



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

**ELINEIDES SANTOS SILVA**

**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO**  
**DA COMBINAÇÃO DE EXTRATOS NATURAIS E FOTOBIMODULAÇÃO NA**  
**VIABILIDADE DE QUERATINÓCITOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE**  
**INDUZIDO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA A**

**SÃO PAULO, SP**



**Elineides Santos Silva**

**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO  
DA COMBINAÇÃO DE EXTRATOS NATURAIS E FOTOBIMODULAÇÃO NA  
VIABILIDADE DE QUERATINÓCITOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE INDUZIDO  
POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA A**

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**

**2016**

Silva, Elineides Santos.

Padronização do método experimental para avaliação do efeito da combinação de extratos naturais e fotobiomodulação na viabilidade de queratinócitos submetidos ao estresse induzido por radiação ultravioleta A. / Elineides Santos Silva. 2016.

53 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christiane Pavani.

1. Fotoenvelhecimento da pele. 2. Fotorejuvenescimento. 3. Extratos naturais. 4. Antioxidantes. 5. Fotobiomodulação.
- I. Pavani, Christiane. II. Título

São Paulo, 16 de dezembro de 2016

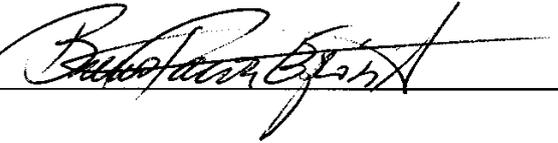
TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: ELINEIDES SANTOS SILVA

Titulo da Dissertação: "Padronização do método experimental para avaliação do efeito da combinação de extratos naturais e fotobiomodulação na Viabilidade de queratinócitos submetidos ao estresse induzido por radiação ultravioleta A "

Presidente: PROF. DR. CHRISTIANE PAVANI 

Membro: PROF. DR. ADRIANA LINO SANTOS FRANCO 

Membro: PROF. DR. BRENO PANNIA ESPOSITO 

## **Dedicatória**

À Deus, que iluminou o meu caminho durante esta caminhada e me permitiu concluir esse trabalho.

Aos meus pais, Eliseu P. Silva (em memória) e Lurdes S. Silva que com muita dedicação e carinho me proporcionaram chegar aqui. A vitória de mais uma etapa da minha vida é devida a vocês!

Dedico também aos parentes e amigos que me compreenderam, acreditaram em mim e me motivaram em direção à vitória dos meus desafios.

## Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Deus que me guia e ilumina em todos os dias. Me dá forças e fé para enfrentar as dificuldades, permitindo concluir mais essa etapa da minha vida.

Ao meu pai Eliseu (em memória), minha mãe Lurdes e familiares que sempre me incentivaram a progredir e a buscar conhecimento. São os alicerces dessa jornada, pois sempre acreditaram no meu potencial e investiram nos meus estudos.

Ao meu namorado André Amâncio por tanta paciência, compreensão e apoio. Nos momentos de fraqueza me deu forças, esteve sempre presente e fez dos meus sonhos os seus.

À Universidade Nove de Julho por me acolher como docente e aluna, dando a oportunidade de ampliar meus conhecimentos. À seção de Pós-graduação *stricto sensu* por me admitir no programa e por toda estrutura oferecida.

À minha orientadora, Professora Doutora Christiane Pavani por tanta dedicação, paciência e carinho. Uma profissional de grande competência e que sem reservas 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, técnicos e demais professores que contribuíram para um ambiente agradável e produtivo. Sempre prestativos, foram essenciais nessa jornada.

À coordenação e diretoria do curso de nutrição da Universidade Nove de Julho pela compreensão e incentivo.

Aos amigos e parentes que acompanharam minha evolução, me apoiaram e acreditaram em mim. Compreenderam minhas ausências e agora compartilham de uma grande vitória.

## Resumo

A pele apresenta diversas funções como revestimento, controle de temperatura, eliminação de substâncias químicas, etc. A exposição da pele à radiação ultravioleta provoca alterações associadas com o envelhecimento precoce e o câncer de pele. Estudos demonstram que extratos vegetais com propriedades antioxidantes minimizam os efeitos do fotoenvelhecimento; paralelamente, o efeito biomoestimulador da luz visível pode promover modificações bioenergéticas, bioelétricas e bioquímicas. Neste sentido, a associação de fontes naturais de antioxidantes e fototerapia mostra-se estratégia interessante para promover o rejuvenescimento da pele. O objetivo do projeto é padronizar os parâmetros do protocolo experimental para avaliar o efeito da combinação de extratos naturais e fotobiomodulação na viabilidade de queratinócitos humanos normais imortalizados submetidos à radiação UVA. Foram utilizados uma série de extratos naturais, previamente selecionados em função da família fitoquímica à que pertencem: Camomila e Alecrim (Flavonas), Mirtilo (Antocianinas), Chá verde (Catequinas), Figo (Cumarinas), Romã (Tanino Elágico) e Nogueira (Tanino Gálico). Para simular a exposição à radiação UVA foi utilizado um sistema irradiador ( $366 \pm 10$  nm;  $2,5$  mW/cm<sup>2</sup>). Para fototerapia foi utilizado um sistema de Diodos Emissores de Luz ( $640 \pm 12,5$  nm;  $2,6$  mW/cm<sup>2</sup>), posicionado exatamente acima da placa. A avaliação da viabilidade foi realizada pelo método do MTT, comparando a toxicidade em relação ao grupo controle. Os parâmetros experimentais definidos foram 60 minutos de irradiação com UVA ( $9$  J/cm<sup>2</sup>), 7 minutos de irradiação com LED ( $1$  J/cm<sup>2</sup>) e, dependendo do conteúdo polifenólico de cada extrato, concentrações de 0,01 a 0,3 % v/v de extratos.

Palavras chaves: Fotoenvelhecimento da pele, fotorejuvenescimento, extratos naturais, antioxidantes, fotobiomodulação.

## Abstract

Skin presents different functions, such as coating, temperature control, eliminating chemicals, etc. The skin exposure to UV radiation may cause some alterations related to premature aging and skin cancer. Studies have shown that plant extracts with antioxidant properties reduce the effects of photoaging; in parallel, the bioestimulating effect of visible light may promote bioenergetic, bioelectrical and biochemical changes. In this sense, the combination of natural antioxidants and phototherapy is an interesting strategy to promote skin rejuvenation. The objective of the project is to standardize the parameters of the experimental protocol to evaluate the effect of the combination of natural extracts and photobiomodulation on the viability of immortalized normal human keratinocytes subjected to photoinduced damage by Ultraviolet type A (UVA). Some extracts, previously selected by their phytochemical family, were evaluated: Chamomile and Rosemary (Flavones), Blueberry (Anthocyanines), Green tea (Catechins), Fig (Coumarines), Pomegranate (Ellagic Tannin) and Walnut (Gallic Tannin). Human immortal keratinocytes in culture (HaCaT) were used as experimental model. Simulating UVA exposure, a system was used ( $366 \pm 10$  nm;  $2.5$  mW /  $\text{cm}^2$ ). A Light Emitting Diode (LED) cluster were used for phototherapy ( $640 \pm 12.5$  nm;  $2.6$  mW /  $\text{cm}^2$ ). The percentage of living cells was determined by MTT method. The viability assessment was performed using the MTT method, comparing the toxicity in relation to the control group. The experimental parameters defined were 60 minutes of irradiation with UVA ( $9$  J/ $\text{cm}^2$ ), 7 minutes of LED irradiation ( $1$  J/ $\text{cm}^2$ ) and, depending on the polyphenolic content of each extract, concentrations of 0.01 to 0.3 % v/v of extracts.

Key words: skin photoaging, photorejuvenation, natural extracts, antioxidants, photobiomodulation.

## Sumário

Índice de Figuras .....	10
Lista de abreviaturas .....	11
1. Contextualização.....	12
1.1 Mecanismos dos danos celulares causados pela radiação UV.....	13
1.2 Efeito reparador de extratos naturais .....	14
1.3 Fototerapia para rejuvenescimento.....	16
2. OBJETIVOS .....	18
2.1. Objetivos Gerais:.....	18
2.2. Objetivos Específicos:.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 MATERIAIS.....	19
3.1.1 Extratos vegetais.....	19
3.1.2 Cultura celular: .....	19
3.1.3 Sistema de irradiação UVA .....	20
3.1.4 Sistema de irradiação LED:.....	20
3.2 MÉTODOS.....	21
3.2.1 Cultivo celular.....	21
3.2.2 Padronização dos parâmetros .....	22
3.2.2.1 Viabilidade dos queratinócitos após exposição à radiação UVA .....	22
3.2.2.2 Viabilidade dos queratinócitos após exposição aos extratos naturais .....	23
3.2.2.3 Viabilidade dos queratinócitos tratados com LED .....	23
3.2.3 Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO .....	26
6. CONCLUSÕES .....	29
7. REFERÊNCIAS.....	30
APÊNDICES.....	38
Informações para membros externos de bancas.....	555

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema da pele humana e suas camadas: derme e epiderme. A epiderme apresenta as camadas: estrato córneo, camada granular, camada espinhosa e camada basal, formando a superfície da pele. Traduzido e adaptado de <sup>(1)</sup> .....	122
<b>Figura 2: Estrutura de compostos polifenólicos</b> .....	155
<b>Figura 3: Espectro de emissão do irradiador UVA</b> .....	20
<b>Figura 4: Sistema de Irradiação.</b> Esquerda: Sistema posicionado acima da placa como foi utilizado nos experimentos, Direita: Espectro de emissão do sistema LED.....	21
<b>Figura 5: Esquema geral dos experimentos</b> .....	22

## **Lista de abreviaturas**

DEM – Dose Eritematosa Mínima

DMEM – Meio Dulbecco's Eagle Modificado

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

HaCat – Linhagem de queratinócitos humanos normais imortalizados

HG - Veículo Hidroglicólico

LED - Diodo Emissor de Luz, do inglês *Light Emitting Diode*

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

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotações por minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

