente 20% na viabilidade após o tratamento UVA (exposição radiante de 9 J/cm²) estatisticamente significativa em relação ao controle. Huynh e colaboradores verificaram queda de 50% na viabilidade de queratinócitos (HaCat) com exposição radiante de 20 J/cm².⁷⁹ O grupo FBM (1J/cm²), em que houve aplicação da FBM sem danos celulares prévios, não apresentou diferença na viabilidade celular em relação ao controle. Outros trabalhos já evidenciaram a ausência de efeito da FBM em tecidos em homeostase. No grupo UVA+ FBM, em que houve aplicação da FBM após a radiação UVA, foi observada melhora na viabilidade celular em relação ao grupo UVA (de 80 para 92%), porém sem atingir os níveis basais. Neste sentido, Tian e colaboradores mostraram que, após a exposição de fibroblastos ao UVB, o tratamento com LED 630 nm (FBM) aumentou a quantidade relativa de células sendo que 1 J/cm² foram suficientes para causar este efeito⁸⁰. Porém a literatura de aplicação FBM após a exposição UVA, não se mostra muito extensa, pois estes efeitos não são amplamente estudados.

A)



B)

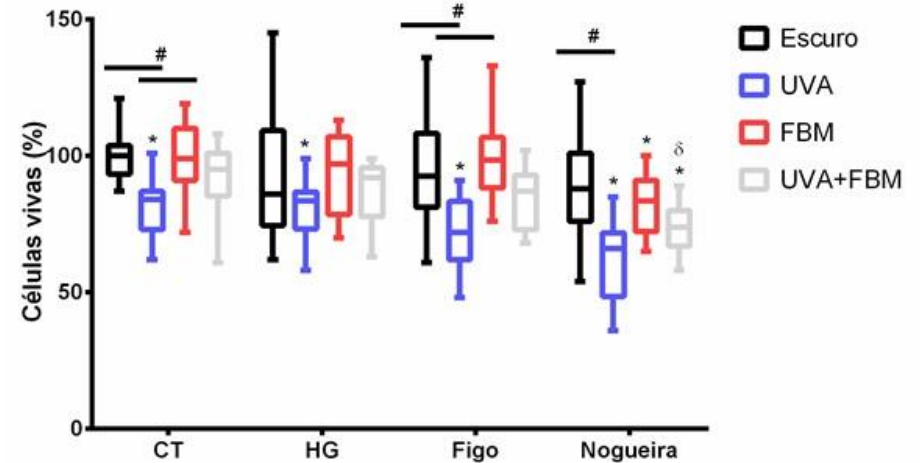


Figura 13: Viabilidade celular de queratinócitos expostos ao UVA e tratados com fotobiomodulação e extratos de camomila, figo, noqueira e mirtilo a 0,3% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. A) Camomila e Mirtilo B) Figo e Nogueira. Parâmetros UVA (366±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm².) LED (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). Dados apresentados como média ± DP, n=6, 04 experimentos independentes, n total de 24. Os dados apresentados como mediana e barras de erro indicam 5 e 95 percentis, n = 24. * P < 0,5 em comparação com o CT escuro; #P < 0,5 entre os tratamentos, °P < 0,5 em comparação com o UVA + PBM controle.

A resposta observada em termos de aumento da viabilidade em função da redução do MTT pode ser interpretada de forma ambígua⁸¹. Uma vez que o ensaio de viabilidade pelo método do MTT se baseia na redução do reagente pela ação das enzimas mitocondriais, é conhecido que a resposta do MTT depende das condições energéticas e metabólicas das células, bem como do ciclo celular, entre outros fatores^{81,82}. Neste sentido, a literatura mostra que a FBM é uma técnica que ativa a produção de ATP, proliferação celular e a modulação de muitos mecanismos de sinalização. A FBM modula os níveis de EROs, uma vez que as estas moléculas podem ser produzidas devido a absorção de luz vermelha por mitocôndrias e opsinas e também pelo aumento do potencial de membrana mitocondrial (MMP), que conseqüentemente aumenta a produção de ATP⁸³. É possível que tenha ocorrido um aumento real na quantidade de células vivas por meio da ativação da proliferação devido à ação da FBM. Por outro lado, também é possível que tenha ocorrido somente um aumento da atividade das enzimas mitocondriais, sem que haja real aumento no número de células. Portanto, uma combinação de diferentes ensaios de morte celular / viabilidade / proliferação deve ser realizada para explicar melhor esse resultado.

O veículo HG mostrou comportamento semelhante ao CT em todos os tratamentos realizados. Da mesma forma, o tratamento de queratinócitos com extrato de camomila (**Figura 13** Painel A) e figo (**Figura 13** Painel B) não apresentou melhora em comparação com CT, quando a viabilidade celular foi avaliada: UVA causou redução viabilidade celular e pós-tratamento com extrato não trouxe celular recuperação; FBM após exposição ao extrato não apresentou alterações na viabilidade celular em relação ao tratamento no escuro (extrato de figo e camomila não apresentaram toxicidade quando combinados com FBM. Uma vez que não há diferença estatística entre UVA e UVA+FBM, mas também não há entre UVA+FBM e CT acredita-se que é possível afirmar que a combinação de FBM com tratamento com extrato promoveu leve recuperação em relação ao grupo extrato UVA apesar dessa ausência de diferença em relação à CT em termos de células vivas, outros parâmetros relacionados à sinalização celular e fotoenvelhecimento pode apresentar melhorias com o uso do extrato. A modulação na expressão de citocinas anti e pró-inflamatórias,

metaloproteinases, e genes de reparo de DNA são alguns dos fatores que podem ser influenciados por FBM e extrato de figo, necessitando maiores investigações.

No ensaio realizado com extrato de Mirtilo (**Figura 13** Painel A) verificou-se que UVA causou redução viabilidade celular e pós-tratamento com extrato não trouxe recuperação da viabilidade celular em relação ao grupo CT-UVA. O extrato de Mirtilo também não apresentou toxicidade quando associado à FBM, isto é, a realização da FBM após exposição ao extrato não apresentou alterações na viabilidade celular em relação ao tratamento no escuro (Mirtilo escuro). O grupo UVA+FBM mostrou redução da viabilidade em relação ao controle escuro, de modo que além de não haver efeito benéfico, houve morte celular quando o extrato de Mirtilo foi associado à FBM após à exposição ao UVA.

O extrato de noqueira (**Figura 13** Painel B) gerou resultados muito diferentes de outros tratamentos. A viabilidade celular do grupo FBM após tratamento com noqueira foi significativamente diferente do controle escuro, ou seja, ocorreu morte celular. Este dado mostra que o extrato de noqueira é fotossensível na região vermelha do espectro. O provável mecanismo para o efeito observado envolve absorção de luz pelo extrato, produzindo estados excitados que podem gerar EROS, que são agentes citotóxicos bastante conhecidos. Esta sequência de eventos é o princípio de terapia fotodinâmica ^{84,85} e foi observada em outros tipos de amostras, como cabelos ⁸⁶. Viabilidade celular após tratamento com noqueira UVA + FBM foi significativamente menor do que com CT UVA + FBM, mostrando que o tratamento com noqueira após a exposição UVA e seguido por PBM não reduz a citotoxicidade; ao invés disso, causa morte celular. Os dados do Figo e Noqueira foram reportados no artigo Silva ES, Machado GB, Lino-dos-Santos-Franco A, Pavani C. Combination of Natural Extracts and Photobiomodulation in Keratinocytes Subjected to UVA Radiation. Photochem Photobiol. 2018;Anexo A ⁷⁸.

Os extratos estudados contém substâncias com ação antioxidante, conhecidos como polifenóis. A quantidade de polifenóis (**Anexo A**) presente em cada um dos extratos varia em função do tipo de planta, época do ano, tipo de extração, etc.⁵³ Apesar de inicialmente os extratos não se mostrarem tóxicos no escuro na concentração de 0,3%, foi observada tendência de toxicidade quando aplicados após a exposição ao UVA, isto é, comparando os grupos extrato UVA

com o grupo CT UVA. Acredita-se que este efeito tenha relação com a fragilidade da membrana celular após o dano induzido por UV, que aumentaria a permeabilidade aos polifenóis, causando toxicidade. Acredita-se também, que apesar de todos os extratos apresentarem tendência à toxicidade quando aplicado após o UVA, apenas um dos extratos apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle UVA devido aos elevados valores de desvio padrão. Estes valores de desvio, apesar do cuidado e treinamento do manipulador, são resultado da elevada quantidade de procedimentos e manipulações que são realizados com as células, como por exemplo, lavagens e troca de meios.

Para dar continuidade ao estudo os extratos de noqueira e mirtilo foram excluídos. Ambos extratos apresentaram toxicidade quando combinados com a FBM após a exposição ao UVA e o extrato de mirtilo. Por outro lado, optou-se por dar prosseguimento ao estudo utilizando os extratos de Camomila e Figo. Porém, como foi observada tendência de toxicidade dos extratos quando aplicados após a exposição ao UVA foi importante rever as concentrações utilizadas.

4.2. Avaliação da toxicidade dos extratos após dano UVA.

A toxicidade dos extratos de camomila e figo (**Figura 14**) em diferentes concentrações (0,01 a 0,1%) foi avaliada após a exposição das células à radiação UVA.

A exposição ao UVA causou aproximadamente 20% de redução da viabilidade conforme verificado anteriormente ($p < 0,05$). Todos os tratamentos com extratos após exposição ao UVA não apresentaram diferença na viabilidade celular em relação ao grupo irradiado com UVA, isto é, não foi observada toxicidade de nenhum dos extratos nas concentrações estudadas após a exposição ao UVA. Desta forma, optou-se por utilizar a concentração de 0,05%.

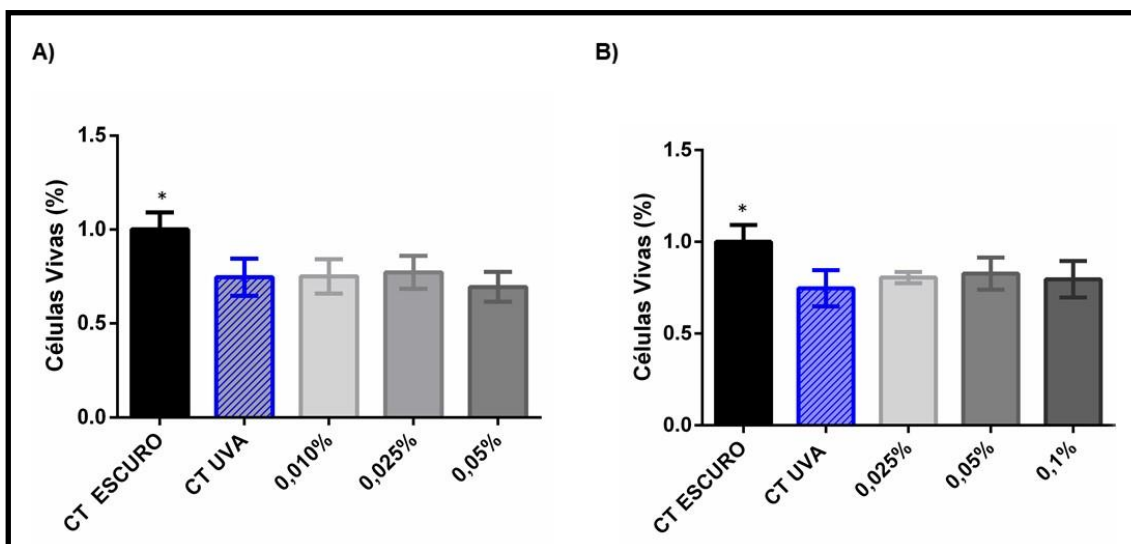


Figura 14: Viabilidade celular de queratinócitos expostos aos extratos (camomila e figo em diferentes concentrações) por 24 horas em DMEM 1 % SFB após exposição ao UVA. A) camomila B) figo. Parâmetros UVA (366 ± 10 nm, $2,5$ mW/cm², $13,5$ J/cm²). Dados apresentados como média \pm DP, n=6, 03 experimentos independentes, n total de 18, *p<0,05 em relação aos demais tratamentos.

4.3. Determinação da viabilidade celular por MTT

Após a determinação das novas concentrações de trabalho, o protocolo combinado foi repetido utilizando os extratos de Camomila e Figo 0,05% (**Figura 15**). Os extratos de camomila e Figo, a 0,05% não apresentaram toxicidade quando utilizados após exposição UVA nem apresentaram toxicidade associada à FBM. Também foi observada tendência à aumento da viabilidade quando compara-se dentro do mesmo tratamento com extrato os grupos UVA e UVA+FBM, porém não foi observada diferença estatística. Desta forma, justamente por não ter sido observada melhora efetiva da viabilidade pela combinação de extrato com FBM após exposição ao UVA, optou-se por avaliar a expressão de enzimas antioxidantes e genes de reparo de DNA, para compreender melhor esta não melhora .

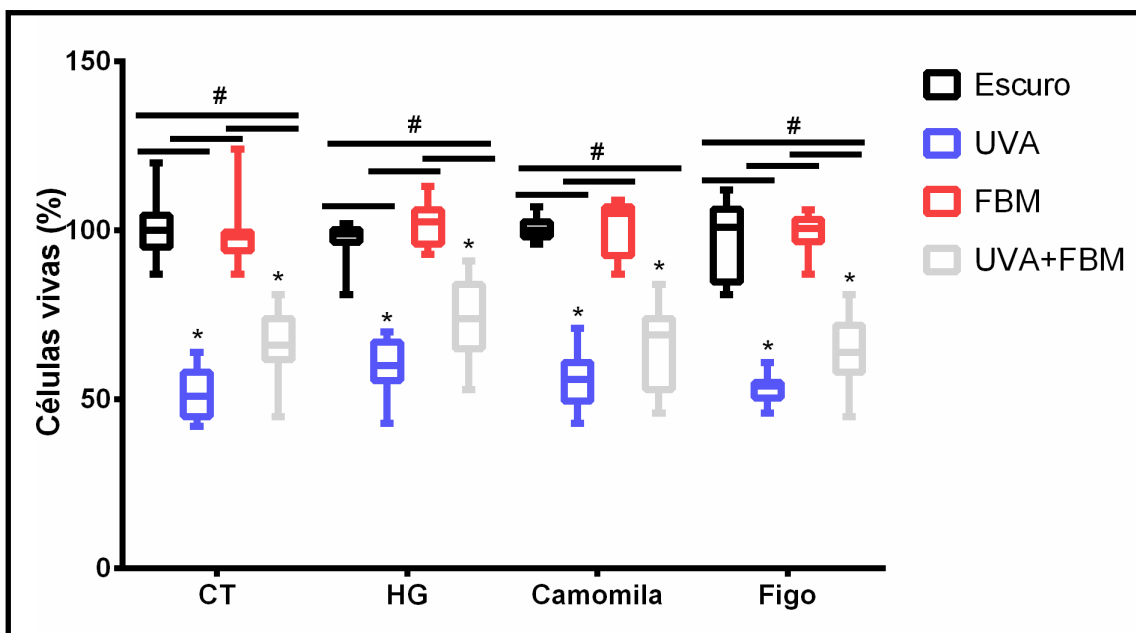


Figura 15: Viabilidade celular de queratinócitos expostos ao UVA e tratados com fotobiomodulação e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). Dados apresentados como mediana e percentis 5 e 95, n= 16, 3 experimentos independentes, n total de 48. * p < 0,05 em comparação com o controle; #p < 0,05 entre os tratamentos.