UV – Radiação Ultravioleta

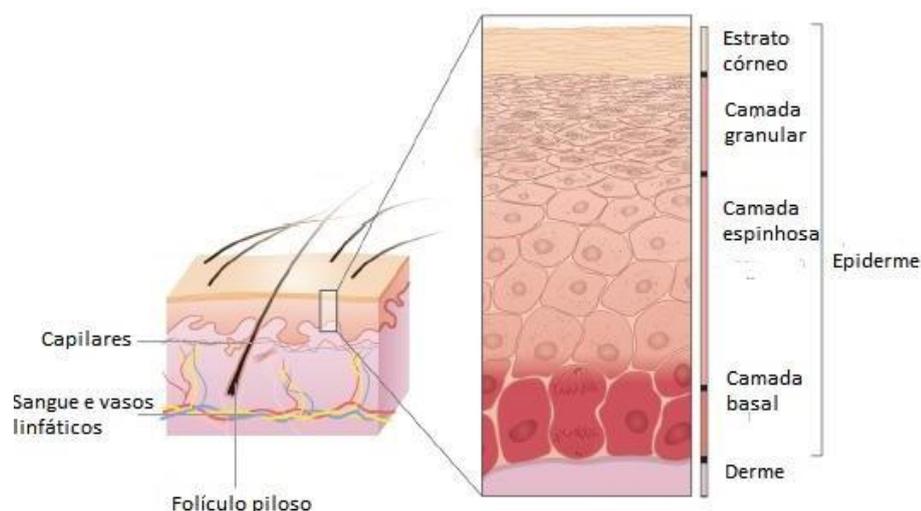
UVA – Radiação Ultravioleta A

UVB – Radiação Ultravioleta B

UVC – Radiação Ultravioleta C

## 1. Contextualização

Considerada o maior órgão humano, a pele é responsável por aproximadamente 15 % do peso corporal. Entre suas diversas funções, podemos citar as de revestimento, controle de temperatura, absorção dos raios ultravioleta, eliminação de substâncias químicas, entre outras. Podemos dividi-la em duas estruturas básicas: a epiderme e a derme (**Figura 1**).



**Figura 1:** Esquema da pele humana e suas camadas: derme e epiderme. A epiderme apresenta as camadas: estrato córneo, camada granular, camada espinhosa e camada basal, formando a superfície da pele. Traduzido e adaptado de<sup>(1)</sup>

A epiderme é uma estrutura complexa, composta por queratinócitos em seus estágios de diferenciação, apresentando cinco camadas (também chamadas de estratos): basal, espinhosa, granulosa, córnea e lúcida, esta última encontra-se em locais específicos como sola dos pés e palma das mãos. A derme por sua vez, consiste em um tecido resistente e elástico que proporciona proteção frente a agressões mecânicas, irriga a epiderme com nutrientes e abriga apêndices cutâneos, vasos sanguíneos, linfáticos e células de natureza conjuntiva e origem sanguínea. É subdividida em derme papilar, que fica em contato direto com a epiderme, e logo abaixo a derme reticular<sup>(2)</sup>.

Diversos estudos têm evidenciado que a exposição da pele à radiação ultravioleta (UV) é responsável por alterações cutâneas associadas com o envelhecimento precoce e o câncer de pele<sup>(3)</sup>. Dos raios UV oriundos do sol, 95 % são UVA e 5 % são UVB, enquanto os raios tipo UVC são bloqueados pela camada de ozônio<sup>(4)</sup>. A classificação da radiação UV é definida pelo comprimento

de onda, conforme apresentado na **Tabela 1**, sendo que quanto menor o comprimento de onda da radiação, maior é a energia da radiação<sup>(5)</sup>.

Tabela 1: Classificação da radiação Ultravioleta<sup>(6)</sup>

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

### **1.1 Mecanismos dos danos celulares causados pela radiação UV**

A radiação UVA apresenta capacidade de penetração mais profunda nas camadas da epiderme e uma pequena parte chega a alcançar o tecido subcutâneo. Desse modo, ao atingir as camadas basais da epiderme, responsáveis pela proliferação das células epidérmicas, contribui significativamente para as alterações da pele<sup>(7)</sup>. Por outro lado, os raios UVB possuem penetrabilidade limitada, atingindo principalmente as camadas superficiais da epiderme e, devido a sua elevada carga energética, são os maiores responsáveis pelos danos<sup>(8-11)</sup>. Estes efeitos deletérios da radiação UV dependem de diversos fatores, entre eles: duração e frequência da exposição; intensidade da radiação solar baseada na latitude; presença ou ausência de nuvens de poluição, época do ano; reação baseada na constituição genética, cor e fototipo da pele<sup>(12)</sup>.

Os danos causados pela radiação UV na pele são danos oxidativos e são resultado da absorção da luz por cromóforos endógenos (tais como DNA, ácido urocânico, riboflavina, melanina e seus precursores, entre outros), desencadeando reações químicas diretas ou produzindo Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que podem causar danos aos lipídeos, proteínas e DNA <sup>(13-15)</sup>.

A absorção direta do UVB pelo DNA leva à formação de dímeros de pirimidina provocando a distorção da estrutura da dupla hélice e causando erros na leitura das fitas durante as etapas de transcrição e replicação<sup>(16)</sup>. Dependendo da extensão deste dano, a proteína supressora tumoral p53 e algumas enzimas como as caspases, podem induzir o queratinócito ao processo de morte celular (apoptose). Por outro lado, durante o ciclo celular existe um mecanismo

verificador e de reparo que garante que o DNA das células esteja preservado antes da replicação e divisão. Este mecanismo é constituído de muitas vias de reparação (excisão, reparação por quebras duplas, etc.) além da via de tolerância de danos em que ocorre a síntese translesão. Desta forma, a célula pode reconhecer e reparar danos no DNA causados pela radiação UVB, mantendo-se viva após um dano em DNA; ou pode haver uma falha no mecanismo de reparo que pode resultar na sobrevivência de uma célula com mutações, aumentando a predisposição ao câncer<sup>(17-19)</sup>.

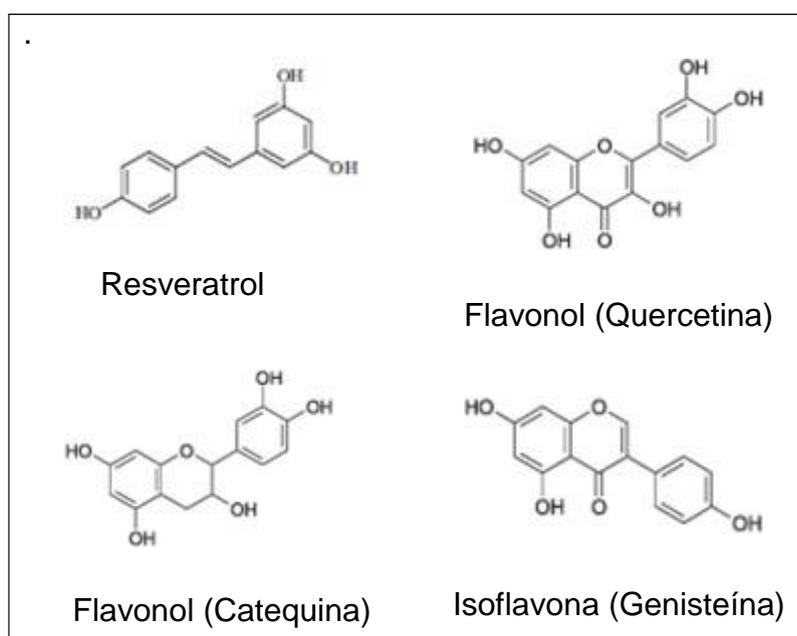
A formação de EROs na pele é induzida principalmente pela radiação UVA. As EROs são naturalmente eliminadas pelo sistema antioxidante, mas a exposição prolongada à luz UVA pode resultar em um desbalanço redox<sup>(20)</sup>. O desbalanço redox pode causar efeitos como a inflamação, eritema, queimadura, imunossupressão e fotoenvelhecimento<sup>(21,22)</sup>. O processo de fotoenvelhecimento, resultante da exposição prolongada e acumulativa aos raios ultravioleta, em especial o UVA, pode ser entendido como um processo resultante do desgaste celular que resulta em perda da viabilidade e capacidade funcional. É influenciado por um programa genético, por danos endógenos e ambientais acumulativos<sup>(23,24)</sup>.

Estima-se que aproximadamente 80 % dos sinais visíveis apresentados no envelhecimento são provocados pelos raios UV e pelos radicais livres formados devido à exposição a estes e, no mínimo, 10 % de todos os novos casos de câncer seriam evitados se a população fizesse uso contínuo e adequado de protetores solares<sup>(25)</sup>.

## **1.2 Efeito reparador de extratos naturais**

Extratos vegetais com propriedades antioxidantes minimizam os efeitos do fotoenvelhecimento por meio de redução da concentração de radicais livres no tecido<sup>(26)</sup>, bem como redução da resposta inflamatória<sup>(27)</sup>, ativação da resposta imune<sup>(28)</sup>, estímulo à produção de colágeno<sup>(29)</sup>, produção de matriz extracelular por fibroblastos<sup>(30)</sup>, estímulo à proliferação e diferenciação celular, entre outros mecanismos. Estes compostos são empregados com o objetivo de estimular a renovação celular ou inibir processos bioquímicos que levam à danos, ou em alguns casos, ambos<sup>(31)</sup>.

Por exemplo, os polifenóis do chá verde demonstraram atividade fotoprotetora e fotoreparadora em ensaio clínico, em especial reduzindo o eritema e o dano em DNA causado pela radiação UV<sup>(32)</sup>. Antocianidinas da semente de uva e outros antioxidantes, utilizados em suplementação da dieta, inibem o desenvolvimento de tumores induzidos por UV<sup>(33,34)</sup>. De maneira geral, os compostos polifenólicos (como por exemplo aqueles cujas estruturas estão apresentadas na Figura 2) 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 radicalares<sup>(16)</sup>.



**Figura 2: Estrutura de compostos polifenólicos.**

A literatura demonstra o efeito benéfico do tratamento com extratos vegetais associados à exposição solar em modelos de células e animais, podendo citar, entre eles o chá verde, chá branco e *Aloe*, sendo que *Aloe* tem efeito profilático e também quando utilizado durante e depois da exposição solar da pele<sup>(27,35–37)</sup>. A maioria dos relatos da literatura estão associados com a melhora/redução dos efeitos causados pela radiação ultravioleta B, sendo que a literatura é menos extensa em relação aos efeitos exclusivamente da radiação UVA<sup>(38,39)</sup>. Além disso, os efeitos observados estão associados a uma ação

preventiva, isto é, aplicação prévia do extrato em relação à exposição solar<sup>(40,41)</sup>. 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.

### 1.3 Fototerapia para rejuvenescimento

A ação exercida pela luz em tecidos é conhecida por fotobiomodulação, sendo que como efeito podem ocorrer modificações a nível celular e/ou tissular. O citocromo C oxidase existente nas mitocôndrias é um fotoreceptor mediador, isto é, uma molécula responsável pela absorção da radiação e o principal mediador da produção de moléculas que participam da cascata de sinalização<sup>(42-49)</sup>. O efeito biomoestimulador da luz está diretamente relacionado com suas propriedades, tais como o comprimento de onda, frequência e dose<sup>(50)</sup>. Desta forma, a luz estimula funções celulares por meio de modificações bioenergéticas, bioelétricas e bioquímicas<sup>(51,52)</sup> como aumento da atividade celular, aumento na produção de ATP mitocondrial, liberação de fatores de crescimento, proliferação de diversas células<sup>(53-56)</sup>, estímulo à divisão celular, rápida produção de matriz extracelular, migração de células epiteliais, fibroblastos e leucócitos, aumento da atividade fagocitária de macrófagos<sup>(54,57)</sup>. Além disso, induz atividade mitótica das células do epitélio, inibe secreção de mediadores químicos e estimula microcirculação local<sup>(51,58)</sup>.

Existem relatos do uso de LED vermelho na pele fotoenvelhecida, sendo que foram observadas a redução de rugas moderadas, melhora na textura da pele, estímulo à síntese de colágeno e elastina, aumento da elasticidade da pele, além de inibir a atividade de metaloproteinases<sup>(50,59-61,62-64)</sup>. Em um estudo clínico realizado por Lee e colaboradores foi verificada a redução de rugas, melhora na elasticidade e redução nos níveis de melanina em grupos tratados com LED ( $633 \pm 6$  nm; 105 mW/cm<sup>2</sup>). A terapia LED induziu a produção inicial de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (agentes pró-inflamatórios) que induzem as metaloproteinases, capazes de remover o colágeno degradado na pele fotoenvelhecida. Na sequência, os níveis das metaloproteinases se normalizam havendo a formação de novas fibras de colágeno<sup>(59)</sup>.

Com a conhecida potencialidade da fotobiomodulação na ação rejuvenescedora e o efeito antioxidante dos extratos vegetais, a associação de fontes naturais de antioxidantes e fototerapia mostra-se estratégia interessante para promover o rejuvenescimento da pele. Sommer e colaboradores realizaram a aplicação de luz LED (670 nm, 4 J/cm<sup>2</sup>) em área de 10 cm<sup>2</sup> ao redor dos olhos de pacientes após a administração tópica de chá verde por 20 minutos, diariamente durante 30 dias e verificaram que a combinação dos efeitos biológicos da luz com a ação antioxidante do chá verde resultou na redução significativa das rugas<sup>(66)</sup>.

Diante deste contexto, o presente estudo busca contribuir para a identificação de extratos vegetais que retardem os efeitos da radiação na pele, associados ou não à fototerapia, em queratinócitos humanos em cultura submetidos ao dano fotoinduzido por radiação UVA.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais:**

Padronizar parâmetros experimentais para avaliar o efeito de extratos naturais e ação de luz LED vermelha em queratinócitos humanos normais imortalizados submetidos à radiação UVA.

### **2.2. Objetivos Específicos:**

- Definir o tempo de exposição à radiação UVA suficiente para causar até 20 % de morte celular de queratinócitos humanos normais imortalizados em cultura;
- Avaliar as concentrações de extratos naturais que não induzem toxicidade em queratinócitos humanos normais imortalizados em cultura e que possam apresentar efeitos reparadores;
- Determinar o tempo máximo de exposição à luz LED suficiente para não causar morte celular.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAIS**

##### **3.1.1 Extratos vegetais**

Os extratos vegetais que foram utilizados neste projeto foram gentilmente cedidos pela empresa Bioextract Farma Service LTDA. Os extratos foram pré-selecionados conforme sua composição, procurando selecionar um extrato representativo de cada uma das famílias fitoquímicas: Flavonas (alecrim e camomila), Antocianinas (mirtilo), Catequinas (chá verde), Cumarinas (figo), Tanino Elágico (Romã) e Tanino Gálico (Nogueira). Todos os extratos são veiculados em meio Hidroglicólico – HG, composto por água, etanol e propilenoglicol em proporção que varia ligeiramente entre os extratos, uma vez que a mesma é otimizada para a extração dos componentes e sua estabilidade. O veículo HG foi utilizado como comparação em todos os experimentos.

##### **3.1.2 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, Gotinga, 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). No caso do tratamento com os extratos, a interação de seus componentes com o SFB poderia reduzir a disponibilidade dos mesmos e interferir nos resultados; deste modo, apenas 1% de SFB é utilizado, para que reduza estas interações. O SFB não é retirado totalmente para que não haja privação nutricional. A suplementação a 10 % é praticada como protocolo em cultura celular, com o intuito de oferecer às células em cultura condições que favoreçam o crescimento celular. Após filtração, o DMEM foi ainda 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim Biotech-Gotinga, Alemanha) armazenada sob congelamento.

As garrafas de cultura utilizadas (75  $\text{cm}^2$ ) foram adquiridas da Sarsted (Nümbrecht, Alemanha) e as placas de cultura de 48 poços tratadas foram adquiridas da KASVI (Curitiba/Brasil).

### 3.1.3 Sistema de irradiação UVA:

Para a irradiação na região do UVA foi utilizado um irradiador composto por lâmpadas emitindo na região de  $366 \pm 10 \text{ nm}$  (**Figura 3**), com densidade de potência de  $2,5 \text{ mW}/\text{cm}^2$ .

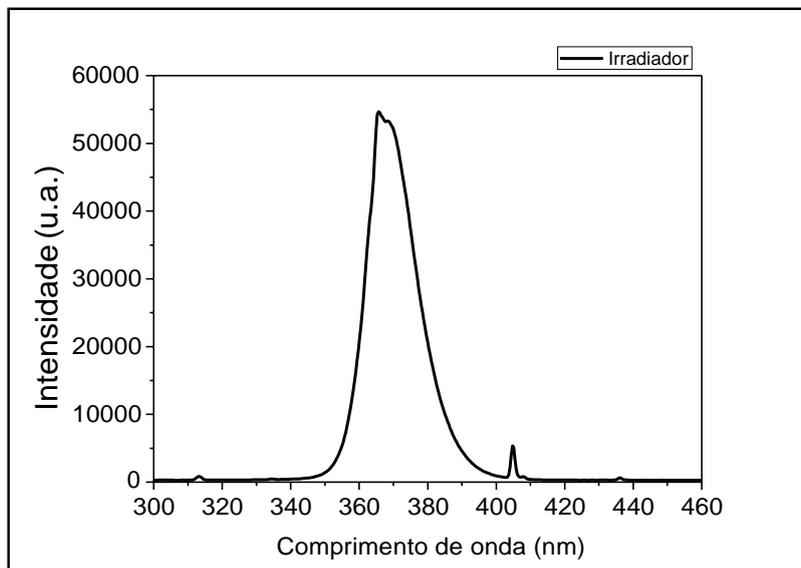
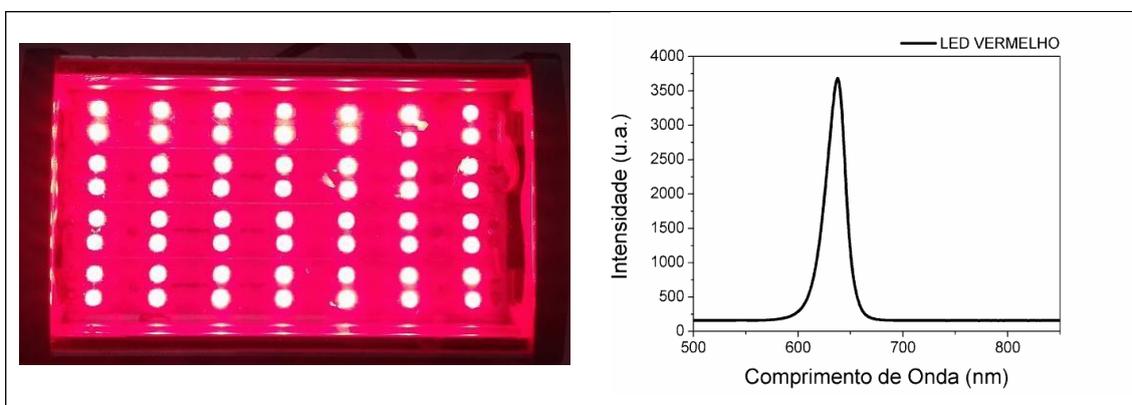


Figura 3: Espectro de emissão do irradiador UVA.