4.3 Expressão gênica da Catalase

A avaliação da expressão gênica da catalase foi avaliada em todas as amostras e os dados estão apresentados da **Figura 16**. As amostras foram normalizadas em função do grupo controle escuro. No tratamento na ausência de extratos (painel A) houve redução na expressão da *CAT* somente no grupo que recebeu exposição ao UVA e tratamento com FBM (UVA+FBM). Porém a FBM após o tratamento das células com o veículo HG (painel B) causou aumento na expressão de *CAT* em relação aos demais grupos. Quando o foi realizada associação entre FBM e extrato de camomila (Painel C) foi observada redução na expressão da *CAT* nas células que foram expostas ao UVA e pós tratadas com camomila. Esta redução foi menor quando foi realizada a associação de camomila e FBM após a exposição UVA (Painel C). O tratamento com extrato de Figo não causou alteração da expressão gênica da *CAT* (Painel D).

A catalase é uma enzima que contém grupos heme, que são cromóforos na região UVA. Por este motivo, já foi mostrado que o UVA pode danificar a catalase e levar à liberação de grupos heme livres, que podem amplificar o estresse oxidativo⁸⁷. Neste trabalho, apesar da exposição ao UVA, não foi

observada alteração na expressão da catalase. Acredita-se que não foi observada alteração porque a exposição radiante UVA utilizada neste trabalho foi de 9J/cm² enquanto para a liberação de heme livre foi utilizado 50 J/cm²⁸⁸. A FBM (1J/cm²) também não causou alteração na expressão gênica da CAT, sendo que resultados semelhantes já foram observados em tratamentos de FBM com 12.86 J/cm²⁸⁹. Uma vez que o veículo HG é composto de uma mistura de solventes (água, etanol e propilenoglicol), é possível que exista algum potencial de toxicidade do mesmo, de modo que a FBM induziu o mecanismo antioxidante protetor aumentando a expressão de CAT.

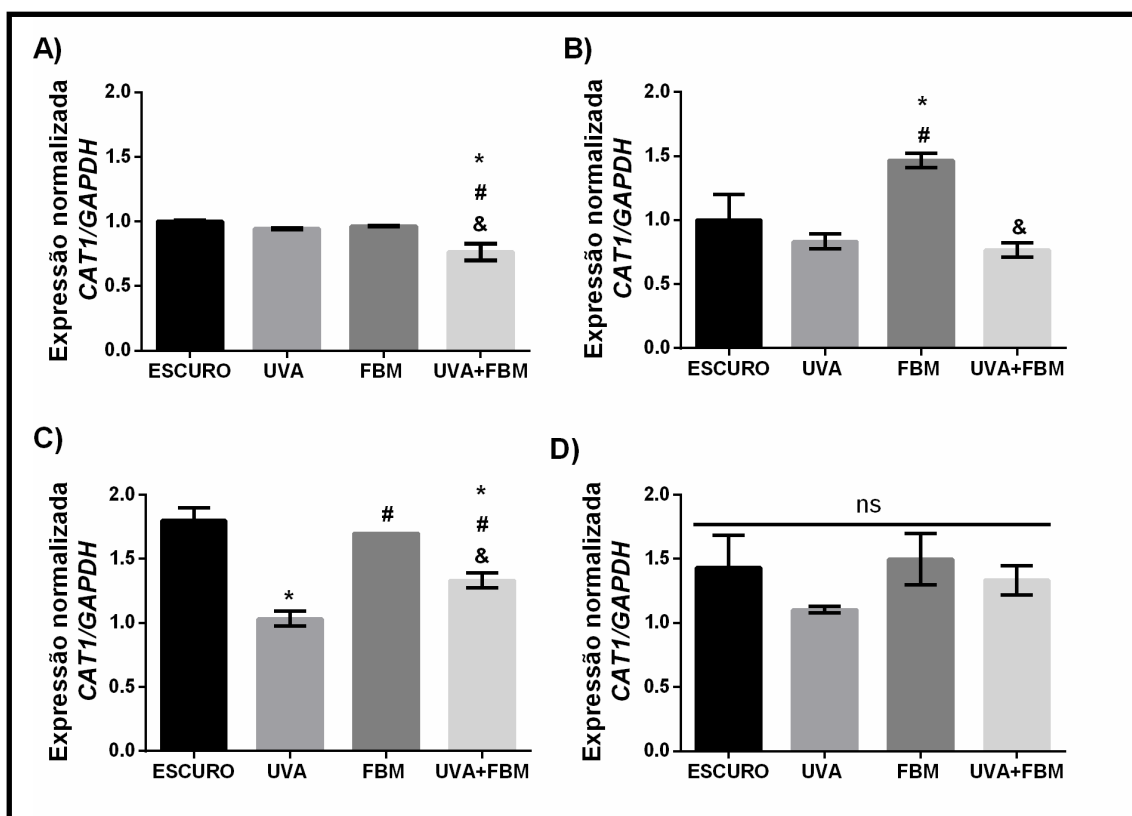


Figura 16: Expressão relativa do mRNA de CAT1 em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p < 0.05 em relação a FBM.

Apesar da expressão do mRNA da Catalase reduzir com a exposição ao UVA e pós tratamento com camomila, o valor de expressão relativa é similar ao observado na ausência do pós tratamento com este extrato. Além disso, a associação da FBM com o extrato de camomila foi capaz de aumentar a defesa

antioxidante do sistema uma vez que a expressão gênica da catalase encontra-se aumentada em relação ao tratamento com extrato, sem a FBM (grupo UVA). Por outro lado, o extrato de Figo utilizado sozinho ou em associação com a FBM não causou nenhuma alteração na expressão gênica da catalase. As diferenças observadas entre a ação do extrato de camomila e do extrato de Figo na expressão da *CAT* está associada ao potencial antioxidante dos mesmos. O extrato de camomila apresenta conteúdo polifenólico total 4,8 vezes maior que o extrato de Figo.⁷⁸ Os polifenóis apresentam capacidade antioxidante devido ao poder redutor das hidroxilas aromáticas que acabam reduzindo os radicais livres presentes e produzindo o radical fenoxila que é estabilizado por ressonância.⁹⁰

4.4 Expressão Gênica de genes de reparo de DNA

4.4.1 OGG1

Dado que a expressão do gene *OGG1* está associada à expressão da enzima 8-oxoguanina DNA glicosilase que é participante do mecanismo de BER, sua expressão é importante dentro da avaliação do efeito dos tratamentos anti-envelhecimento isolados e combinados.

As amostras foram normalizadas em função do grupo controle escuro e os dados estão apresentados na **Figura 17**. O tratamento na ausência de extratos (painel A) mostrou que a exposição à radiação UVA aumentou a expressão de *OGG1* em relação ao grupo CT enquanto que a FBM reduziu a expressão de *OGG1*. A associação dos tratamentos com extrato de camomila e FBM após a ação do UVA (UVA+FBM) não mostrou diferença na expressão do gene *OGG1* em relação aos grupos CT e UVA, sendo maior que o grupo FBM.

No painel B, em que todos os grupos receberam tratamento com o veículo HG foi observada maior expressão gênica no grupo exposto à irradiação UVA em relação ao grupo escuro, sendo que não foi observada diferença nos demais grupos. O tratamento com Camomila no escuro causou aumento da expressão do gene *OGG1* em relação ao grupo CT escuro (CT Painel C X CT Painel A). Porém, todos os demais tratamentos associados à camomila (UVA, FBM e UVA+FBM) mostraram redução na expressão gênica em relação ao grupo Camomila escuro, todos estes dados mostraram que a luz tem potencial prejudicial para o extrato de camomila. Por fim, nos tratamentos realizados com

extrato de Figo (Painel D) somente o grupo das terapias combinadas após exposição ao UVA (UVA+FBM) apresentou expressão aumentada do OGG1 em relação à todos os demais grupos.

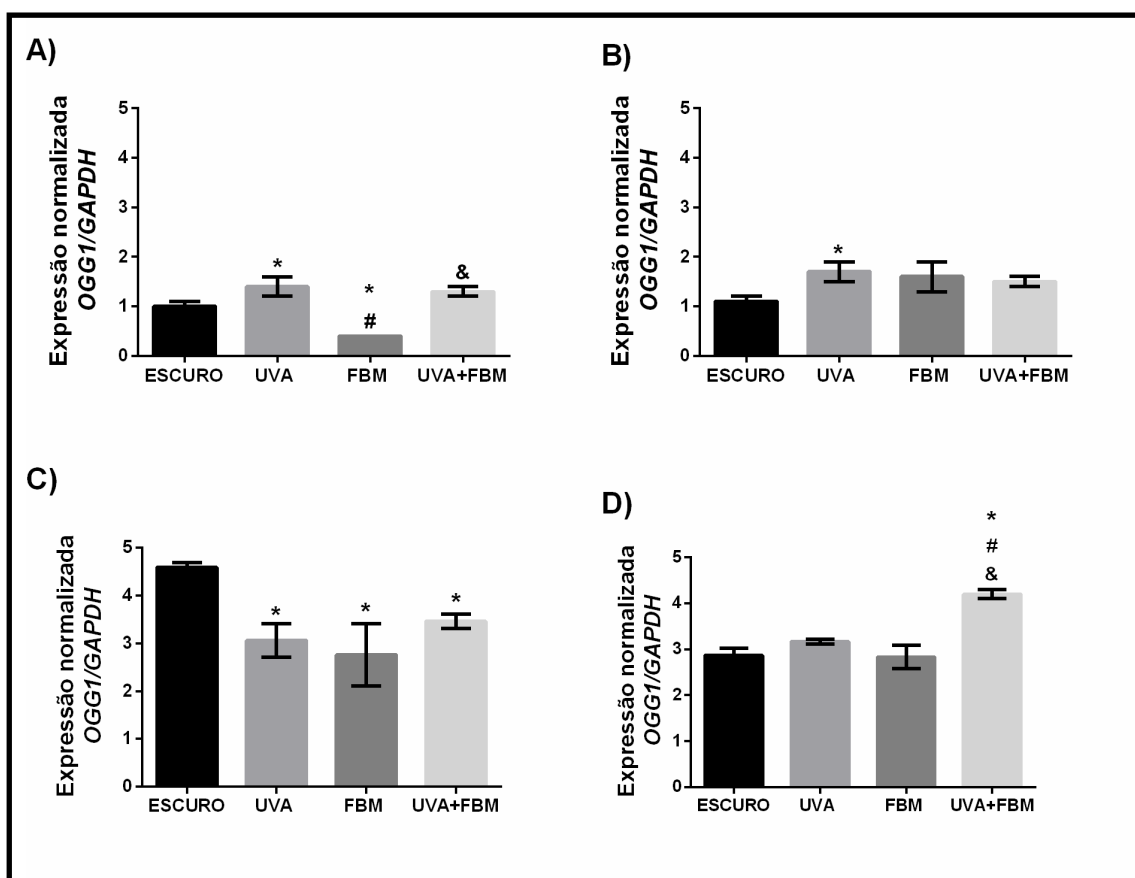


Figura 17: Expressão relativa do mRNA de OGG1 em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p < 0.05 em relação a FBM.

Trabalhos anteriores mostraram que exposição ao UVA gera EROS e causa dano em DNA, em especial a formação de 8-oxoG⁹¹. Por outro lado, também foi relatado que a formação de dímeros de pirimidina tem relação linear com a exposição radiante de UVA utilizada e que sua formação é maior que 8-oxoG, atingindo valores de 0,081 lesões em cada 10⁶ bases normais por J/cm² versus 0,0071, respectivamente⁹².

Apesar desta controvérsia, ainda é bastante aceito o mecanismo oxidativo para o dano em DNA promovido por UVA e neste sentido, OGG1 tem papel importante em evitar mutagênese induzida por UVA, reparando a lesão 8-oxoG⁹³.

Neste estudo, com exposição radiante de 9J/cm² de UVA foi possível verificar o aumento da expressão do mRNA de OGG1 enquanto a FBM reduziu sua expressão. Porém, a aplicação de FBM após a exposição ao UVA não alterou a expressão de OGG1 em relação ao grupo UVA e ao grupo controle escuro, apesar de vários estudos mostrarem que a FBM reduz o estresse oxidativo após exercício aeróbico ⁹⁴ e resistido⁹⁵, após exposição ao barulho excessivo ⁸³ e outros. Seria esperado que a redução no estresse oxidativo reduzisse o dano oxidativo em DNA (e produção de 8-oxoG), levando ao aumento da expressão de OGG1.

Os extratos de camomila e figo aumentaram a expressão de OGG1 em relação ao controle escuro, indicando que o tratamento com estes compostos ativa os mecanismos de defesa antioxidante. Por este motivo, quando as células foram expostas ao UVA e pós tratadas com os extratos, não houve aumento na expressão de OGG1 (no extrato de Figo) inclusive causando diminuição de sua expressão (com extrato de camomila). Uma vez que estes extratos contém diferentes componentes antioxidantes, o estresse oxidativo gerado pela radiação UVA foi controlado pela presença dos extratos, assim não estimulando o gene de reparo. Mais uma vez, o efeito do extrato de figo é menor em relação ao extrato de camomila devido ao menor teor polifenólico total, como mencionado anteriormente. De forma interessante, por outro lado, quando a FBM foi associada ao extrato de figo após a exposição à radiação UVA, a mesma ativou o mecanismo protetor de reparo de DNA de modo que a expressão de OGG1 estava aumentada em relação aos demais grupos.

4.4.2 TP53

O gene TP53 codifica a produção da proteína p53 que tem papel importante na definição se a célula que sofreu lesão de DNA entrará em processo de reparo ou será encaminhada à morte celular por apoptose. A expressão deste gene foi avaliada em todas as amostras e os dados, normalizados em relação ao controle escuro, estão apresentados na **Figura 18**.

Nas amostras que não receberam tratamento com extratos (painel A), o grupo UVA mostrou aumento da expressão de TP53 em relação aos demais grupos (escuro, FBM e UVA+FBM). Por outro lado, as amostras tratadas com o

veículo hidroglicólico mostraram expressão aumentada do *TP53* nos grupos que receberam FBM (FBM e UVA+FBM, no painel B).