### 3.1.4 Sistema de irradiação LED:

Foi utilizado um refletor de LED (Figura 4) da marca Condulai (São Paulo/SP) com máximo de emissão em  $640 \text{ nm} \pm 12,5 \text{ nm}$ ,  $2,6 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ,

posicionado exatamente acima da placa. O sistema é composto por 56 LEDs dispostos homogeneamente na área do refletor.



**Figura 4: Sistema de Irradiação.** Esquerda: Sistema posicionado acima da placa como foi utilizado nos experimentos, Direita: Espectro de emissão do sistema LED.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Cultivo celular

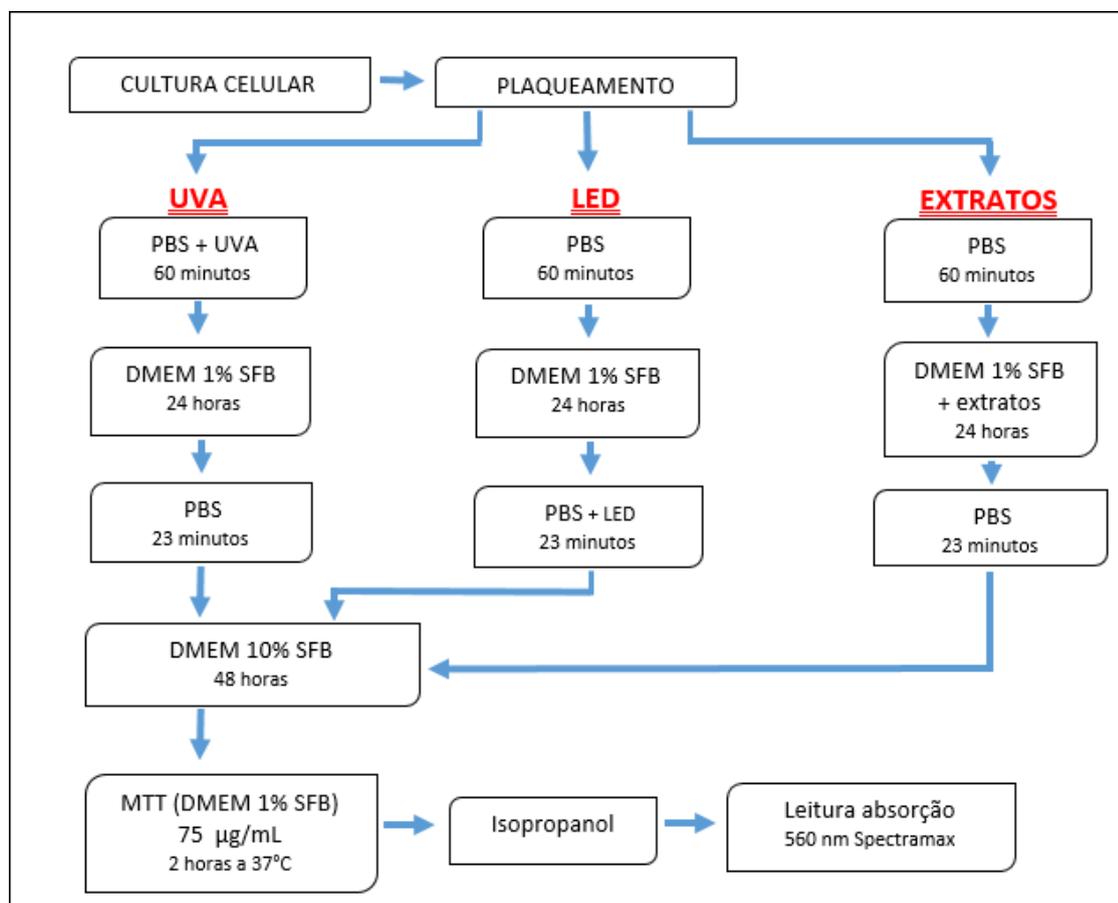
As células HaCat foram armazenadas sob criopreservação na densidade de  $1,0 \times 10^6$  células/mL. O processo de descongelamento contemplou a transferência total do conteúdo de um tubo criogênico para um tubo contendo 10 mL de DMEM suplementado a 10 % SFB e 0,1 % de antibiótico. As células então eram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 1.200 rpm e ressuspendidas em 10 mL de DMEM a 10 % SFB, transferidas para uma garrafa de 75 cm<sup>2</sup> e mantidas em incubadora (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, atmosfera úmida).

Observando 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 10 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 interrompida 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.

Na etapa de plaqueamento foram utilizadas placas de 48 poços, trabalhando na densidade de 60.000 células por poço que após aderência foram submetidas aos tratamentos.

### 3.2.2 Padronização dos parâmetros

De forma a facilitar a visualização das metodologias descritas abaixo, a Figura 5 apresenta um desenho experimental do estudo.



**Figura 5: Esquema geral dos experimentos.** Foram utilizadas placas de 48 poços (60.000 células/poço) e volume de trabalho de 400µL.

#### 3.2.2.1 Viabilidade dos queratinócitos após exposição à radiação UVA

Após cultura celular apresentando em torno de 85 % de confluência as células HaCaT foram semeadas 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 400 µL de PBS, sendo submetidas a diferentes tempos de exposição à radiação UVA (0 – 2 horas). Ao término da exposição, o PBS foi retirado, as células foram mantidas em 400 µL de PBS durante 24 horas e, após esse período, receberam DMEM 10 % SFB (400 µL) por 48 horas em incubadora, quando foi realizado o ensaio colorimétrico para determinação da viabilidade celular com uso do MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio, com algumas modificações<sup>(67)</sup>.

As células foram lavadas em PBS, sendo que os poços foram incubados com MTT 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em DMEM suplementado com 1 % SFB por 2 horas em incubadora. As soluções foram aspiradas e foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol aos poços. Para determinação da porcentagem de células viáveis foi realizada a leitura de absorvância em 560 nm em um leitor de placas (Spectramax – Molecular devices) e os valores de absorvância para as células controle foram considerados como 100 % de células viáveis e comparados aos valores das amostras.

### **3.2.2.2 Viabilidade dos queratinócitos após exposição aos extratos naturais**

As células HaCaT foram semeadas 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 colocado 400  $\mu\text{L}$  para deixa-las no escuro (não foram submetidas à irradiação UVA) cobertas por papel alumínio e deixadas fora da incubadora por 60 minutos. Ao finalizar o tempo da simulação do UVA, as células foram tratadas com extratos naturais diluídos em DMEM 1 % SFB em diferentes concentrações (de 0,05 a 0,5 % v/v) por 24 horas em incubadora. Após este período, retira-se a solução de tratamento, lavavam-se as células com PBS e adiciona-se DMEM 10 % SFB, por mais 48 horas. Por fim, realiza-se o ensaio colorimétrico MTT, descrito anteriormente.

### **3.2.2.3 Viabilidade dos queratinócitos tratados com LED**

As células HaCaT foram semeadas em placas de 48 poços na densidade de 60000 células/poço. Após 18-24 horas, o meio de cultivo foi retirado, as células foram lavadas com PBS e mantidas em 400 $\mu\text{L}$  de PBS por 60 (sessenta) minutos no escuro para simular a exposição ao UVA. O PBS foi retirado e as células foram mantidas em 400  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de DMEM 1 % SFB por 24 horas para simular o tempo de aplicação de extratos. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS e mantidas em 400  $\mu\text{L}$  de PBS, sendo submetidas à diferentes tempos de tratamento com LED (0 – 23 minutos). Ao término da exposição, o PBS foi retirado e as células receberam DMEM 10 % SFB por mais 48 horas. Por fim, realiza-se o ensaio colorimétrico MTT, descrito anteriormente.

### 3.2.3 Análise Estatística

A variável primária do estudo foi a porcentagem de células vivas determinada por meio da medida colorimétrica por utilização do MTT. O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para testar a normalidade dos dados. Os dados paramétricos foram expressos em média e desvio padrão (Média  $\pm$  DP) e foi utilizado o teste ANOVA com *posthoc* de Bonferroni para análise inferencial. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O programa utilizado para os testes foi o IBM SPSS Statistics® versão 22.

#### **4. RESULTADOS**

Manuscrito a ser submetido à revista *Photomedicine and Laser Surgery*, fator de impacto 1,631, classificação B2 na área de Medicina II onde o P.P.G. Biofotônica está inserido (APÊNDICE 1).

## 5. DISCUSSÃO

Sabendo-se da importância dos parâmetros de irradiação como a exposição radiante, bem como da possibilidade de toxicidade dos extratos naturais, o estabelecimento dos parâmetros experimentais para combinação de extratos naturais e fotobiomodulação é essencial.

Foi estabelecido o tempo de exposição de 60 minutos, sendo que a exposição radiante é de  $9 \text{ J/cm}^2$ , com queda na viabilidade de aproximadamente 20 %. Huynh e colaboradores verificaram queda de 50 % na viabilidade de queratinócitos (HaCat) com exposição radiante de  $20 \text{ J/cm}^2$ . Neste sentido, acredita-se que o irradiador que foi idealizado pelo grupo mostra-se adequado para realização dos estudos e que os resultados obtidos são plausíveis com os valores encontrados na literatura<sup>(68)</sup>.