Quando o foi realizada associação entre FBM e extrato de camomila (Painel C) todos os grupos apresentaram redução na expressão do *TP53* em relação ao grupo escuro. O grupo FBM não apresentou expressão de *TP53* enquanto a associação de camomila com FBM após UVA (UVA+FBM) causou aumento da expressão gênica em relação ao grupo UVA. Nos grupos tratados com extrato de Figo (Painel D) somente o grupo UVA apresentou expressão reduzida de *TP53* em relação aos demais grupos (escuro, FBM e UVA+FBM). Os grupos que receberam FBM (FBM e UVA+FBM) apresentaram expressão aumentada do *TP53* em relação ao grupo controle e ao grupo UVA, sendo que a associação da FBM com extrato de Figo após a exposição ao UVA apresentou um efeito ainda maior.

Após o dano de DNA algumas vias são ativadas de modo a promover a parada do ciclo celular para que as enzimas de reparo de DNA possam atuar, limpando o genoma antes da síntese de DNA ⁹⁶. *TP53* regula vários outros genes que modulam as defesas contra o crescimento de tumores por meio da ativação do mecanismo apoptótico, parada de ciclo celular e senescência ⁹⁷.

Almeida e colaboradores não observaram efeitos do laser na expressão de mRNA de *TP53* em pele, dados que corroboram com os achados deste estudo ⁹⁷. Esta resposta celular sugere que não há indução de apoptose/reparo de DNA após a FBM. Por outro lado, o aumento na expressão de *TP53* após a exposição ao UVA sugere a parada de ciclo celular, que fornece mais tempo para a realização do reparo de DNA ou eliminação das células danificadas por apoptose. Karthikeyan verificaram 40% de apoptose após exposição de queratinócitos à 10J/cm² de UVA ⁹⁸. O dano induzido por UVB é extensivamente mais estudado que UVA. Foi relatado aumento na expressão de p53 após exposição ao UVB e que o pré-tratamento com polifenóis do chá-verde reduziram a expressão de p53 induzida por UVB, corroborando com os resultados encontrados neste estudo para UVA ⁹⁹.

Neste estudo o uso de um antioxidante antes da exposição à UV preveniu a indução de apoptose e o dano em DNA devido à diminuição da produção de EROs. Maiores exposições radiantes (de UVA e de FBM) poderiam fornecer outras respostas gênicas, provavelmente associadas à indução de apoptose,

uma vez que no maiores valores de exposição radiante nesta linhagem celular leva à redução da viabilidade ⁷⁸. Os efeitos da FBM nos tecidos são dependente do tipo de tecido e parâmetros utilizados, como comprimento de onda e exposição radiante ¹⁰⁰. Quando a FBM foi associada ao extrato de figo após a exposição à radiação UVA, a mesma ativou o mecanismo protetor de reparo de DNA de modo que a expressão de TP53 estava aumentada em relação aos demais grupos. O mesmo foi observado para o extrato de camomila, porém o aumento foi menos expressivo.

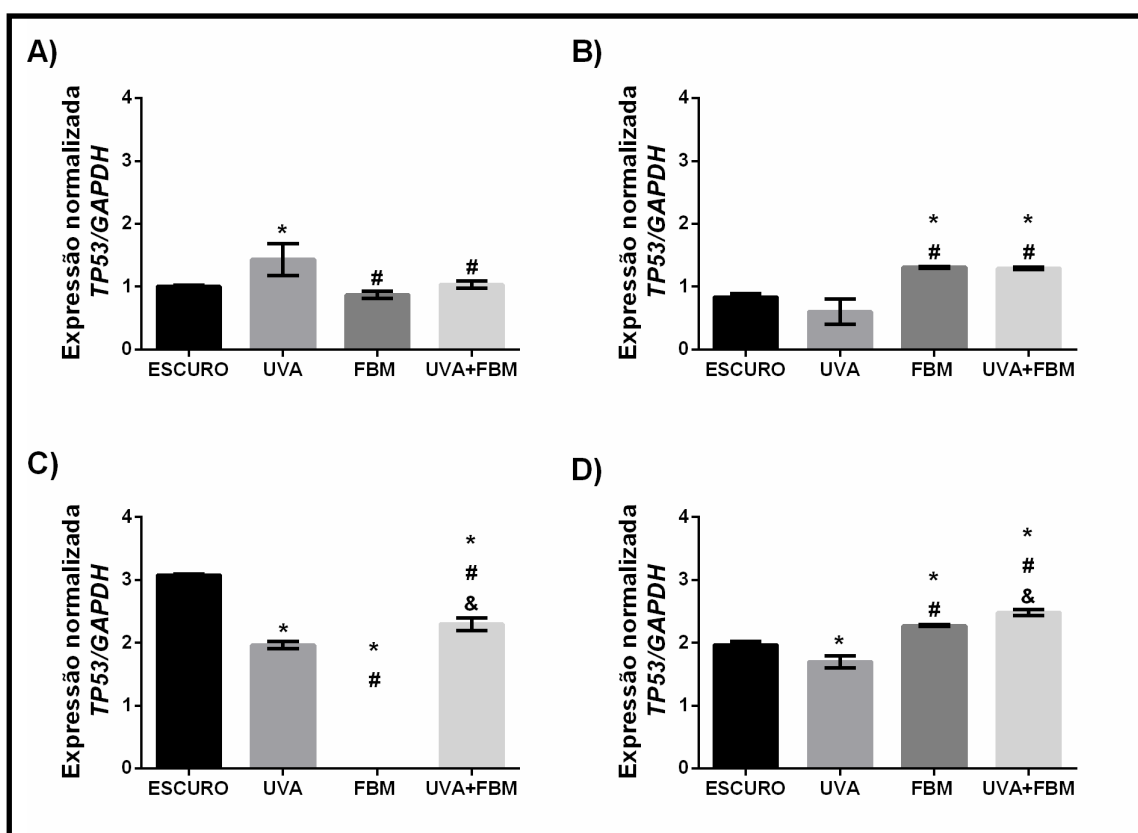


Figura 18: Expressão relativa do mRNA de TP53 em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p < 0.05 em relação a FBM.

4.4.3 BRCA1

A determinação da expressão do gene *BRCA1* nas amostras que não receberam o tratamento com extrato (Figura 19 painel A) mostrou que o grupo

UVA apresentou expressão aumentada em relação ao grupo escuro quanto os grupos FBM (FBM e UVA+FBM). As amostras tratadas com o veículo hidroglicólico (Painel B) mostraram expressão aumentada do gene *BRCA1* nos grupos que receberam FBM (FBM e UVA+FBM, no painel B) em relação aos demais grupos (Escuro e UVA). Nas amostras tratadas com o extrato de camomila (Painel C) os grupos UVA e FBM causaram diminuição da expressão do *BRCA1* em relação ao grupo escuro, enquanto a combinação da FBM com extrato de camomila após a exposição ao UVA restabeleceu a expressão para valores similares ao grupo escuro. Nos grupos tratados com extrato de Figo (Painel D) somente o grupo em que foi feita a associação da FBM com extrato de Figo após a exposição ao UVA (UVA+FBM) apresentou expressão aumentada do *BRCA1* em relação aos demais grupos.

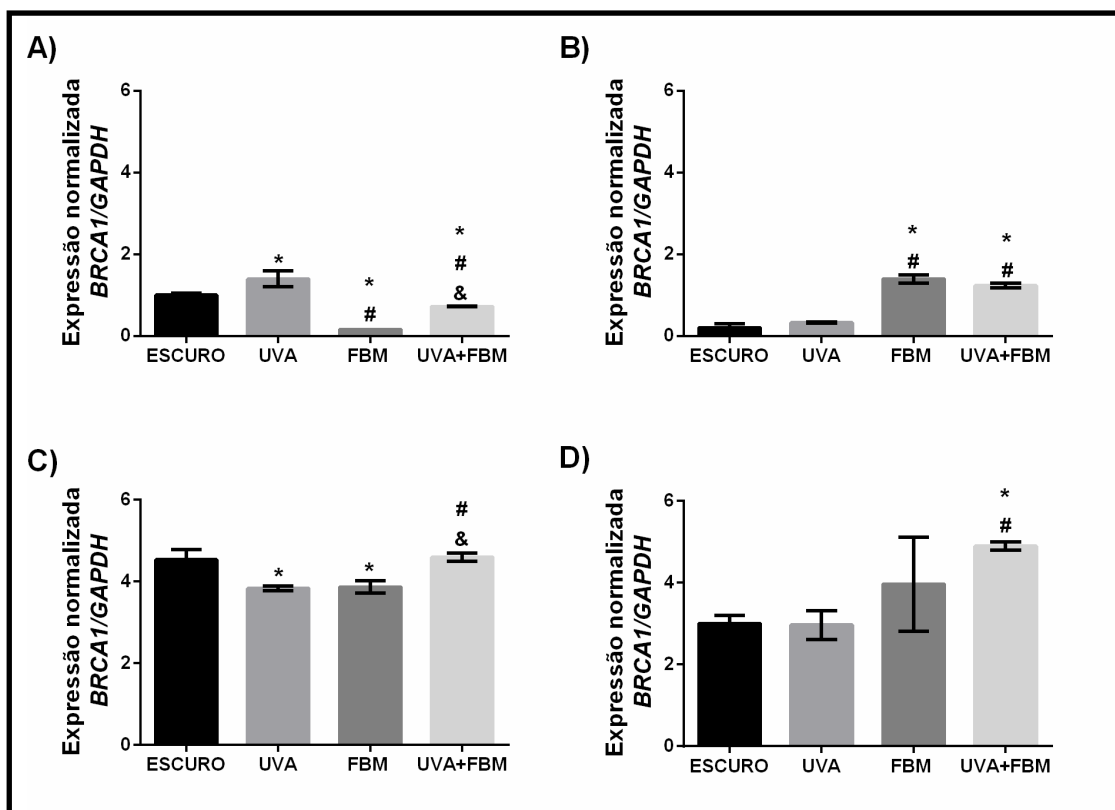


Figura 19: Expressão relativa do mRNA de *BRCA1* em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p < 0.05 em relação a FBM.

O aumento da expressão de BRCA1 após a exposição ao UVA está relacionado à ativação do mecanismo de reparo ao dano causado ao DNA, uma vez que os produtos deste gene estão associados ao reparo de DNA, controle transcricional, crescimento celular e apoptose¹⁰¹. O BRCA1 tem papel importante no reparo de lesões de DNA desencadeados por UVC, sendo recrutado durante a fase S/G2 do ciclo celular de forma independente da via de NER¹⁰², por outro lado, não existem relatos na literatura acerca do efeito da FBM na expressão do BRCA1. Dilenburg e colaboradores mostraram que a aplicação de 4J/cm² de FBM leva ao aumento de EROs em uma quantidade segura, sem induzir dano em DNA uma vez que não observou influxo nuclear da proteína de reparo BRCA1¹⁰³.

Aos extratos de camomila e figo apresentaram expressão aumentada de mRNA de BRCA1 em relação ao grupo controle. Acredita-se que este efeito foi observado devido à presença de flavonoides. Sabe-se que a quercetina aumenta a expressão de BRCA1¹⁰⁴ e que quercetina e luteolina são os principais flavonoides presentes no extrato de Figo¹⁰⁵. Por outro, a associação dos extratos com fotobiomodulação foi capaz de estimular o efeito protetor, por meio da ativação do mecanismo de reparo por recombinação, atingindo níveis de expressão de mRNA de BRCA1 próximos ou maiores que o controle.

4.4.4 ERCC1

As proteínas codificadas pelos genes ERCC2 e ERCC1 estão envolvidas no processo de desnivelamento do DNA e incisão em uma molécula de DNA contendo um sítio de oxidação, respectivamente³⁹. Os dados referentes à expressão do gene ERCC1 também estão apresentados com normalização relativa ao grupo controle escuro e os dados estão apresentados na **Figura 20**. O tratamento na ausência de extratos (painel A) mostrou que os grupos FBM e FBM+UVA mostraram redução da expressão do *ERCC1* em relação ao grupo CT e ao grupo UVA, enquanto no grupo UVA+FBM apresentou expressão aumentada de *ERCC1* em relação ao grupo UVA.

No painel B, em que todos os grupos receberam tratamento com o veículo HG foi observado aumento na expressão de *ERCC1* nos tratamentos com FBM (FBM isolado e UVA+FBM) em relação ao grupo CT e UVA. No painel C, em que as amostras foram tratadas com extrato de camomila todos os grupos mostraram

redução na expressão gênica relativa ao *ERCC1* em relação ao grupo controle, porém os grupos combinados com FBM (FBM isolado e UVA+FBM) foi observado aumento em relação ao grupo UVA. No painel D, em que as amostras foram tratadas com o extrato de Figo, foi observado redução na expressão do gene *ERCC1* no grupo UVA em relação ao grupo controle escuro, porém nos grupos combinados com FBM (FBM isolado e UVA+FBM) foi observado aumento em relação ao grupo UVA. O grupo UVA+FBM apresentou expressão aumentada em relação ao grupo controle escuro e ao grupo FBM.

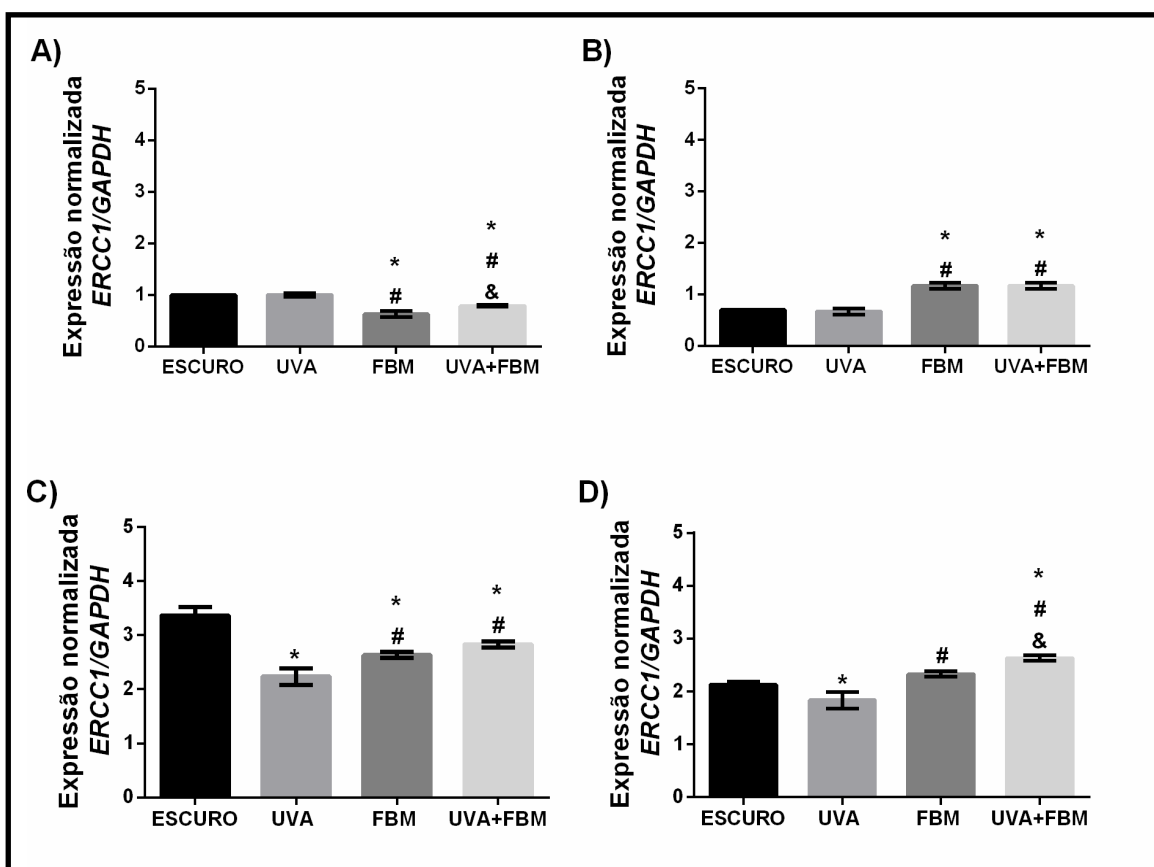


Figura 20: Expressão relativa do mRNA de *ERCC1* em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, #p < 0.05 em relação ao UVA e &p < 0.05 em relação a FBM.

Karthikeyan e colaboradores expuseram células HaCat à 10J/cm² UVA e observaram redução na expressão proteica de ERCC1 e DBB2⁹⁸. Por outro lado, Song e colaboradores verificaram o aumento na expressão de ERCC1 por

exposição ao UVB ¹⁰⁶. Sabe-se que a exposição ao UVB está associada à produção de dímeros de pirimidina que são removidos via mecanismo NER no qual a ERCC1 atua. A ausência de alterações na expressão de ERCC1 após a exposição ao UV observada neste estudo corrobora com os dados apresentados por Song e colaboradores em pele de camundongos adultos e queratinócitos de camundongo em cultura ¹⁰⁶. Acredita-se que este gene já estava expresso em níveis máximos e a exposição ao UV não altera a sua expressão. Por outro lado, é possível que a radiação UVA não ative o mecanismo de NER por este motivo não houve o aumento da expressão de mRNA de ERCC1.

Em termos da FBM, Sergio e colaboradores não observaram alteração no mRNA de ERCC1 em peles expostas ao laser vermelho, porém a exposição radiante utilizada foi muito maior que neste estudo (25, 50 e 100 J/cm² versus 9 J/cm²) ³⁹. Por outro lado, a expressão de ERCC1 após exposição da pele à laser infravermelho (25, 50 e 100 J/cm²) diminuiu ³⁹.

Pathania e colaboradores mostraram que o recrutamento de ERCC1 é reduzido quando há diminuição de BRCA1 ¹⁰². É possível verificar que nos grupos que apresentaram redução na expressão de mRNA de BRCA1 também apresentaram menor expressão de ERCC1.

Os extratos de camomila e figo aumentaram a expressão de mRNA de ERCC1, indicando que o tratamento com estes extratos tem papel protetor estando ativo o mecanismo de NER. Quando os extratos de figo e camomila foram utilizados após a exposição UVA, houve redução na expressão de ERCC1. As EROs formadas durante a exposição ao UVA foram neutralizadas pelos compostos polifenólicos dos extratos, de forma que o potencial antioxidante que aumenta a expressão gênica estava diminuído. Por fim, a associação dos extratos com fotobiomodulação foi capaz de estimular o efeito protetor, atingindo níveis de expressão de mRNA de ERCC1 próximos ou maiores que o controle.

4.4.5 ERCC2

Os resultados de expressão gênica do ERCC2 relativa ao grupo controle escuro estão apresentados na **Figura 21**. Na ausência de extratos (painel A) nota-se que houve redução na expressão do gene *ERCC2* nos grupos que receberam FBM (FBM e FBM+UVA) em relação ao grupo CT e ao grupo UVA,

sendo que a expressão do *ERCC2* foi aumentada no grupo UVA+FBM apresentou em relação ao grupo FBM.

Assim como observado para o gene *ERCC1*, foi observado aumento na expressão de *ERCC2* nos tratamentos com FBM (FBM isolado e UVA+FBM) em relação ao grupo CT e UVA quando as células foram incubadas com o veículo HG (painel B). Comparando os dois grupos que receberam FBM, a expressão do *ERCC2* foi aumentada no grupo FBM apresentou em relação ao grupo UVA+FBM.

No painel C, em que as amostras foram tratadas com extrato de camomila somente o grupo UVA+FBM apresentou redução na expressão gênica relativa ao *ERCC2* em relação ao grupo controle. No painel D, em que as amostras foram tratadas com o extrato de Figo, foi observado aumento na expressão do gene *ERCC2* nos grupos combinados com FBM (FBM isolado e UVA+FBM), porém o grupo UVA+FBM apresentou expressão aumentada em relação ao grupo FBM.

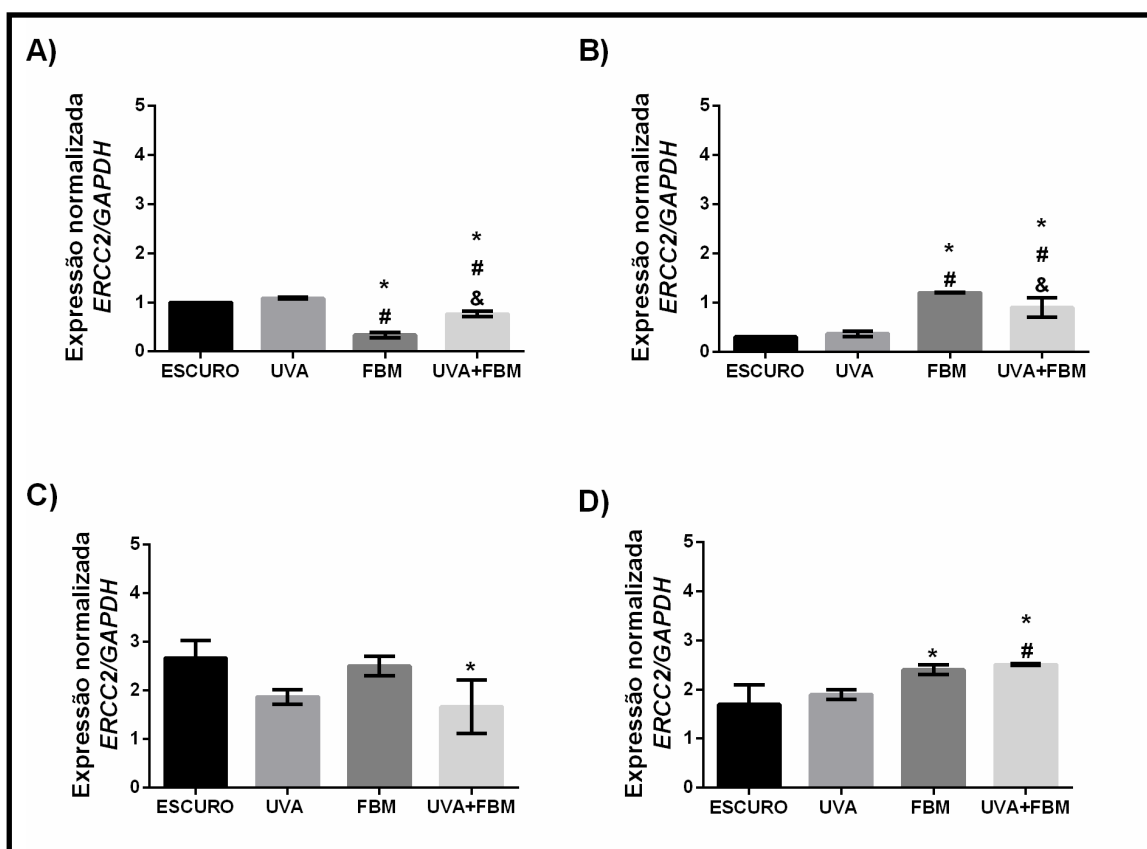


Figura 21: Expressão relativa do mRNA de *ERCC2* em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização.

Dados apresentados como média \pm desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, #p < 0.05 em relação ao UVA e &p< 0.05 em relação a FBM.

Uma vez que ERCC2 atua no processo de NER antes de ERCC1, normalmente os dados de expressão de ERCC1 são similares aos do ERCC2, confirmando a ativação (ou não) do mecanismo NER. Assim como observado para ERCC1, a radiação UVA não alterou a expressão de ERCC2 provavelmente porque a radiação UVA não ativa o mecanismo de NER. Tanto quando utilizada sozinha quanto utilizada após a exposição ao UVA, a FBM reduziu a expressão de ERCC2. Já a FBM reduziu a expressão do mRNA de ERCC2 como observado por Sergio e colaboradores em amostras de pele irradiadas com laser infravermelho 880nm e (25, 50, e 100 J/cm²)³⁹.

Os extratos não causaram alteração em termos da expressão de ERCC2, exceto no grupo em que foi feita a associação com FBM após a exposição à UVA. Neste caso, a resposta induzida pelo extrato de camomila (diminuição da expressão de mRNA de ERCC2) foi oposta à resposta observada para o extrato de Figo, provavelmente devido aos diferentes conteúdos polifenólicos destes extratos.

4.4.6 DBB1

Realizou-se a análise da expressão do gene DBB1 para as amostras e os resultados estão apresentados na **Figura 22**. Os dados de todas as amostras foram normalizados em função do controle escuro. No painel A estão apresentadas as amostras que não receberam tratamento com extratos. É possível verificar que somente a FBM mostrou redução significativa em relação aos demais grupos (escuro, UVA e UVA+FBM). Quando foi realizado tratamento das células com o veículo hidroglicólico pós UVA (painel B), verificou-se diminuição da expressão do *DBB1*, enquanto a associação de veículo com FBM, bem como, a associação de veículo com FBM após exposição ao UVA resultaram em aumento da expressão do gene *DBB1* em relação aos grupos escuro e UVA.

Quando o foi realizada associação entre FBM e extrato de camomila (Painel C) todos os grupos apresentaram redução na expressão da *DBB1* em relação ao grupo escuro. Esta redução foi mais expressiva quando foi realizada

a associação de camomila e FBM após a exposição UVA (UVA+FBM) e menor no grupo em que a FBM foi realizada após o tratamento com camomila. Nos grupos tratados com extrato de Figo (Painel D) somente o grupo das terapias combinadas após exposição ao UVA (UVA+FBM) apresentou expressão aumentada do *DBB1* em relação aos demais grupos.

Uma vez que *DBB1* está envolvida no mecanismo de NER, que conforme visto anteriormente não é ativado por UVA, os resultados obtidos são bastante similares àqueles observados para *ERCC1* e *ERCC2*. Neste sentido, a expressão do mRNA de *DBB1* não é alterada após a irradiação com UVA. Por outro lado, já foi relatado que 10J/cm² de UVB promove a translocação de *DBB1* para o núcleo, ativando o mecanismo de reparo de DNA ³⁸.

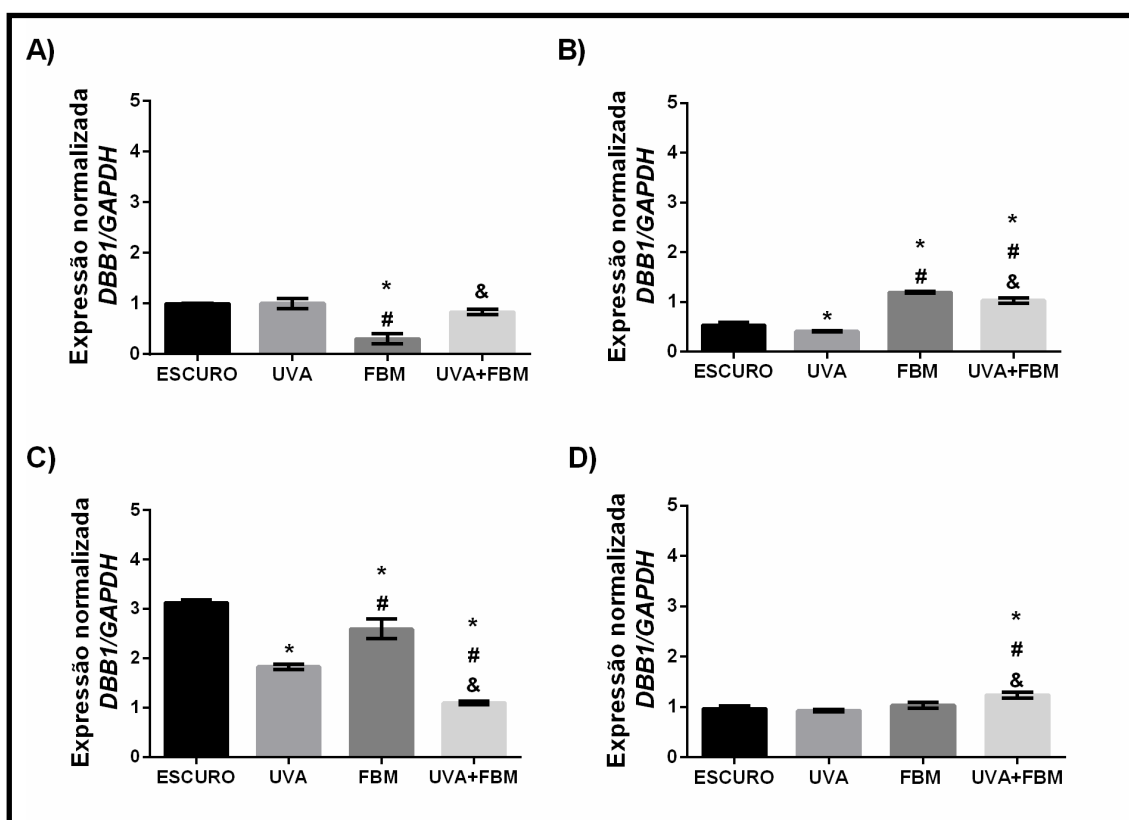


Figura 22: Expressão relativa do mRNA de *DBB1* em queratinócitos humanos após a exposição à radiação ultravioleta A e tratados com fotobiomodulação (FBM) e extratos de camomila e figo a 0,05% por 24 horas em DMEM 1 % SFB. Parâmetros UVA (366 ±10 nm, 2,5 mW/cm², 13,5 J/cm²), FBM (640nm ± 12.5nm, 2.6 mW/cm², 1J/cm²). A) controle, B) veículo HG, C) camomila e D) figo. GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=6 por grupo, * p < 0.05 em relação ao escuro, # p < 0.05 em relação ao UVA e &p < 0.05 em relação a FBM.