Outros estudos utilizaram a exposição radiante de  $20 \text{ J/cm}^2$ . Com o intuito de verificar o efeito protetor da cicloheterofilina em fibroblastos após a exposição ao UVA, Huang e colaboradores utilizaram uma maior exposição radiante,  $20 \text{ J/cm}^2$ , porém partiram de um dano celular de aproximadamente 70 %<sup>(69)</sup>. Similarmente, Chan e colaboradores utilizaram  $20 \text{ J/cm}^2$  em células epiteliais da retina, causando 50% de morte celular<sup>(70)</sup>. Por outro lado, Xu e colaboradores utilizaram a exposição radiante de  $10 \text{ J/cm}^2$  por resultar em aproximadamente 90% de fibroblastos viáveis e ausência de alterações morfológicas. Nestas condições eles mostraram aumento na expressão de Catepsina K que tem papel na degradação intracelular de elastina, enquanto os efeitos imediatos da exposição à radiação ultravioleta na pele são eritema e pigmentação enquanto os efeitos à curto-médio prazo são o fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese<sup>(71)</sup>. Uma dose eritematosa mínima (DEM) é considerada  $20 \text{ J/cm}^2$ <sup>(72)</sup> Desta forma, a utilização de  $9 \text{ J/cm}^2$  de UVA seria menor que uma dose eritematosa mínima e os efeitos avaliados no trabalho seriam associados à resposta celular frente a uma exposição solar considerada segura. Lavker e colaboradores mostraram que utilizando doses diárias de 0,5 DEM, houve resposta eritematosa cumulativa, com hiperplasia epidermal e espessamento do estrato córneo, presença de infiltrados inflamatórios e deposição de lisozima nas fibras de elastina<sup>(73)</sup>. Neste sentido, o entendimento dos efeitos iniciais da radiação UVA nas células que constituem a pele (em especial fibroblastos e queratinócitos) é

essencial para desenvolver estratégias para minimizá-los.

Sabe-se que a radiação UVA gera espécies reativas de oxigênio em queratinócitos e gera inflamação, além de aumentar a atividade das metaloproteinases que degradam de forma acelerada o colágeno e fibras elásticas, levando à formação de rugas<sup>(72)</sup>. Também já foram observadas lesões em DNA e indução da apoptose após a exposição UVA como consequência da produção e espécies reativas de oxigênio<sup>(69,74)</sup>. A utilização dos extratos naturais associados à fotobiomodulação será realizada em um estudo futuro avaliando parâmetros como estresse oxidativo, a resposta inflamatória e a expressão/atividade de metaloproteinases.

Os extratos utilizados são produtos comerciais, produzidos e comercializados pela empresa Farma Service Bioextract, que gentilmente nos forneceu os extratos e dados associados ao seu controle de qualidade. Estes extratos estão veiculados em HG sendo que o mesmo não apresenta toxicidade nas concentrações testadas (dados não apresentados), desta forma, qualquer toxicidade apresentada pelos extratos provém única e exclusivamente de seus componentes, sem influência do veículo. Quanto à avaliação dos extratos, foi observada relação dose-dependente, isto é, o aumento da concentração de extrato resultou em maior toxicidade, sendo que cada um dos extratos tem uma concentração ótima de trabalho, para que não haja toxicidade. Os extratos de Camomila, Figo e Mirtilo não apresentam toxicidade a 0,3 %; Chá verde, Alecrim e Nogueira a 0,1 %, enquanto que Romã deverá ser avaliada em concentrações menores que 0,05 %, pois mesmo nesta concentração apresenta toxicidade de 30 %. Foi observado que a toxicidade dos extratos mostrou uma relação com o conteúdo de polifenóis totais dos mesmos. Os extratos com menor toxicidade, Camomila, Figo e Mirtilo, tem PFT abaixo de 1 g/kg de extrato. Chá verde, Alecrim e Nogueira que apresentaram toxicidade intermediária apresentam PFT de aproximadamente 5 g/kg de extrato. Já o extrato de Romã, o mais citotóxico de todos, tem PFT acima de 15 g/kg de extrato.

Os polifenóis têm sido considerados importantes agentes anti-inflamatórios<sup>(75)</sup>, indutores de parada de ciclo celular e apoptose<sup>(76)</sup>. O efeito citotóxico de extratos tem sido avaliado frequentemente em linhagens tumorais com o intuito de usá-los como agentes antitumorais porém existem relatos que o efeito em células normais é similar ao verificado em tumorais<sup>(76-78)</sup>. O

mecanismo associado ao efeito citotóxico ainda não é bem descrito na literatura. Sabe-se que os polifenóis reagem com proteínas e poderiam alterar funções celulares<sup>(79)</sup>. A resposta biológica que tem sido observada é parada de ciclo celular e morte celular por apoptose, mas ainda não foi mostrado se estes eventos estão interligados<sup>(80)</sup>.

Os compostos fenólicos tendem a doar um elétron ou um átomo de hidrogênio à um radical livre, convertendo-o em uma molécula inofensiva. Desta forma apresentam atividade antioxidante bastante relevante<sup>(81)</sup>. Devido à sua capacidade antioxidante, os extratos naturais podem reduzir o estresse oxidativo induzido pela exposição ao UVA, protegendo a pele dos efeitos danosos.

Por fim, precisava-se determinar o tempo de exposição ao LED. O efeito fotobiomodulador em cultura celular pode variar em função de diversos fatores, tais como: dose de energia, densidade de potência e tipo de célula. Esses parâmetros aplicados em valores mais elevados do que os adequados podem causar efeitos adversos em células, tais como danos estruturais ao DNA e aumento de EROs<sup>(82)</sup>. Foi adotado o tempo de 7 minutos de exposição ao LED ( $1,0 \text{ J/cm}^2$ ), pois deseja-se utilizar uma quantidade de energia adequada para induzir a fotobiomodulação, não induzir perda de viabilidade. Acredita-se que exposição radiante de  $1,0 \text{ J/cm}^2$  seja suficiente para induzir fotobiomodulação uma vez que Zhang e colaboradores (2003) verificaram regulação direta de genes específicos relacionados à síntese, reparo e metabolismo celular quando fibroblastos normais submetidos ao LED vermelho (628 nm) por 3 dias com uma dose total de  $0,88 \text{ J/cm}^2$  <sup>(83)</sup>. Kim e colaboradores, utilizando LED vermelho (633 nm), mostraram aumento de procolágeno do tipo I, redução em metaloproteinases (MMP-1 e MMP-2), além da redução na expressão de genes inflamatórios (COX-2 e IL1- $\alpha$ ). Apesar de valores de exposição radiante que causaram este efeito serem da ordem de  $4\text{-}12 \text{ J/cm}^2$ ; a irradiância utilizada era muito baixa ( $5 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$  e  $47,5 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$ ) sendo necessário entre 24 e 72 horas de iluminação, o que não seria viável em um protocolo clínico<sup>(84)</sup>. Já Tian e colaboradores mostraram que, após a exposição de fibroblastos ao UVB, o tratamento com LED 630 nm aumentou a quantidade relativa de células sendo que  $1 \text{ J/cm}^2$  foram suficientes para causar este efeito. Além disso, a expressão do colágeno tipo I aumentou e a expressão da metaloproteinase-1 diminuiu<sup>(85)</sup>

## 6. CONCLUSÕES

Sabendo-se da importância dos parâmetros de irradiação como a exposição radiante, bem como da possibilidade de toxicidade dos extratos naturais, o estabelecimento dos parâmetros experimentais para combinação de extratos naturais e fotobiomodulação é essencial. Diante dos resultados obtidos, as células serão expostas à 9 J/cm<sup>2</sup> de UVA para simular o dano causado pela exposição solar, 1 J/cm<sup>2</sup> de LED para desencadear o efeito fotobiomodulador e, dependendo do conteúdo polifenólico de cada extrato, receberão entre 0,01 e 0,3 % de extratos. Estes parâmetros serão utilizados em estudos futuros que avaliarão medidas como o estresse oxidativo, inflamação e expressão/atividade de metaloproteinases.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Neill US. Skin care in the aging female: myths and truths. *J Clin Invest.* 2012;122(2):473–7.
2. Ribeiro C. *Cosmetologia aplicada e dermoestética.* Pharmabooks. 2006. p. 09–15.
3. Damiani E, Rosati L, Castagna R, Carloni P GL. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. *Nature.* 2006;83:204–2013.
4. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens—Part D: radiation. *Lancet Oncol.* 2009;10(8):751–2.
5. Honigsmann H. Phototherapy for psoriasis. *Clin Exp Dermatol. Clin. Exp. Dermatol;* 2001;26(4):343–50.
6. Sliney DH. Radiometric quantities and units used in photobiology and photochemistry: recommendations of the Commission Internationale de“Eclairage” (international Commission on Illumination). *Photochemistry and Photobiology.* 2007;83: 425–32.
7. 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.
8. Dal 'belo S. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e Ginkgo biloba. Universidade de São Paulo; 2008.
9. Shaath NA. The Chemistry of sunscreens. *Sunscreen, development, evaluation and regulatory aspects.* 1997. p. 263–83.
10. Magalhães J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. In: Rubio, editor. *Cosmetologia: com questões de avaliação.* Rio de Janeiro; 2000. p. 33–42.
11. Karagas MR, Stukel TA, Greenberg ER, Baron JA, Mott, LA, Stern R. Risk of subsequeute Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the skin among patients with prior skin câncer, Skin câncer prevention study group. *JAMA.* 1992;267(24):3305–10.

12. Juchem PP, Hochberg J, Ardenghy M, S RE, Virginia W. Riscos a Saude da Radia ( jao Ultravioleta. 1998;47–60.
13. Pietta P. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63:1035–42.
14. Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(1):1–19.
15. Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schüller J, Scharffetter-Kochanek K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B.* 2001;63(1-3)(41-51).
16. Ksotarczak K, Mankowska AO, Lodyga M, Polanska A, Mazur M, Adamski Z. Photoprotection: facts and controversies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19:98–112.
17. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature.* 2003;421:436–4340.
18. Lu Y, Lou Y, Yen P, Mitchell D, Huang M, Conney A. Time course for early adaptive responses to Ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice. *Cancer Res.* 1999;59:4591–602.
19. Clancy S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *nATURE eDUCATION.* 2008;1(1):103.
20. 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.
21. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;195: 298–308.
22. Trevithick JR, Xiong H, Lee S, Shum DT, Sanford SE, Karlik SJ, Norley C, Dilworth GR. Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice. *Arch Biochem Biophys.* 1992;296(2):575–82.
23. Fitzpatrick RE, Goldman MP, Satur NM, Tope W. Pulsed carbon dioxide laser resurfacing of photoaged facial skin. *Arch dermatol.* 1996;132:(4):395–402.
24. Krutmann BAGJ, Cosendey CH. Envelhecimento cutâneo. Tânia Ludm. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. 259 p.
25. Buchli L. Radicais livres e antioxidantes. *Cosmet Toiletries.* 2002;14(2): 54–7.
26. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC.

- Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol.* 2012;4(3):308–19.
27. Panda H. *Aloe Vera Handbook Cultivation, Research Finding, Products, Formulations, Extraction and Processing.* Asia Pacific Bus Press Inc. 2003;
  28. Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Albina JE. Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol.* 2005;174(4):226.
  29. 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.
  30. Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretzschmar K, Simons BD, Charalambous M, Ferron SR, Herault Y, Pavlovic G, Ferguson-Smith AC, WATT FM. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature.* 2013;504:277.
  31. Matsui MS, Hsia A, Miller JD, Hanneman K, Scull H, Cooper KD, Baron E. Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology and European Society for Dermatological Research.* 2009;14(1):56–9.
  32. Elmetts CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Mukhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:425–32.
  33. Katiyar S. Dietary proanthocyanidins inhibit UV radiation-induced skin tumor development through functional activation of the immune system. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(6):1374–82.
  34. Katta R, Brown DN. Diet and Skin Cancer: The Potential Role of Dietary Antioxidants in Nonmelanoma Skin Cancer Prevention. *J Skin Cancer.* 2015;
  35. Thornfeldt C. Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future. *Dermatol Surg.* 2005;31:873–80.
  36. 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.* 2006;v. 52, n.:383–8.
  37. Korac RR, Khambholja KM. Potential of herbs in skin protection from

- ultraviolet radiation. *Pharmacogn Rev.* 2012/01/27 ed. 2011;5(10):164–73.
38. Kim HK. Protective Effect of Garlic on Cellular Senescence in UVB-Exposed HaCaT Human Keratinocytes. *Nutrients.* 2016;8:464.
  39. Decean H, Fischer-fodor E, Tatomir C, Perde-schrepler M, Somfelean, L, Burz C, Hodor T, Orasan R, Virag P, Vinifera V. Seeds extract for the modulation of cytosolic FACTORS BAX- $\alpha$  and NF-KB involved in UVB-induced oxidative stress and apoptosis of human skin cells. *Clujul Med.* 2016;89:1: 72–81.
  40. Gasparrini M, Forbes-hernandez TY, Afrin S, Alvarez-suarez JM, Gonzàlez-paramàs AM, Santos-buelga C, Bompadre QJL, Mezzetti B, Giampieri F. A Pilot Study of the Photoprotective Effects of Strawberry-Based Cosmetic Formulations on Human Dermal Fibroblasts. *Int J Mol Sci.*
  41. Saito Y, Tsuruma K, Ichihara K, Shimazawa M, Hara H. Brazilian green propolis water extract up-regulates the early expression level of HO-1 and accelerates Nrf2 after UVA irradiation. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2015;15:421.
  42. 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, 559–67.
  43. Karu T. Ten Lectures on Basic Science of Laser Phototherapy. Grangesberg, Sweden: Prima Books; 2007.
  44. Karu T. Low power laser therapy. *Biomedical Photonics Handbook.* 2003. p. 48–1 – 48–25.
  45. Kato M, Shinizawa K, Yoshikawa S. Cytochrome oxidase is a possible photoreceptor in mitochondria. *Photobiochem Photobiophys.* 1981;2:263–9.
  46. Karu T. Cytochrome c-oxidase acts as a primary photoacceptor in cell cultures subjected to visible and near IR laser irradiation. *Dokl Biochem Moscow.* 1995;342:84–6.
  47. Pastore D, Greco M, Passarella S. Specific He-Ne laser sensitivity of the purified cytochrome c-oxidase. *Int J Radiat Biol.* 2000;63:1035–42.
  48. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(332-340).

49. 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;280:4761–71.
50. Oguz O. Treatment with LEDs: A New Perspective in phototherapy. *J Turk Acad Dermatol.* 2009;3 (1):93101.
51. 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.
52. Collins T. Inflamacao aguda e cronica. In: Cotran K, Robbins C, Abbas AK, Kumar V, Fausto N. *Patologiaestrutural e funcional.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 44-78 p.
53. Catão MHCV. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral.* 2004;3:214–8.
54. Rocha Jr, AM Vieira, BJ Andrade, LCF Aarestrip F. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. *J Vasc Bras.* 2007;6 n°3(258-265).
55. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alan M. Low- level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005;31:334–9.
56. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, D’Hoedt B. 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).
57. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation ofwound healing by low-energy laser irradiation. *J ClinPeriodontol.* 1996;23:492–6.
58. Bourguignon AMF, Feitosa RCA, Beltrao GC, Pagnoncelli MR. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrizacao tecidual. 2005;46:37–43.
59. Lee SY, Park KH, Choi JW, Kwon JK, Lee DR, Shin MS, Lee JS, You CE, Park MY. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blinded, and split-face clinical study on LED phototherapy for skin rejuvenation: Clinical,profilometric, histologic, ultrastructural, and biochemical

- evaluations and comparison of three different treatments. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2007;51–67.
60. Wunsch A, Matuschka K. A Controlled Trial to Determine the Efficacy of Red and Near-Infrared Light Treatment in Patient Satisfaction of Fine Lines, Wrinkles, Skin Roughness, and Intradermal Collagen Density Increase. *Photomed Laser Surg.* 2014;32(2):93–100.
  61. Barolet CJ, Robege FA, Bouche A, Germain L. . 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.* 2009;129:2751–9.
  62. Jr Bitter PH. Noninvasive rejuvenation of photo damaged skin using serial, full-face intense pulsed light treatment. *Dermatol Surg.* 2000;26:836–43.
  63. Goldberg DJ, Cutler KB. Non-ablative treatment of rhytides with intense pulsed light. *Lasers Surg.* 2000;26:196–200.
  64. Hernandez-perez E, Ibeitt E. Gross and microscopic findings in patients submitted to non–ablative full face resurfacing using intense pulsed light: a preliminary study. *Dermatol Surg.* 2002;28:651–5.
  65. Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli GM, Bellew SG. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg.* 2005;31:1199–205.
  66. Sommer AP, Zhu D. Green Tea and Red Light— A Powerful Duo in Skin Rejuvenation. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(6):969–71.
  67. 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.
  68. 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.
  69. Huang CH, Li HJ, Wu NL, Hsiao CY, Lin CN, Chang HH, Hung CF. Photoprotective Effects of Cycloheterophyllin against UVA-Induced Damage and Oxidative Stress in Human Dermal Fibroblasts. *Plos one.* Birmingham; 2016;
  70. Chan CM, Huang CH, Li HJ, Hsiao CY, Su CC, Lee PL, Hung CF. Protective Effects of Resveratrol against UVA-Induced Damage in ARPE19

- Cells. *Int J Mol Sci.* 2015;16:5789–802.
71. Battie C, Verschoore M. Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage. *Indian J Dermatology Venereol Leprol.* 2012;78(7):9–14.
  72. Ichihashi M, Ando H. The maximal cumulative solar UVB dose allowed to maintain healthy and young skin and prevent premature photoaging. *Exp Dermatol.* 2014;1:43–6.
  73. Lavker RM, Gerberick GF, Veres D, Irwin CJ, Kaidbey KH. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J Am Acad Dermatol.* 1995;32(1):53–62.
  74. Veselská R, Janisch R. The effect of UV irradiation on changes in cytoskeleton and viability of mouse fibroblasts L929 cell line. *Scr Medica.* 2000;73(December):393–408.
  75. Maeda H, Yamazaki M, Katagata Y. Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil inhibits LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77 (3):482–6.
  76. Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M, Choudhary B, Raghavan SC. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Sci Rep.* 2016;6.
  77. Nemati F, Dehpouri AA, Eslami B, Mahdavi V MS. *Iranian Red Crescent Medical Journal.* 2013;15(11).
  78. Weaver J, Briscoe T, Hou M, Goodman C, Kata S, Ross H, McDougall G, Stewart D, Riches A. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. 2009;
  79. Delfino RA, Canniatti-Brazaca SG. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade proteica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciênc Tecnol Aliment Campinas.* 2010;30(2):308–12.
  80. Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *J Biomed Biotechnol.* 2009;
  81. Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *J Mol Sci.* 2015;16(10):24673–706.

82. Al Ghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2011;27:237–49.
83. Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol.* 2003;120(5):188–92.
84. Kim HS, Park WS, Baek JI, Lee BS, Yoo DS. Continuous irradiation with a 633-nm light-emitting diode exerts an anti-aging effect on human skin cells. *Int J Mol Med.* 2015;35:383–90.
85. 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.

## APÊNDICES

Manuscrito a ser traduzido e submetido à publicação.

### **Efeito da Combinação de Extratos Naturais com Fotobiomodulação em queratinócitos submetidos à radiação UVA: Padronização de Método**

Elineides Santos Silva<sup>1</sup>, Gabriela Benedito Machado<sup>1</sup>, Adriana Lino dos Santos Franco<sup>1</sup>, Christiane Pavani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Nove de Julho-UNINOVE. Departamento de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde. São Paulo, SP, Brasil.