5. CONCLUSÕES

A exposição à radiação UVA (9J/cm²)

- ✓ Reduz a capacidade antioxidante das células reduzindo a expressão de enzimas antioxidantes como a catalase.
- ✓ Causa danos oxidativos no DNA ativando a via de reparo por excisão de bases (aumento da expressão de OGG1).
- ✓ Além disso, gera fotoprodutos que ativam a via de reparo por recombinação homóloga (aumento da expressão de BRCA1).
- ✓ Sem indícios da ativação da via de excisão de nucleotídeos (sem alteração na expressão de DBB1, ERCC1 e ERCC2).
- ✓ O aumento da expressão de TP53 após à exposição UVA também indica a ativação do processo de reparo de DNA.

A fotobiomodulação (FBM) (1J/cm²)

Utilizada isoladamente, sem exposição prévia à radiação UVA

- ✓ Não alterou a expressão de enzimas antioxidantes (Catalase).
- ✓ Reduziu a expressão do mRNA de todos os genes associados aos mecanismos de reparo de DNA por excisão de bases (OGG1), reparo por recombinação homóloga (BRCA1) e reparo por excisão de nucleotídeos (DBB1, ERCC1 e ERCC2).
- ✓ Além disso, não alterou a expressão de TP53.

Extrato camomila

- ✓ Aumentou a expressão de todos os genes em relação ao controle escuro sem extrato sugerindo seu potencial como antioxidante protetor.
- ✓ Quando as células foram expostas ao ultravioleta e pós tratadas com camomila, todos os genes tiveram a expressão do mRNA reduzida, mostrando o efeito deletério da radiação UVA e ausência de efeito positivo da camomila.
 - O efeito da associação entre FBM e extrato de camomila, sem exposição à radiação UVA foi variável dependendo do gene estudado.
- ✓ Não houve alteração na expressão de mRNA da catalase e ERCC2.

- ✓ Houve pequena redução na expressão dos genes ERCC1 e DBB1
- ✓ redução de OGG1 e BRCA1 na mesma extensão que houve no UVA.
- ✓ A redução expressiva em p53.
 - A combinação entre FBM e extrato de camomila, após exposição à radiação UVA foi variável dependendo do gene estudado.
- ✓ Em relação ao grupo UVA os genes CAT, BRCA1, ERCC1 e TP53 tiveram sua expressão aumentada,
- ✓ DBB1 e ERCC2 tiveram a expressão diminuída
- ✓ enquanto OGG1 não teve alteração.

Extrato Figo

- ✓ O extrato de figo não altera a expressão de mRNA da catalase em nenhum dos processos de irradiação.
- ✓ Todos os genes associados aos mecanismos de reparo de DNA (CAT, BRCA1, OGG1, DBB1, TP53, ERCC1 e ERCC2) tiveram a expressão de mRNA aumentada quando foi realizada a combinação entre FBM e extrato de figo após exposição à radiação UVA.
- ✓ Algum dos componentes do extrato de figo, diferencia sua ação do extrato de camomila e faz com que sua associação com fotobiomodulação seja capaz de estimular o efeito protetor, atingindo níveis de expressão de mRNA dos diversos genes maiores que o grupo UVA.

Concluindo o extrato da camomila não se mostrou eficiente após expostas ao UVA, porem quando associado a FBM foi variável dependendo do gene estudado.

O figo não se mostrou eficiente após a exposição UVA, porem quando associado a exposição com a fotobiomodulação se mostrou eficiente, mostrando que a FBM associado com o figo mostrando um efeito benéfico, quando administrado o tratamento completo.

6. REFERÊNCIAS

1. Virchow RLK. Cellular Pathology: As Based Upon Physiological and Pathological Histology. 1860;2 ed:6.
2. Marionnet C, Tricaud C, Bernerd F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: Spectral characterization, effects on skin and photoprotection. *Int J Mol Sci.* 2015;16(1):68–90.
3. Hwang K-A, Yi B-R, Choi K-C. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations. *Lab Anim Res.* 2011;27(1):1–8.
4. JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J. *Histologia básica.* 2008.
5. Weller R, Hunter J, Savin J, Dahl M. Psoriasis. In: *Clinical Dermatology.* 2013. p. 54–70.
6. Neill US. Skin care in the aging female: myths and truths. *J Clin Invest.* 2012;122(2):473–7.
7. Machado Rocha Ribeiro S, Humberto de Queiroz J, do Carmo Gouveia Peluzio M, Maria Brunoro Costa N, Luiz Pinto da Matta S, Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz M. A formacao e os efeitos das especies reativas de oxigenio no meio biologico. *Biosci J.* 2005;21(3):133–49.
8. Yaar M, Gilchrist BA. Photoageing: Mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol.* 2007;157(5):874–87.
9. Vieira ACQ de M, Medeiros L de A, Palácio SB, Lyra MAM de, Alves LDS, Rolim LA, et al. Fatores de crescimento: uma nova abordagem cosmeceutica para o cuidado antienvhecimento. *Rev Bras Farm.* 2011;92(3):80–9.
10. Sliney DH. Radiometric quantities and units used in photobiology and photochemistry: recommendations of the Commission Internationale de L'Eclairage (International Commission on Illumination). *Photochem Photobiol.* 2007;83(2):425–32.
11. Gonzalez S, Gilaberte Y, Philips N. Mechanistic insights in the use of a Polypodium leucotomos extract as an oral and topical photoprotective agent. *Photochem Photobiol Sci.* 2010;9(4):559–63.
12. Delgado JA, Quesada I, Montañó LM, Anasagasti L. Safety of UV radiation

- for autofluorescence diagnosis of skin cancer. *Rev Mex Fis.* 2006;52(1 SUPPL.):78–83.
13. Silva, Andreza Amaral da; Gonçalves RC. Reactive oxygen species and the respiratory tract diseases of large animals Andreza. *Cienc Rural.* 2010;40(4):994–1002.
 14. Barreiros, André L B S E a. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006;29(1):113–23.
 15. Santos MP dos, Oliveira NRF de. Ação das vitaminas antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. *Discip Sci.* 2014;15(1):75–89.
 16. A.L.A. FERREIRA LSM. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras.* 1997;43(1):61–8.
 17. Cohen M V. Free Radicals in Ischemic and Reperfusion Myocardial Injury: Is this the Time for Clinical Trials? *Annals Intern Med.* 1989;111:918–31.
 18. Guaratini T, Medeiros MHG. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: Uso e avaliação da sua eficácia. *Quim Nova.* 2007;30(1):206–13.
 19. Pietta PG, Pietta P. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035–42.
 20. Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(1):1–19.
 21. Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma WJ, Schneider A, Razi-Wolf Z, et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B-Biology.* 2001;63(1–3):41–51.
 22. Balogh TS, Pedriali CA, Kaneko TM. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na. *An Bras Dermatol.* 2011;86(4):732–42.
 23. Müller A V, Gonçalves MR, Ramos LD, Polo AS, Frin KP. The importance of the 3MLCT excited state of Ru(II), Re(I) and Ir(III) compounds on development of photosensors, LEDs and CO₂ photoreduction. *Quim.* 2017;40(2):200–13.
 24. Andrade ER, Seneda MM, Alfieri AA. Consequences of production of reactive oxygen species in reproduction and main antioxidant mechanisms. *Rev Bras Reprodu Anim.* 2010;34(2):79–85.
 25. Resende ML V, Salgado SML, Chaves ZM. Espécies Ativas de Oxigênio

- na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. *Fitopatol bras.* 2003;28(2):123–30.
26. Andrade KDPMM. Ação dos antioxidantes tópicos no combate ao envelhecimento cutâneo. :1–13.
 27. Scotti L, Scotti MT, Cardoso C, Pauletti P, Castro-gamboa I, Bolzani S, et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Rev Bras ciencias Farm.* 2007;43(2):153–66.
 28. Koury JC, Donangelo CM, Janeiro R De. Zinc, oxidative stress and physical activity. *Rev Nutr.* 2003;16(4):433–41.
 29. Júnior LR, Höehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associada a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim Nova.* 2001;24(1):112–9.
 30. Bagatin E. Mecanismos do envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmecêuticos. *Rev Bras Med.* 2018;1–5.
 31. Andrade-Lima LC de. Resposta a danos no DNA após exposição à luz ultravioleta: apagando o fogo antes do incêndio celular. *Rev da Biol.* 2015;14(1):6–16.
 32. Nepomuceno LL, Et.al. Mecanismo de reparo aos danos no DNA nos pontos de checagem do ciclo celular. *Enciclopédia Bioesfera.* 2017;14(25):881–902.
 33. Kim IY, He YY. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. *Genes Dis.* 2014;1(2):188–98.
 34. Radak Z, Boldogh I. 8-Oxo-7 , 8-dihydroguanine: Links to gene expression , aging , and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(4):587–96.
 35. Cadet J, Mouret S, Ravanat J-L, Douki T. Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactions†. *Photochem Photobiol.* 2012 Sep;88(5):1048–65.
 36. Berra CM, Menck CFM. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quim Nov.* 2006;29(6):1340–4.
 37. Scott TL, Suganya R, Wicker CA, Izumi T. Repair of oxidative DNA damage and cancer - recent progress in DNA base excision re- pair. *Antioxidants*

- amp; redox Signal. 2014;20(4):708–26.
38. Iovine B, Nino M, Irace C, Monfrecola MABG. Ultraviolet B and A irradiation induces fibromodulin expression in human fibroblasts in vitro. *Biochimie*. 2009;91(3):364–72.
 39. Sergio LPS, Campos VMA, Vicentini SC, Mencialha AL, Paoli F De, Fonseca AS. Low-intensity red and infrared lasers affect mRNA expression of DNA nucleotide excision repair in skin and muscle tissue. *Laser Med Sci*. 2016;31:429–35.
 40. L.Schaeffer, V.Moncollin, R.Roy, A.Staub, M.Mezzinal, A.Sarasin, et al. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class 11 BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO*. 1994;13(10):2388–92.
 41. André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Ph D, Pirker R, et al. DNA Repair by ERCC1 in Non–Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006;355(10):983–91.
 42. Carr AM, Lambert S. Replication Stress-Induced Genome Instability: The Dark Side of Replication Maintenance by Homologous Recombination. *J Mol Biol*. 2013;425(23):4733–44.
 43. Davis AJ, Chen DJ. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*. 2013;2(3):130–43.
 44. Coelho AS, Santos MA da S, Piovesan RICCF, Furini LARLDMAA da CF. Hereditary predisposition to breast cancer and its relation to the BRCA1 and BRCA2 genes: literature review Aline. *RBAC*. 2018;50(1):17–21.
 45. Li L. BRCA1 Forks Over New Roles in DNA-Damage Response – Before and Beyond the Breaks. *Mol Cell*. 2011;44(2):174–6.
 46. Fu L, Minden MD, Benchimol S. Translational regulation of human p53 gene expression. *EMBO J*. 1996;15(16):4392–401.
 47. Moriwaki S, Takahashi Y. Photoaging and DNA repair. 2008;
 48. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol*. 2012;4(3):308–19.
 49. Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL, Mastrofrancesco B, et al. Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol*. 2005;174(4):2265–72.
 50. Simo A, Kawal N, Paliyath G, Bakovic M. Botanical Antioxidants for Skin Health in the World of Cosmeceuticals. *Int J Adv Nutr Heal Sci*.

- 2014;2(1):67–88.
51. RR D, BM L, E H, K K, BD S, M C, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*. 2013;504:277–81.
 52. Matsui MS, Hsia A, Miller JD, Hanneman K, Scull H, Cooper KD, et al. Non-sunscreen photoprotection: Antioxidants add value to a sunscreen. *J Investig Dermatology Symp Proc*. 2009;14(1):56–9.
 53. Silva MLC, Costa RS, Santana A dos S, Koblitiz MGB. Compostos fenólicos , carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semin Ciências Agrárias*. 2010;31(3):669–82.
 54. Albuquerque ACL de, Pereira M do SV, Pereira JV, Costa MRM, Pereira LF, Higino JS. Antimicrobial Effect of *Matricaria recutita* Linn . (Chamomile) Extract against Dental Bio fi lm Microorganisms. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2010;10(3):451–5.
 55. Hartmann KC, Onofre SB. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA CAMO- ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS OF CHAMOMILE (Matri- caria chamomilla L .). *Rev Saúde e Pesqui*. 2010;3(3):279–84.
 56. Falkowski GJS, Jacomassi E, Takemura OS. Quality and authenticity of samples of chamomile tea (*Matricaria recutita* L . – Asteraceae). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(1):64–72.
 57. Solomon A, Golubowicz S, Yablowicz Z, Grosaman S, Bergman M, Gottlieb HE, et al. Antioxidant Activities and Anthocyanin Content of Fresh Fruits of Common Fig (*Ficus carica* L .). *J Agric Food Chem*. 2006;54(20):7717–23.
 58. Velloso JCR, Barbosa V de F, Oliveira OMM de F. Pesquisa De Produtos Naturais : Plantas E Radicais Livres. *Rev Eletrônica Farmácia*. 2007;5(2):119–30.
 59. Thornfeldt C. Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future. *Dermatol Surg*. 2005;31:873–880.
 60. Kasai K, Yoshimura M, Koga T, Arii M, Kawasaki S. Effects of oral administration of ellagic acid-rich pomegranate extract on ultraviolet-induced pigmentation in the human skin. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2006;52:383–8.
 61. Korac RR, Khambholja KM. Potential of herbs in skin protection from

- ultraviolet radiation. *Pharmacogn Rev.* 2011;5(10):164–73.
62. Kim HK. Protective effect of garlic on cellular senescence in UVB-exposed HaCaT human keratinocytes. *Nutrients.* 2016;8(8):464.
 63. Decean H, Fisher-Fodor E, Tatamir C, Perde-Schrepler M, Somfelean L, Burz C, et al. Vitis vinifera seeds extract for the modulation of cytosolic factor BAX- α and NF-KB involved in UVB- induced oxidative stress and apoptosis of human skin cells. *Clujul Med.* 2016;89(1):72–81.
 64. Silva EM, Gomes SP, Ulbrich LM, Giovanini AF. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *Rev Sul-Bras Odontol.* 2007;4:29-35.
 65. Catão MHCV. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral.* 2004;3:214-8.
 66. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B DB. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2003;30:353–8.
 67. Bourguignon AMF, Feitosa RCA, Beltrao GC, Pagnoncelli MR. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. 2005;46:37-43.
 68. Eells J, Wong-riley MT, Verhoeve J, Henry M; Buchman EV, Kane MP, Gould LJ, Das R, Jett M, Hodgson BD, Margolis D, Whelan HT. Mitochondrial signal introduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion.* 2004;4, 559–567.
 69. Wong-riley MT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, Kane M, Whelan HT. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c-oxidase. *J Biol Chem.* 2005;280:4761–4771.
 70. Oguz O. Treatment with LEDs: A New Perspective in phototherapy. *J Turk Acad Dermatol.* 2009;3(1):93101.
 71. Carniol PJ, Farley S, Friedman A. Long-pulse 532-nm diode laser for nonablative facial skin rejuvenation. *Arch Facial Plast Surg.* 2003;5(6):511–3.
 72. Lu Y, Lou Y, Yen P, Mitchell D, Huang M CA. Time course for early adaptive responses to Ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice. *Cancer*

- Res. 1999;59:4591–4602.
73. Clancy S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nat Educ.* 2008;1(1):103.
 74. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;195(3):298–308.
 75. Carolina A, Ferolla J, Rodrigues CJ, Cucé LC. Análise imunohistoquímica da pele fotoenvelhecida após tratamento com o ácido 5 delta aminolevulínico. *Surg Cosmet Dermatology.* 2012;4(1):10–6.
 76. Martins WK, Severino D, Souza C, Stolf BS, Baptista MS. Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. *Biotechnol J.* 2013 Jun;8(6):730–7.
 77. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2delta delta CT Method. *Methods.* 2001;408:402–8.
 78. Silva ES, Machado GB, Lino-dos-Santos-Franco A, Pavani C. Combination of Natural Extracts and Photobiomodulation in Keratinocytes Subjected to UVA Radiation. *Photochem Photobiol.* 2018;
 79. Huynh T, Chan K, Piva T. Effect of ultraviolet radiation on the expression of pp38MAPK and furin in human keratinocyte-derived cell lines. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2009;25(1):20–9.
 80. TIAN YS, KIM N-H, LEE A-Y. Antiphotaging Effects of Light-Emitting Diode Irradiation on Narrow-Band Ultraviolet B-Exposed Cultured Human Skin Cells. *Dermatologic Surgery.* 2012;38(10):1695–703.
 81. Stepanenko AA, Dmitrenko V V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015;574(2):193–203.
 82. Angius F, Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. *Toxicol Vitro.* 2015;29(2):314–9.
 83. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol.* 2018;94(1):199–212.
 84. Pavani C, Francisco CML, Gobo NRS, de Oliveira KT, Baptista MS. Improved photodynamic activity of a dual phthalocyanine–ALA photosensitizer. *New J Chem.* 2016;40(11):9666–71.
 85. Francisco CML, Gonçalves JMLA, Brum BS, Santos TPC, Lino-Dos-

- Santos-Franco A, Silva DFT, et al. The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. *New J Chem.* 2017;41(23):14438–43.
86. Chiarelli-Neto O, Pavani C, S. Ferreira A, Uchoa AF, Severino D, Baptista MS. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(6).
 87. Tyrrell RM. Modulation of gene expression by the oxidative stress generated in human skin cells by UVA radiation and the restoration of redox homeostasis. *Photochem Photobiol Sci.* 2011/10/20. 2012;11(1):135–47.
 88. Biology C. Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: The role of ferritin. 1999;96(June):6751–6.
 89. Macedo RS, Leal MP, Braga TT, Barioni ÉD, Duro SDO, Carolina A, et al. Photobiomodulation Therapy Decreases Oxidative Stress in the Lung Tissue after Formaldehyde Exposure: Role of Oxidant/Antioxidant Enzymes. *Mediators Inflamm.* 2016;2016.
 90. Cerqueira FM, Medeiros MHG de, Augusto O. Dietetic Antioxidants: The Controversies and perspectives. *Quim Nova.* 2007;30(2):441–9.
 91. Tonolli PN, Chiarelli-Neto O, Santacruz-Perez C, Junqueira HC, Watanabe IS, Ravagnani FG, et al. Lipofuscin Generated by UVA Turns Keratinocytes Photosensitive to Visible Light. *J Invest Dermatol.* 2017;137(11):2447–50.
 92. Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *PNAS.* 2006;103(37):13765–70.
 93. Dahle J, Brunborg G, Svendsrud DH, Stokke T, Kvama E. Overexpression of human OGG1 in mammalian cells decreases ultraviolet A induced mutagenesis. *Cancer Lett.* 2008;267:18–25.
 94. Marchi T De, Junior ECPL, Bortoli C, Lopes-Martins SSTRÁB, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance , skeletal muscle status , and oxidative stress. *Laser Med Sci.* 2012;27:231–6.
 95. Oliveira HA De, Antonio EL, Arsa G, Santana ET, Silva FA, Júnior DA, et al. Photobiomodulation Leads to Reduced Oxidative Stress in Rats Submitted to High-Intensity Resistive Exercise. *Oxid Med Cell Longev.*

- 2018;2018:1–9.
96. Lima LC de A. DNA damage response following UV-light exposure: putting out the fire before cell collapse. *Rev da Biol.* 2015;14(1):6–16.
 97. Almeida LG De, Philippe L, Paoli F De, Mencialha AL, Souza A De. TP53 and ATM mRNA expression in skin and skeletal muscle after low-level laser exposure. *J Cosmet Laser Ther* [Internet]. 2017;19(4):1476–4180. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14764172.2017.1293829>
 98. Karthikeyan R, Kanimozhi G, Prasad NR, Agilan B, Ganesan M, Srithar G. Alpha pinene modulates UVA-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in human skin epidermal keratinocytes. *Life Sciences. Elsevier Inc*; 2018.
 99. Sharma P, Montes MK, Amena DO, Mcclees SF, Das T, Elmets CA, et al. Tea polyphenols for the prevention of UVB- • induced skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2018;34:50–9.
 100. Fonseca AS, Magalhães LAG, Mencialha AL, Ferreira-Machado SC, Geller M, Paoli F. Low-intensity red and infrared lasers on XPA and XPC gene expression. *Laser Phys Lett.* 2014;11(9):1612–2011.
 101. Shang H, Chang C, Chou Y, Yeh M. Curcumin causes DNA damage and affects associated protein expression in HeLa human cervical cancer cells. 2016;2207–15.
 102. Pathania S, Nguyen J, Hill SJ, Scully R, Adelmant GO, Marto JA, et al. BRCA1 Is Required for Postreplication Repair after UV-Induced DNA Damage. *Mol Cell.* 2011;44(2):235–51.
 103. Dillenburg CS, Almeida LO, Martins MD, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy triggers the production of reactive oxygen species in oral epithelial cells without inducing DNA damage. *J Biomed Opt.* 2014;19(4):048002.
 104. Kundur S, Prayag A, Selvakumar P, Nguyen H, McKee L, Cruz C, et al. Synergistic anticancer action of quercetin and curcumin against triple - negative breast cancer cell lines. *J Cell Physiol.* 2018;1–16.
 105. Vaya J, Mahmood S. Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L .), carob (*Ceratonia siliqua* L .) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L .). *BioFactors.* 2006;28:169–75.
 106. Song L, Winter AG, Selfridge J, Melton DW. A novel transcript for DNA

repair gene Ercc1 in mouse skin. Transgenic Res. 2011;20:109–22.

ANEXOS

ANEXO A. Artigo publicado em colaboração

Photochemistry and Photobiology, 2018, **: *-*

Combination of Natural Extracts and Photobiomodulation in Keratinocytes Subjected to UVA Radiation

Elaineides Santos Silva, Gabriela Benedito Machado, Adriana Lino-dos-Santos-Franco and Christiane Pavani*

Post Graduate Program of Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho-UNINOVE, São Paulo, SP, Brazil

Received 18 June 2018, accepted 10 September 2018, DOI: 10.1111/php.13026

ABSTRACT

Natural extracts (NE) with antioxidant properties can minimize the effects of photoaging. Photobiomodulation (PBM) has proven to be a useful tool for the modulation of cell metabolism. Here, we investigate the associations of antioxidants with PBM with the aim of promoting skin rejuvenation. We began with standardization of the experimental protocol. Extracts of chamomile, rosemary, blueberry, green tea, figs, pomegranate and nutwood were tested. A custom irradiation system (366 ± 10 nm) was used to simulate sun exposure. A light emitting diode system (640 ± 12.5 nm) was used for PBM. Viability assessments were performed by the (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) MTT assay method. Based on the results, radiant exposure to UVA was defined as 9 and 1 J cm^{-2} for PBM. Extract concentrations were established on the basis of dark toxicities, which ranged from 0.01% to 0.3%. The data show that PBM is a promising therapy to restore keratinocytes after UVA damage; however, the detailed mechanism and effects require further exploration. Moreover, although the combination of PBM with NE may be a useful strategy, the choice of a NE is challenging, since the working concentration and other properties, such as photosensitivity, may bring about unwanted results.

INTRODUCTION

The skin has several functions, such as protection, controlling temperature, absorbing ultraviolet rays and eliminating chemical substances, among many others. Skin changes that are generally associated with early aging originate from exposure to ultraviolet (UV) radiation, especially type A (UVA; 315–400 nm), which penetrates deeply, reaching the basal layers of the epidermis (1). However, it has been shown that other wavelengths can also induce cell damage (2). Damage to the skin caused by UVA radiation is oxidative and associated with the production of reactive oxygen species (ROS) that can damage lipids, proteins and DNA (3,4). The body's antioxidant system can eliminate ROS, but a redox imbalance resulting from prolonged exposure to UV light may cause undesirable effects such as inflammation, erythema, burn, immunosuppression and photoaging (5).

Plant extracts that are rich in polyphenolic constituents have been widely used in antiaging products, due to their antioxidant activities and ability to neutralize free radicals (6). Other active substances that are present in plant extracts can be used for the same purpose, such as the vitamins A, C and E (7–9). The literature reports on the beneficial effects of using plant extracts when they are associated with sun exposure in cell and animal models, resulting in photoprotective, restorative and prophylactic activities if they are used during and after sun exposure (10,11). New approaches to sun protection have considered treatments applied after sun exposure (2).

Another therapeutic form that can be used to reduce the effects of photoaging is photobiomodulation (PBM), which can be defined as the action exerted by light that stimulates various cellular functions through bioenergetic, bioelectrical and biochemical modifications (12–15). There have been reports of the use of a red LED on photoaged skin (16,17). These reports have observed moderate wrinkle reduction, improved skin texture, stimulation of collagen and elastin synthesis, increased skin elasticity and inhibition of metalloproteinase activity.

Given the known potential of PBM for rejuvenation and the antioxidant effects of plant extracts, combination of these particular therapies is a promising strategy for delaying the effects of photoaging. However, the ensuing effects of these therapies in combination are not yet known. In this context, the present study aims to standardize experimental parameters in order to evaluate the effects of natural extracts (NE) associated with red light PBM on immortalized normal human keratinocytes that have been subjected to UVA radiation.

MATERIALS AND METHODS

Material. The NE that were used in this project were kindly provided by Farma Service Bioextract Ltda, São Paulo, Brazil. The NE used were rosemary (*Rosmarinus officinalis*), chamomile (*Matricaria chamomilla*), blueberry (*Vaccinium myrtillus*), green tea (*Camellia sinensis*), figs (*Ficus carica*), pomegranates (*Punica granatum*) and nutwood (*Juglans regia*). A hydroxycolic (HG) medium, which was composed of a mixture of water, ethanol and propylene glycol, was the vehicle for all of the extracts. Farma Service Bioextract Ltda also provided the total polyphenol content of the extracts. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Vitrocell, Campinas/Brazil) was supplemented with fetal bovine serum (FBS, Vitrocell, Campinas/Brazil) and penicillin-streptomycin solution with antimycotic (Vitrocell, Campinas/Brazil) at 0.1% (v/v). Cell culture flasks were purchased from Sarstedt (Nümbrecht, Germany), and plates were bought from Kasvi (Curitiba/Brazil).

*Corresponding author email: chrispavani@gmail.com (Christiane Pavani)
© 2018 The American Society of Photobiology

Trypsin was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Cells were washed with phosphate buffered saline (PBS; 137 mmol L⁻¹ NaCl, 2.7 mmol L⁻¹ KCl, 8.1 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 1.47 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, pH 7.2), and before trypsinization a PBS buffer with EDTA (0.5 g L⁻¹) was used. All of the reagents used for buffer preparation were purchased from Labsynth (Diadema/Brazil). To determine the percentage of viable cells, the SpectraMax[®] Platform (Molecular Devices, California/USA) and 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) were used. For irradiation in the UVA region, an irradiator composed of lamps emitting UV light at a wavelength of 366 ± 10 nm, with a power density of 2.5 mW cm⁻², was employed. The LED irradiation system used presented maximum emission at 640 ± 12.5 nm, 2.6 mW cm⁻², measured at the treatment surface, and was positioned exactly above the plates, resulting in a distance of 20.70 mm between the cells and the LED lamp.

Cell culture. The immortalized human keratinocytes (HaCaT CLS, Eppelheim, Germany) were cultivated in 75 cm² bottles in DMEM with 10% FBS. They were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The HaCaT cells were then seeded in 48-well plates at a density of 60 000 cells well⁻¹ and subjected to treatments after 18–24 h.

Standardization of UVA radiation exposure. Cells were washed and maintained in PBS and then subjected to different exposure periods of UVA radiation (0–120 min), while the control group was kept unexposed. At the end of the exposure period, cells were maintained in 1% FBS DMEM for 24 h. After that time, the 1% FBS DMEM was withdrawn, 10% FBS DMEM was added, and the plates were kept for 48 h in an incubator. At this time, the modified MTT colorimetric assay was performed (18). Briefly, cells were washed in PBS and incubated with 75 µg mL⁻¹ MTT in 1% FBS DMEM for 2 h. The solutions were aspirated, and isopropanol was added to the wells. In order to determine the percentage of viable cells, the absorbances were measured at 560 nm with a plate reader. The absorbance values for the samples were standardized to those of the control cells, which were considered as 100% viable.

Standardization of natural extracts concentrations. Cells were washed and maintained in PBS for 60 min in the dark (simulating the period of exposure to UVA). They were then treated for 24 h in an incubator, with the NE diluted in 1% FBS DMEM, in concentrations between 0.05% and 0.5% v/v. After this time, the cells were washed with PBS and maintained in 10% FBS DMEM for a further 48 h. Finally, the MTT colorimetric assay was performed (18).

Standardization of LED exposure time (photobiomodulation). Cells were washed and maintained in PBS for 60 min in the dark (simulating the time of exposure to UVA). The PBS was removed, and the cells were maintained in 1% FBS DMEM for 24 h, in order to simulate the incubation period with extracts. The cells were washed, maintained in PBS, and then irradiated with LED periods varying from 0 to 23 min. At the end of the exposures, the PBS was removed, and the cells were maintained in an incubator in 10% FBS DMEM for 48 h. Finally, the MTT colorimetric assay was performed (18).