Christiane Pavani: [chrispavani@gmail.com](mailto:chrispavani@gmail.com)

Programa de Pós Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho/UNINOVE - R. Vergueiro, 235/249, CEP 01504-001- São Paulo, Brazil Phone: +55 (11) 3385-9222

## Resumo

A pele apresenta diversas funções como revestimento, controle de temperatura, eliminação de substâncias químicas, etc. A exposição da pele à radiação ultravioleta provoca alterações associadas com o envelhecimento e o câncer de pele. Estudos demonstram que extratos vegetais com propriedades antioxidantes minimizam os efeitos do fotoenvelhecimento; paralelamente, o efeito bioestimulador da luz visível pode promover modificações bioenergéticas, bioelétricas e bioquímicas promovendo redução das alterações promovidas pela radiação ultravioleta. Neste sentido, a associação de fontes naturais de antioxidantes e fotobiomodulação mostra-se estratégia interessante para promover o rejuvenescimento da pele. O objetivo do projeto é padronizar os parâmetros do protocolo experimental para avaliar o efeito da combinação de extratos naturais e fotobiomodulação em queratinócitos humanos normais imortalizados submetidos à radiação UVA. Foram utilizados uma série de extratos naturais: Camomila, Alecrim, Mirtilo, Chá verde, Figo, Romã e Nogueira. Para simular a exposição solar foi utilizado um sistema irradiador caseiro ( $366 \pm 10$  nm,  $2,5$  mW/cm<sup>2</sup>). Para fototerapia foi utilizado um sistema de Diodos Emissores de Luz ( $640 \pm 12,5$ nm,  $2,6$  mW/cm<sup>2</sup>). A avaliação da viabilidade foi realizada pelo método do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio). Com base nos resultados obtidos, o tempo de exposição ao UVA foi definido como 60 minutos para que haja no máximo 20 % de morte celular em relação ao grupo não exposto à radiação. Para fotobiomodulação, o tempo de exposição ao LED foi definido em 7 minutos considerando que esse tempo não promove morte celular estatisticamente significativa. Em termos das concentrações de extratos, as mesmas foram estabelecidas com base na toxicidade apresentada, sendo que quando maior o conteúdo polifenólico, maior a toxicidade. Este protocolo experimental será utilizado em futuros estudos.

**Palavras chaves:** Fotoenvelhecimento da pele, fotorejuvenescimento, extratos naturais, antioxidantes, fotobiomodulação.

## Introdução

A pele apresenta diversas funções, entre elas a de revestimento, controle de temperatura, absorção dos raios ultravioleta, eliminação de substâncias químicas, etc. As alterações cutâneas associadas ao envelhecimento precoce são oriundas da exposição à radiação ultravioleta (UV), especialmente do tipo A (315-400 nm) que apresenta capacidade de penetração mais profunda atingindo as camadas basais da epiderme<sup>1</sup>. Os danos causados pela radiação UVA na pele são danos oxidativos e estão associados à produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que podem causar danos aos lipídeos, proteínas e DNA.<sup>2-4</sup> O sistema antioxidante do organismo é capaz de eliminar as EROs naturalmente, mas o desbalanço redox, resultante da exposição prolongada à luz UVA, pode causar efeitos indesejáveis como inflamação, eritema, queimadura, imunossupressão e fotoenvelhecimento,<sup>5-7</sup> sendo este último um processo resultante do desgaste celular causando perda da viabilidade e capacidade funcional.

Extratos vegetais ricos em constituintes polifenólicos vêm sendo utilizados amplamente em produtos anti-envelhecimento uma vez que devido à sua atividade antioxidante, podem exercer neutralizar a ação dos radicais livres.<sup>8-12</sup> Outras substâncias ativas presentes nos extratos vegetais podem ser empregados com esta mesma finalidade, tais como vitaminas A, C e E.<sup>13-15</sup> A literatura relata o efeito benéfico da utilização de extratos vegetais associados à exposição solar em modelos de células e animais, resultando em atividade fotoprotetora, reparadora e profilática quando utilizado durante e após exposição solar.<sup>16-20</sup>

Outra forma terapêutica que pode ser utilizada para reduzir os efeitos do fotoenvelhecimento é a fotobiomodulação, que pode ser definida como a ação exercida pela luz com estímulo às funções celulares por meio de modificações bioenergéticas, bioelétricas e bioquímicas.<sup>21-23</sup> Existem relatos do uso de LED vermelho na pele fotoenvelhecida, observando redução de rugas moderadas, melhora na textura da pele, estímulo à síntese de colágeno e elastina, aumento da elasticidade da pele, além de inibir a atividade de metaloproteinases.<sup>24-27</sup>

Com a conhecida potencialidade da fotobiomodulação na ação

rejuvenecedora e o efeito antioxidante dos extratos vegetais, a associação entre estas terapêuticas mostra-se estratégia interessante para retardar os efeitos do fotoenvelhecimento. Porém, ainda não se sabe quais os efeitos da combinação destas terapias. Diante deste contexto, o presente estudo tem por objetivo a padronização de parâmetros experimentais para avaliar o efeito de extratos naturais, associados à fotobiomodulação com luz vermelha, em queratinócitos humanos normais imortalizados submetidos à radiação UVA.

## **Materiais e Métodos**

### **MATERIAIS**

Os extratos vegetais utilizados neste projeto foram gentilmente cedidos pela empresa Bioextract Farma Service LTDA. Os extratos utilizados foram alecrim, camomila, mirtilo, chá verde, figo, romã, noqueira. Todos os extratos são veiculados em meio HG que é composto por uma mistura de água, etanol e propilenoglicol. Também foram fornecidos os dados de polifenóis totais de cada um dos extratos. Para cultura celular foi utilizado o Meio de cultura Dulbecco's Eagle Modificado (DMEM- Vitrocell – Campinas, Brasil) alta glicose, suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB – Vitrocell- Campinas, Brasil) e solução penicilina-estreptomicina com antimicótico (Vitrocell- Campinas, Brasil) a 0,1 % (v/v). As garrafas para cultivo celular foram adquiridas da Sarsted (Nümbrecht, Alemanha) e as placas da Kasvi (Curitiba/Brasil). A tripsina foi adquirida da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Para lavar as células foi utilizado o tampão fosfato salino (do inglês PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH= 7,2) e antes do processo de tripsinização foi utilizado o tampão PBS com EDTA (0,5 g/L). Todos os reagentes para o preparo dos tampões foram adquiridos da Labsynth – Diadema/Brasil). Para determinação da porcentagem de células viáveis foi utilizado o equipamento Spectramax (Molecular Devices – Califórnia/EUA) e o brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT – Sigma/Aldrich Saint Louis, EUA). Para a irradiação na região do UVA foi utilizado um irradiador caseiro composto por lâmpadas emitindo entre 366 ± 10

nm, com densidade de potência de 2,5 mW/cm<sup>2</sup>. O sistema de irradiação LED utilizou um refletor de LED com máximo de emissão em 640 nm ± 12.5 nm, 2,6 mW/cm<sup>2</sup>, posicionado exatamente acima da placa.

## **MÉTODOS**

### **Cultivo celular**

Os queratinócitos humanos normais imortalizados, HaCaT (CLS, Eppelheim, Alemanha) foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> em DMEM 10 % SFB e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5 % CO<sub>2</sub>. As células HaCaT foram semeadas em placas de 48 poços na densidade de 60.000 células/poço, e após 18-24 horas foram submetidas aos tratamentos.

### **Padronização dos parâmetros**

#### **Viabilidade após exposição à radiação UVA**

As células foram lavadas e mantidas em PBS sendo submetidas a diferentes tempos de exposição à radiação UVA (0 – 180 minutos), mantendo-se o grupo controle não exposto à radiação. Ao término da exposição, as células foram mantidas em DMEM 1 % SFB por 24 horas e passado esse tempo o DMEM 1 % era retirado e adicionado DEMEM10 % SFB por 48 horas em incubadora, quando foi realizado o ensaio colorimétrico com MTT, com modificações.<sup>28</sup> De forma resumida, as células foram lavadas em PBS, e os poços foram incubados com MTT 75 µg/mL em DMEM 1 % SFB por 2 horas. As soluções foram aspiradas e foram adicionados 400µL de isopropanol aos poços. Para determinação da porcentagem de células viáveis foi realizada a leitura de absorbância em 560nm em um leitor de placas e os valores de absorbância para as células controle foram considerados como 100 % de células viáveis e comparados aos valores das amostras.

#### **Viabilidade após exposição aos extratos naturais**

As células foram lavadas e mantidas em PBS por 60 minutos no escuro (simulando o tempo de exposição ao UVA), sendo, na sequência, tratadas por 24

horas em incubadora com extratos naturais diluídos em DMEM 1 % SFB em concentrações entre 0,05 % e 0,5 % v/v. Após este período, as células foram lavadas com PBS e mantidas em DMEM 10 % SFB, por mais 48 horas. Por fim, realiza-se o ensaio colorimétrico MTT.

#### Viabilidade dos queratinócitos tratados com LED

As células foram lavadas PBS e mantidas em PBS por 60 minutos no escuro (simulando o tempo de exposição ao UVA). O PBS foi retirado e as células foram mantidas em 1 % SFB por 24 horas para simular o tempo de aplicação de extratos. Após 24 horas, as células foram lavadas e mantidas em PBS, sendo submetidas à irradiação com LED por tempos de 0 a 23 minutos. Ao término da exposição, o PBS foi retirado e as células foram mantidas em incubadora em DMEM 10 % SFB por mais 48 horas. Por fim, realiza-se o ensaio colorimétrico MTT.

#### **Análise estatística**

A porcentagem de células vivas foi a variável primária do estudo, submetida à análise estatística. O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para testar a normalidade dos dados. Os dados considerados gaussianos foram expressos em média e desvio padrão (Média  $\pm$  DP). Para a análise inferencial foi utilizado o teste ANOVA uma via com *posthoc* de Bonferroni. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O programa utilizado para os testes foi o SPSS Statistics® versão 22 (IBM – Nova Iorque/EUA).

#### **Resultados e Discussão**

##### Viabilidade dos queratinócitos após exposição à radiação UVA

Na figura 1 é possível observar que a viabilidade celular decresce à medida que o tempo de exposição é aumentado. Foi verificada redução estatisticamente significativa na viabilidade em relação ao controle a partir de 60 minutos de irradiação, sendo este o tempo escolhido para o protocolo experimental. Nesta situação o dano causado é de aproximadamente 20 %, de modo que seja possível

a recuperação celular. Considerando o tempo de exposição de 60 minutos, a exposição radiante é de 9 J/cm<sup>2</sup>. Huynh e colaboradores verificaram queda de 50% na viabilidade de queratinócitos (HaCat) em exposição radiante de 20 resultados que corroboram com os encontrados neste trabalho.