Statistical analysis. The percentage of living cells was the primary outcome variable of the study and was subjected to statistical analysis. The D'Agostino & Pearson omnibus normality test was used to test the normality of the data. Gaussian data were expressed as mean and standard deviation (mean ± SD), while nonparametric data were expressed as median and 5th and 95th percentiles. For inferential analysis, a one-way ANOVA test and Tukey's post hoc test were used for Gaussian data, and a Kruskal–Wallis test followed by a Mann–Whitney *U*-test was used to analyze nonparametric data. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant. The software used for the tests and graph preparation was GraphPad Prism 6, version 6.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

In Fig. 1, it can be seen that cell viability decreased as UVA exposure time was increased. Statistically significant reductions in cell viability were verified relative to the control when cells were exposed to at least 60 min of irradiation. In these experimental situations, the damage observed was approximately 20%; therefore, cellular recovery was possible. When considering an exposure time of 60 min, the radiant exposure was 9 J cm⁻².

Huynh *et al.* (19) found a 50% decrease in the viability of keratinocytes (HaCaT) with a radiant exposure of 20 J cm⁻² results that corroborated those found in this study. In order to verify the protective effects of cycloheterophyllin on fibroblasts after exposures to UVA, Huang *et al.* (20) used a higher radiant exposure, 20 J cm⁻², but they started with approximately 70% cell damage. Similarly, Chan *et al.* (10) used a radiant exposure of 20 J cm⁻² in retinal epithelial cells, causing 50% cell death. On the other hand, Xu *et al.* (21) used a radiant exposure of 10 J cm⁻² that resulted in approximately 90% viable fibroblasts, in the absence of morphological changes. Under these conditions, they showed an incremental increase in the expression of cathepsin K, which plays a role in intracellular degradation of elastin.

The immediate effects of exposure to UV radiation on the skin are erythema and pigmentation, while the short- to medium-term effects are photoaging and photocarcinogenesis (22). A dose of 20 J cm⁻² is considered to be the minimal erythematous dose (MED) (23). Thus, the use of 9 J cm⁻² UVA would be lower than the MED. Hence, the effects that were evaluated in this work would be associated with a cellular response to a sun exposure that would be considered safe. Lavker *et al.* (24) showed that using daily doses of 0.5 MED could elicit a cumulative erythematous response, with epidermal hyperplasia and thickening of the stratum corneum. This was accompanied by the presence of inflammatory infiltrates, as well as a deposition of lysozyme on the elastin fibers. In this sense, an understanding of the initial effects of UVA radiation on skin cells (especially fibroblasts and keratinocytes) is essential in order to develop strategies to minimize the negative consequences. Another point to consider is the narrow band of the UVA light source used here, which is different from the spectrum of sunlight. The standard solar UV spectrum includes UVB (290–320 nm) and UVA (320–400 nm). In order to mimic experimentally the solar spectra, researchers usually apply light comprised of 97% UVA and 3% UVB (25). The keratinocytes that are located at the surface of the skin are usually affected by both UVA and UVB when a solar simulator is used. However, each wavelength band may affect the cells differently, generating distinct mechanistic pathways (26,27). Here, a narrowband light source was used to evaluate the effects of

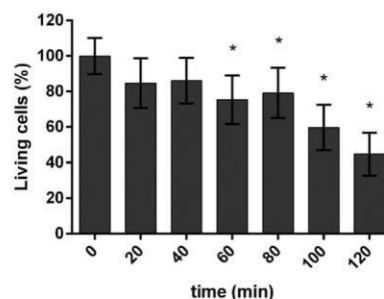


Figure 1. Standardization of UVA irradiation. The normal human keratinocytes were exposed to the UVA 366 ± 10 nm, with an irradiance of 2.5 mW cm⁻², and the cell viability was measured by MTT method. Radiant exposures were 3, 6, 9, 12, 15 and 18 J cm⁻² for 20, 40, 60, 80, 100 and 120 min of exposure, respectively. Data presented as Mean ± SD, *n* = 9. **P* < 0.05 in relation to the control.

UVA without the influence of UVB, as performed by other groups (26,27).

It is known that UVA radiation generates ROS in keratinocytes. As a consequence, it generates inflammation and increases the activities of metalloproteinases. These outcomes accelerate the degradation of collagen and the elastic fibers, leading to the formation of wrinkles (23). DNA lesions and induction of apoptosis have also been observed after UVA exposure, both being consequences of the production of ROS (20). In this sense, the use of NE with antioxidant properties may have interesting effects. The NE used in this study were conveyed in HG medium, a mixture of water, ethanol and propylene glycol, which did not present toxicity at the concentrations tested (data not shown). Thus, any toxicities that were presented by the extracts originated solely from the components, without any influences of the vehicle.

The effects of NE presented a dose-dependent relationship (Fig. 2). However, each of the extracts had an optimal working concentration, at which there was no toxicity. Extracts of chamomile, fig and blueberry did not present toxicities at 0.3% (Fig. 2A), whereas green tea, rosemary and nutwood presented approximately 10% toxicity at 0.1% (Fig. 2B). In contrast, pomegranate should be evaluated in concentrations lower than 0.05%, because even at this concentration, it had 30% toxicity (Fig. 2C).

Initially, these extracts were selected by their phytochemical classes, that is, they presented a greater content of a certain type of polyphenols. However, by analyzing the total polyphenol contents (TPC) of the extracts (Table 1), it was possible to verify that the extracts that presented the highest toxicities were those that presented the highest TPC, independently of the type of polyphenol that they contained. The NE displaying the lowest toxicities were chamomile, fig and blueberry, having TPC below 1 g kg^{-1} of extract. The NE of green tea, rosemary and nutwood presented intermediate toxicities, with TPCs of approximately 5 g kg^{-1} of extract. The pomegranate extracts, the most cytotoxic of all, had a TPC above 15 g kg^{-1} of extract.

Polyphenols have been considered as important anti-inflammatory agents and inducers of cell cycle arrest, as well as apoptosis (28). The cytotoxic effects of NE have been evaluated frequently in tumoral cell lines for their utility as antitumor agents, but there are reports that their effects on normal cells are similar to those observed in tumors (29,30). The mechanisms associated with such cytotoxic effects are still not adequately understood or described in the literature. It is known that polyphenols react with proteins and that they could alter cellular functions (31). The biological responses that have been observed are cell cycle arrest and cell death by apoptosis, but it has not been shown whether these events are interconnected (32). Phenolic compounds tend to donate an electron or a hydrogen atom to a free radical, converting it into a harmless molecule. In this way, they present effective antioxidant activities (33). Due to their antioxidant capacities, NE can reduce oxidative stress induced by exposure to UVA, protecting the skin from harmful effects. However, the administration of polyphenols should respect the dose-response concept, since adverse effects may be observed when larger amounts of polyphenols are used. The literature reports that excessive doses of polyphenols may promote adverse effects, such as toxicity (34). For example, administration of catechin to rat spleen cells caused damage to their DNA (35) and grape extracts in concentrations of between 75 and $300 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$

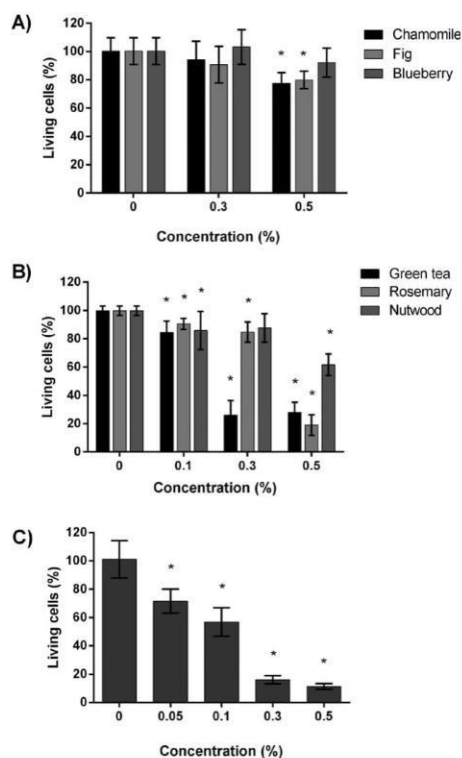


Figure 2. Standardization of extracts concentration. The normal human keratinocytes were exposed to the extracts for 24 h in 1% FBS DMEM, and the cell viability was measured by MTT method 48 h after treatment. (A) Chamomile (black bars), Fig (dark gray bars) and Blueberry (gray bars); (B) Green Tea (black bars), Rosemary (dark gray bars) and Nutwood (gray bars); (C) Pomegranate. Data presented as Mean \pm SD, $n = 9$. * $P < 0.05$ in when relation to the control.

Table 1. Total polyphenol contents (TPC) of the extracts used.

Extract	TPC* (g kg^{-1})
Pomegranate HG	16.89 ± 0.41
Green Tea HG	5.21 ± 0.13
Rosemary HG	4.44 ± 0.04
Nutwood HG	4.22 ± 0.19
Chamomile HG	0.92 ± 0.01
Blueberry HG	0.78 ± 0.04
Fig HG	0.19 ± 0.00

HG, hydroglycolic. *TPC is presented in Gallic acid equivalent (GAE).

induced sister chromatid exchange in rat blood lymphocytes (36). In this context, the present study of cell viability after exposure to NE is essential for determining the safe amounts of extracts that can be used without promoting unwanted effects.

For PBM, several LED exposure times were evaluated. Statistical analyses showed significant differences from the control after only 23 min of exposure. Following 11 min of exposure to the red LED (1.7 J cm^{-2}), a decrement in the cell viabilities of keratinocytes was observed (Fig. 3). Exposures for 17 min showed significant differences relative to 2, 5 and 7 min of exposure, showing that, in these situations, cell death had already been registered. The phototoxicity of PBM is well known (15,37). Low radiant exposures (J cm^{-2}) generate no biological effects; increasing the energy of exposure generates a positive response, and beyond a certain value the benefits are reduced up to a point where damaging effects are predominant. This is called a "biphasic dose-response" (Arndt-Schulz law) (38). As a result, a time of 7 min of LED exposure (1.0 J cm^{-2}) was adopted, because we wanted to use an adequate amount of energy to induce PBM but not enough to induce loss of viability. It is important to mention that the temperature of the cell culture medium was measured during the PBM treatment using a thermographic camera (C2, FLIR[®], Nashua/NH, USA), and no increase in temperature was observed during the PBM. The temperature of the medium was constant at 37°C .

The photobiomodulatory effects in cell cultures can vary depending upon several factors, such as the radiant exposure, the irradiance and the cell type. These physical parameters that are applied at higher than adequate values may cause adverse effects on cells, such as structural damage to DNA and an increase in ROS (12). A radiant exposure of 1.0 J cm^{-2} is believed to be sufficient to induce PBM. As Zhang *et al.* (13) verified, there was direct regulation of the specific genes that were related to cell synthesis, repair and metabolism when normal fibroblasts were subjected to red LED (628 nm) for 3 days, at a total dose of 0.88 J cm^{-2} . When using red LED (633 nm), Kim *et al.* (16) showed an increase in Type I procollagen, a reduction in metalloproteinases (MMP-1 and MMP-2) and reduced expression of inflammatory genes (COX-2 and IL-1). However, it must be stated that the radiant exposure values that caused these effects were in the order of $4\text{--}12 \text{ J cm}^{-2}$, and the irradiance that was used was very low (5 and $47.5 \mu\text{W cm}^{-2}$) and required between 24 and 72 h of illumination, which would not be feasible in a

clinical protocol. Barolet *et al.* (39) showed reduction in the rhytid depth, surface roughness and severity of wrinkles of 90% of participants after LED treatment for 11 sessions within a month, 4 J cm^{-2} per session (at 50 mW cm^{-2} irradiance). They showed that LED reversed downregulation of collagen and upregulation of MMP-1, resulting in the above-mentioned effects on patients' appearance. Tian *et al.* (17) showed that, after exposure of fibroblasts to UVB, treatments with 630 nm LED increased the relative amount of cells, whereas 1 J cm^{-2} was sufficient to cause this effect. In addition, after exposure to LED, the expressions of Type I collagen increased, and that of metalloproteinase-1 decreased. Thus, these literature reports corroborate the results we found with a radiant exposure of 1 J cm^{-2} .

Based upon these variables, fig extract and nutwood were chosen to evaluate the proposed protocol. The HG vehicle was evaluated as a control, and fig and nutwood were chosen due to their low toxicity, the TPC value being low for fig (0.19 g kg^{-1} GAE) and intermediate for nutwood (4.22 g kg^{-1} GAE). Concomitantly, four treatments were performed: (1) treatment with extract in the dark, (2) treatment with extract after UVA exposure, (3) PBM after extract treatment and finally, (4) treatment with extract after UVA exposure followed by PBM. Controls without extract (CT) and with the vehicle (HG) were also performed. The data are presented in Fig. 4. In the control group of treatments (CT), UVA caused damage to keratinocytes, reducing the amount of living cells to 80%. PBM without previous damage had no effect on keratinocytes. However, the use of PBM after UVA damage promoted recovery (to approx. 92%), but cell viability did not reach baseline levels. This recovery of cell viability may be the result of reduction of cell death or activation of cell metabolism by PBM. Here, the MTT method was chosen for cell viability measurement since it is easier and not time-consuming when compared with other assays, such as trypan blue exclusion. On the other hand, the MTT assay presents some pitfalls, since metabolic, energetic and oxidoreductase activity perturbations may affect the endpoint measurement (40). In this sense, the literature shows that PBM is a technique that activates ATP production, cell proliferation and migration and modulation of many signaling pathways (41). PBM modulates the levels of

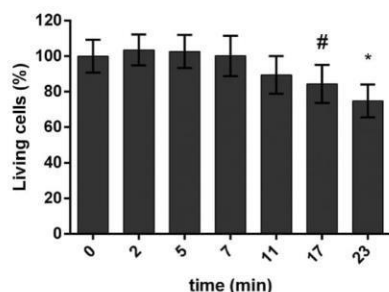


Figure 3. Standardization of LED irradiation. The normal human keratinocytes that were exposed to the LED system $640 \pm 12.5 \text{ nm}$, with a power density of 2.6 mW cm^{-2} , and the cell viability was measured by MTT method. Radiant exposures were 0.31, 0.78, 1.0, 1.7, 2.6 and 3.6 J cm^{-2} for 2, 5, 7, 11, 17 and 23 min of exposure, respectively. Data presented as Mean \pm SD, $n = 12$. * $P < 0.05$ in when relation to the control; # $P < 0.05$ when compared to 2, 5 and 7 min.

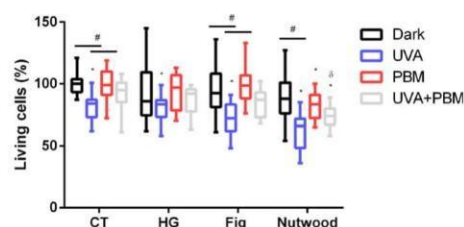


Figure 4. Photobiomodulation and Extracts treatments in cells exposed to UVA. The human keratinocytes that were exposed to the extracts or hydroglycolic vehicle (Fig and Nutwood 0.3%) for 24 h in 1% FBS DMEM in the Dark (black box); after UVA at $366 \pm 10 \text{ nm}$, 60 min, 9 J cm^{-2} (blue box); after PBM $640 \pm 12.5 \text{ nm}$, 7 min, 1.0 J cm^{-2} (red box) or after UVA followed by PBM (UVA + PBM; gray box). Cell viability was measured by MTT method. Data presented as Median and error bars indicate 5 and 95 percentiles, $n = 24$. * $P < 0.05$ compared to the control; # $P < 0.05$ between treatments, $^{\circ}P < 0.05$ compared to the UVA + PBM control.

ROS, since ROS can be produced by red light absorption by mitochondria and opsins and also by the increased mitochondrial membrane potential (MMP), which consequently enhances ATP production (15). Moreover, ROS induced by PBM can generate several responses: promotion of proliferation by the pERK1/2 pathway (42); activation of transcription factors and signaling pathways, for example, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), which is capable of differentiating human stem cells (43). Thus, a combination of different cell death/viability/proliferation assays should be performed to better explain this result.

The HG vehicle showed a similar behavior to CT in all the treatments performed. Similarly, treatment of keratinocytes with fig extract did not present any improvement in comparison with CT when cell viability were evaluated: UVA caused reduction in cell viability and post treatment with fig did not bring about cell recovery; PBM after exposure to fig presented no changes in cell viability relative to treatment in the dark (fig extract was not toxic when combined with PBM); and finally, UVA + PBM combined with fig treatment promoted recovery relative to fig UVA; however, there was no difference between UVA + PBM treatment and the CT. Despite this absence of difference regarding the CT in terms of living cells, other parameters related to cell signaling and photoaging may present improvements with use of the extract. The modulation in expression of anti- and proinflammatory cytokines, metalloproteinases, and DNA repair genes are some of the factors which may be influenced by PBM (44) and fig extract and need further investigation.

Nutwood extract generated very different results from other treatments. PBM after nutwood treatment was significantly different from the dark CT, that is, cell death occurred, showing that nutwood is photosensitive in the red region of the spectrum. The probable mechanism for the effect observed involves red light absorption by the nutwood extract, producing excited states that may generate ROS and singlet oxygen, which are well known cytotoxic agents. This sequence of events is the principle of photodynamic therapy (45) and was observed in other kinds of samples, such as hair (46). Cell viability after treatment with nutwood UVA + PBM was significantly lower than with CT UVA + PBM, showing that nutwood treatment after exposure to UVA and followed by PBM does not attenuate cytotoxicity; instead, it causes cell death. This particular experimental protocol will be very useful for future *in vitro* and *in vivo* studies, and the best results may be translated to clinics.

CONCLUSION

In view of the importance of irradiation parameters such as radiant exposure, as well as the possibility of NE toxicity, the establishment of experimental parameters for the combination of NE and PBM is essential. The study was based upon only one method to measure cell viability since it mainly addressed protocol development and initial screening of a series of NE. In light of the results obtained, the cells were exposed to 9 J cm^{-2} of UVA in order to simulate the damage caused by solar exposure. An amount of 1.0 J cm^{-2} LED was used to trigger photobiomodulatory effects, and depending upon the polyphenolic content of each extract, the cells received between 0.01 and 0.3% of the NE. The data showed that PBM is a promising therapy to restore skin cells after UVA damage, which showed better cell viability results than NE. However, further studies are needed to clarify the detailed mechanisms and effects, as well as

the cell signaling pathways involved. Moreover, the combination of PBM with NE may be a useful strategy; however, the choice of a NE is challenging, since the concentration used and other properties of the extract, such as its photosensitivity, may bring about undesired effects.

Acknowledgements—The authors thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for their financial support of this research (2012/50680-5). They would also like to thank Farma Service Bioextract Ltda, São Paulo, Brazil, for kindly providing the extracts as a gift and the TPC values. They would also like to thank D Severino and GMC Pinto for the design, construction and characterization of the UVA irradiation system. CP thanks CNPq for the Research Fellowship (311737/2017-0).

REFERENCES

- Delgado, J. A., I. Quesada, L. M. Montaña and L. Anasagasti (2006) Safety of UV radiation for autofluorescence diagnosis of skin cancer. *Rev. Mex. Fis.* **52**, 78–83.
- Sondenheimer, K. and J. Krutmann (2018) Novel means for photo-protection. *Front. Med.* **5**, 162.
- Pinnell, S. R. (2003) Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**, 1–19.
- Berneburg, M., S. Grether-Beck, V. Kurten, T. Ruzicka, K. Briviba, H. Sies and J. Krutmann (1999) Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photogaging-associated mitochondrial common deletion. *J. Biol. Chem.* **274**, 15345–15349.
- Gonzalez, S., Y. Gilaberte and N. Philips (2010) Mechanistic insights in the use of a Polyiodium leucotomos extract as an oral and topical photoprotective agent. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 559–563.
- F'Guyer, S., F. Afaq and H. Mukhtar (2003) Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **19**(2), 56–72.
- Farris, P., J. Zeichner and D. Berson (2016) Efficacy and tolerability of a skin brightening/anti-aging cosmeceutical containing retinol 0.5%, niacinamide, hexylresorcinol, and resveratrol. *J. Drugs Dermatol.* **15**, 863–868.
- Kim, S.-M., S.-M. Lim, J.-A. Yoo, M.-J. Woo and K.-H. Cho (2015) Consumption of high-dose vitamin C (1250 mg per day) enhances functional and structural properties of serum lipoprotein to improve anti-oxidant, anti-atherosclerotic, and anti-aging effects via regulation of anti-inflammatory microRNA. *Food Funct.* **6**, 3604–3612.
- Farris, P., M. Yatskayer, N. Chen, Y. Krol and C. Oresajo (2014) Evaluation of efficacy and tolerance of a nighttime topical antioxidant containing resveratrol, baicalin, and vitamin E for treatment of mild to moderately photodamaged skin. *J. Drugs Dermatol.* **13**, 1467–1472.
- Chan, C. M., C. H. Huang, H. J. Li, C. Y. Hsiao, C. C. Su, P. L. Lee and C. F. Hung (2015) Protective effects of resveratrol against UVA-induced damage in ARPE19 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 5789–5802.
- Godic, A., B. Poljsak, M. Adamic and R. Dahmane (2014) The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2014**, 1–6.
- Al Ghamdi, K. M., A. Kumar and N. A. Moussa (2011) Low-level laser therapy: A useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med. Sci.* **27**, 237–249.
- Zhang, Y., S. Song, C. C. Fong, C. H. Tsang, Z. Yang and M. Yang (2003) cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 188–192.
- Korac, R. R. and K. M. Khambholja (2011) Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacogn. Rev.* **5**, 164–173.
- Hamblin, M. R. (2018) Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. *Photochem. Photobiol.* **94**, 199–212.
- Kim, H. S., W. S. Park, J. I. Baek, B. S. Lee and D. S. Yoo (2015) Continuous irradiation with a 633-nm light-emitting diode exerts an anti-aging effect on human skin cells. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 383–390.

17. Tian, Y. S., Kim, N-H and Lee, A-Y (2012) Antiphotaging effects of light-emitting diode irradiation on narrow-band ultraviolet B-exposed cultured human skin cells. *Dermatologic Surg* **38**, 1695–1703.
18. Martins, W. K., D. Severino, C. Souza, B. S. Stolf and M. S. Baptista (2013) Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. *Biotechnol. J.* **8**, 730–737.
19. Huynh, T., K. Chan and T. Piva (2009) Effect of ultraviolet radiation on the expression of pp38MAPK and furin in human keratinocyte-derived cell lines. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **25**, 20–29.
20. Huang, C. H., H. J. Li, N. L. Wu, C. Y. Hsiao, C. N. Lin, H. H. Chang, C. F. Hung, C.-H. Huang, H.-J. Li, N.-L. Wu, C.-Y. Hsiao, C.-N. Lin, H.-H. Chang and C.-F. Hung (2016) Photoprotective effects of cycloheterophyllin against UVA-induced damage and oxidative stress in human dermal fibroblasts. *PLoS ONE* **11**, e0161767.
21. Xu, Q., W. Hou, Y. Zheng, C. Liu, Z. Gong, C. Lu, W. Lai, H. I. Maibach, Q. Xu, W. Hou, Y. Zheng, C. Liu, Z. Gong, C. Lu, W. Lai and H. I. Maibach (2014) Ultraviolet A-induced cathepsin K expression is mediated via MAPK/AP-1 pathway in human dermal fibroblasts. *PLoS ONE* **9**(7), e102732.
22. Battie, C. and M. Verschoore (2012) Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **78**(7), 9–14.
23. Ichihashi, M. and H. Ando (2014) The maximal cumulative solar UVB dose allowed to maintain healthy and young skin and prevent premature photoaging. *Exp. Dermatol.* **1**, 43–46.
24. Lavker, R. M., G. F. Gerberick, D. Veres, C. J. Irwin and K. H. Kaidbey (1995) Cumulative effects from repeated exposures to suberythral doses of UVB and UVA in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **32**, 53–62.
25. Schmid, F. (2018) A standardized method based on pigmented epidermal models evaluates sensitivity against UV-irradiation. *Altex* **35**, 390–396.
26. Kraemer, A., I.-P. Chen, S. Henning, A. Faust, B. Volkmer, M. J. Atkinson, S. Moertl and R. Greinert (2013) UVA and UVB irradiation differentially regulate microRNA expression in human primary keratinocytes. *PLoS ONE* **8**, e83392.
27. Appelqvist, H., P. Wäster, I. Eriksson, I. Rosdahl and K. Öllinger (2013) Lysosomal exocytosis and caspase-8-mediated apoptosis in UVA-irradiated keratinocytes. *J. Cell Sci.* **126**, 5578–5584.
28. Maeda, H., M. Yamazaki and Y. Katagata (2013) Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil inhibits LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**(3), 482–486.
29. Srivastava, S., R. R. Somasagara, M. Hegde, M. Nishana, S. K. Tadi, M. Srivastava, B. Choudhary and S. C. Raghavan (2016) Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Sci. Rep.* **6**, 24049.
30. Nemati, F., A. A. Dehpouri, B. Eslami and V. M. S. Mahdavi (2013) Cytotoxic properties of some medicinal plant extracts from Mazandaran. *Iran Red Crescent Med. J.* **15**(11), e8871.
31. Delfino, R. A. and S. G. Canniatti-Brazaca (2010) Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade proteica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas* **30**(2), 308–312.
32. Jaganathan, S. K. and M. Mandal (2009) Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: A review. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, 830616.
33. Skrovankova, S., D. Sumezynski, J. Mlecek, T. Jurikova and J. Sochor (2015) Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *J. Mol. Sci.* **16**(10), 24673–24706.
34. Matsuo, M., N. Sasaki, K. Saga and T. Kaneko (2005) Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 253–259.
35. Fan, P. and H. Lou (2004) Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. *Mol. Cell. Biochem.* **267**, 67–74.
36. Stagos, D., C. Spanou, M. Margariti, C. Stathopoulos, Z. Mamuris, G. Kazantzoglou, P. Magiatis and D. Kouretas (2007) Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5246–5252.
37. Hamblin, M. R. (2017) Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys.* **4**, 337–361.
38. Huang, Y., S. K. Sharma, J. D. Carroll and M. R. Hamblin (2011) Huang, biphasic dose response in low level light therapy – an update. *Dose-Response* **9**, 602–618.
39. Barolet, C. J., F. A. Robege and A. G. L. Bouche (2009) Regulation of skin collagen metabolism in vitro using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2751–2759.
40. Stepanenko, A. A. and V. V. Dmitrenko (2015) Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* **574**, 193–203.
41. Chung, H., T. Dai, S. K. Sharma, Y.-Y. Huang, J. D. Carroll and M. R. Hamblin (2012) The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 516–533.
42. Feng, R., Y. Morine, T. Ikemoto, S. Imura, S. Iwahashi, Y. Saito and M. Shimada (2018) Photobiomodulation with red light-emitting diodes accelerates hepatocyte proliferation through reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Hepatol. Res.* **48**, 926–936.
43. Arany, P. R., A. Cho, T. D. Hunt, G. Sidhu, K. Shin, E. Hahm, G. X. Huang, J. Weaver, A. C. H. Chen, B. L. Padwa, M. R. Hamblin, M. H. Barcellos-Hoff, A. B. Kulkarni and D. J. Mooney (2014) Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci. Transl. Med.* **6**, 238ra69.
44. Leong, C., P. L. Bigliardi, G. Sriram, V. B. Au, J. Connolly and M. Bigliardi-Qi (2018) Physiological doses of red light induce IL-4 release in cocultures between human keratinocytes and immune cells. *Photochem. Photobiol.* **94**, 150–157.
45. Francisco, C. M. L., J. M. L. A. Gonçalves, B. S. Brum, T. P. C. Santos, A. Lino-Dos-Santos-Franco, D. F. T. Silva and C. Pavani (2017) The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. *New J. Chem.* **41**, 14438–14443.
46. Chiarelli-Neto, O., C. Pavani, A. S. Ferreira, A. F. Uchoa, D. Severino and M. S. Baptista (2011) Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1195–1202.

INFORMAÇÕES PARA MEMBROS EXTERNOS DE BANCAS

Caro(a) professor(a), agradecemos ter aceitado nosso convite, ficaremos muito honrados com sua presença.

Para facilitar sua análise, esclarecemos que os trabalhos de dissertação e tese do Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde devem seguir a seguinte estrutura:

1. Contextualização do objeto de estudo com a respectiva justificativa;
2. Objetivos que devem estar alinhados aos artigos publicados;
3. Métodos. Toda metodologia utilizada no(s) artigo(s);
4. Resultados. Descrição dos resultados ainda não publicados e/ou apenas a referência completa do(s) manuscrito(s) publicado(s) ou aceito(s) para publicação no caso de todos resultados já terem sido aceitos ou publicados. Os artigos devem estar disponíveis na seção “Anexos”
5. Discussão. Abordagem do conjunto dos resultados frente à literatura pertinente;
6. Conclusão. Descrição concisa do significado dos resultados;
7. Anexo. Informações adicionais não reportadas nas seções anteriores e o(s) artigo(s) publicado(s) ou submetido(s) a publicação.