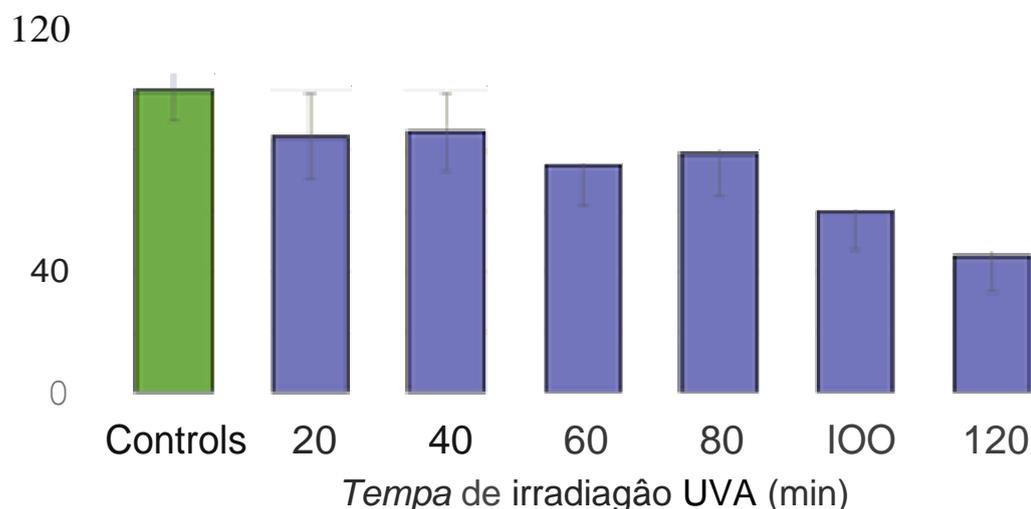


Figura 1. Viabilidade celular de queratinócitos (HaCat) após exposição radiante de 20 J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle. Dados apresentados como média ± DP. n=8, 02 experimentos independentes. \*p<0,05 em relação ao grupo controle.

Com o intuito de verificar o efeito protetor da ciclohexerofilina em fibroblastos após a exposição ao UVA, Huang e colaboradores utilizaram uma maior exposição radiante de 20 J/cm<sup>2</sup>. Partiram de um dano celular de aproximadamente 70%. Similarmente, Chan e colaboradores utilizaram 20 J/cm<sup>2</sup> em células epiteliais da retina, causando 50% de morte celular. Por outro lado, Xu e colaboradores utilizaram a exposição radiante de 10 J/cm<sup>2</sup> em fibroblastos, causando aproximadamente 90% de fibroblastos viáveis e ausência de alterações morfológicas. Nessas condições eles mostraram aumento na expressão de Catepsina K que tem papel na degradação intracelular de elastina, enquanto as metaloproteinases têm atividade eliolítica extracelular.

Os efeitos imediatos da exposição a radiação ultravioleta na pele são vermelhidão e pigmentação enquanto os efeitos a curto-médio prazo são o fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. Uma dose eritemalosa mínima (OEM) é considerada 20 J/cm<sup>2</sup>. Desta forma, a utilização de 9 J/cm<sup>2</sup> de UVA seria

menor que uma dose eritematosa mínima e os efeitos avaliados no trabalho seriam associados à resposta celular frente a uma exposição solar considerada segura. Lavker e colaboradores mostraram que utilizando doses diárias de 0,5 DEM, houve resposta eritematosa cumulativa, com hiperplasia epidermal e espessamento do estrato córneo, presença de infiltrados inflamatórios e deposição de lisozima nas fibras de elastina.<sup>35</sup> Neste sentido, o entendimento dos efeitos iniciais da radiação UVA nas células que constituem a pele (em especial fibroblastos e queratinócitos) é essencial para desenvolver estratégias para minimizá-los.

Sabe-se que a radiação UVA gera espécies reativas de oxigênio em queratinócitos e gera inflamação, além de aumentar a atividade das metaloproteinases que degradam de forma acelerada o colágeno e fibras elásticas, levando à formação de rugas.<sup>34</sup> Também já foram observadas lesões em DNA e indução da apoptose após a exposição UVA como consequência da produção e espécies reativas de oxigênio.<sup>30,36</sup> A utilização dos extratos naturais associados à fotobiomodulação deverá ser avaliada em termos do estresse oxidativo, a resposta inflamatória e a expressão/atividade de metaloproteinases.

#### Viabilidade dos queratinócitos após exposição aos extratos naturais

Os extratos utilizados estão veiculados em HG (uma mistura de água, etanol e propilenoglicol), sendo que o mesmo não apresenta toxicidade nas concentrações testadas (dados não apresentados), desta forma, qualquer toxicidade apresentada pelos extratos provém única e exclusivamente de seus componentes, sem influência do veículo.

Os extratos apresentaram relação dose-dependente, isto é, o aumento da concentração de extrato resultou em maior toxicidade (Figura 2). Porém, cada um dos extratos tem uma concentração ótima de trabalho, para que não haja toxicidade. Os extratos de Camomila, Figo, Mirtilo e Nogueira não apresentam toxicidade a 0,3 %; Chá verde, Alecrim e Nogueira apresentaram toxicidade da ordem de 10 % a 0,1 % enquanto Romã deverá ser avaliada em concentrações

menores que 0,05%, pois

nesta concentração apresenta toxicidade de

30%.

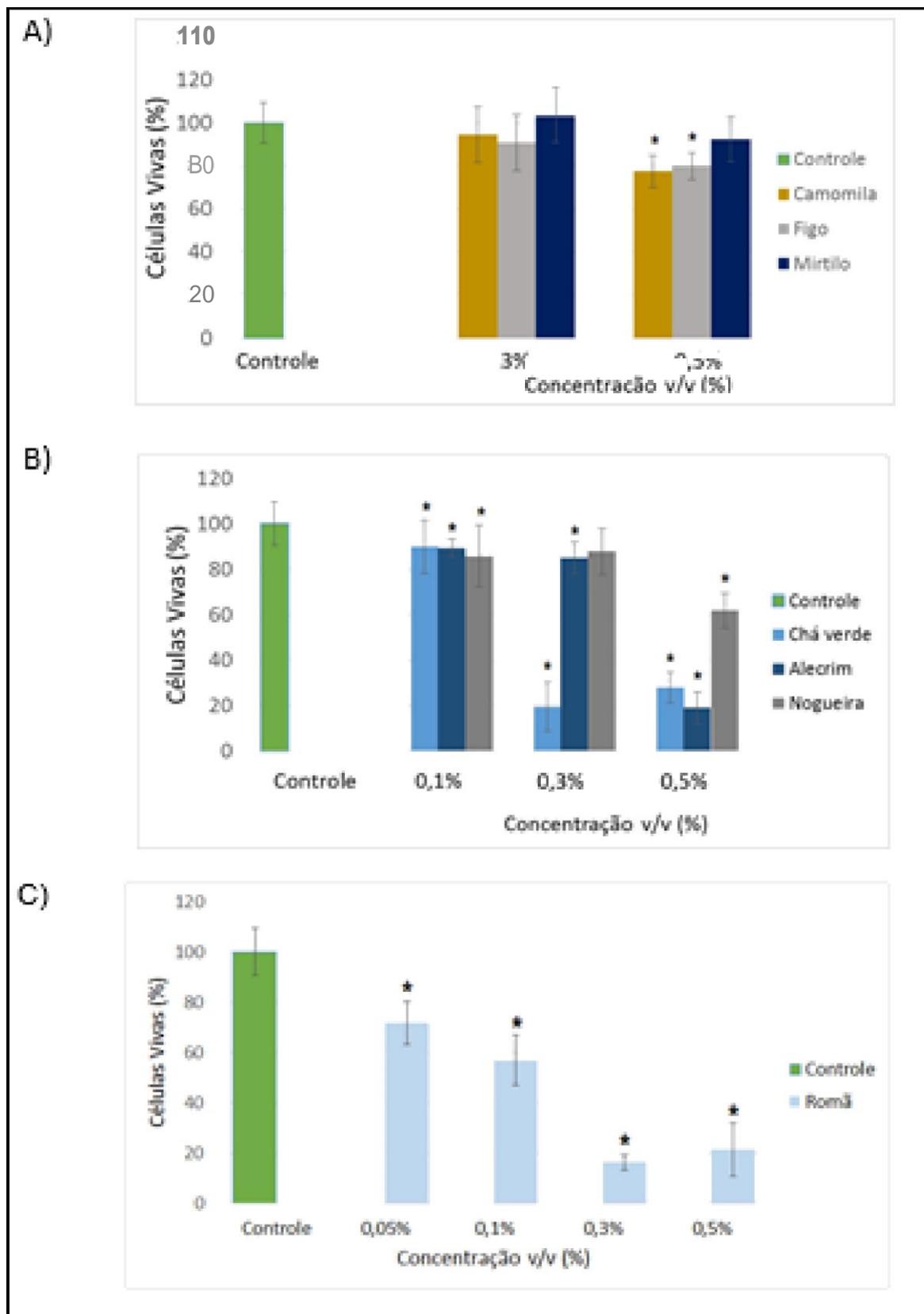


Figura 2: Viabilidade celular de queratinócitos expostos aos essenciais 1 a 24 horas em DMEM 1% SFB. Dados apresentados em média + DP, n=3 experimentos independentes. \*p < 0,05 em relação ao grupo controle.

Inicialmente estes extratos foram selecionados por suas classes fitoquímicas, isto é, por apresentarem um conteúdo maior de um determinado tipo de polifenóis. Porém, analisando o conteúdo polifenólico total dos extratos (Tabela 1), é possível verificar que os extratos que apresentaram maior toxicidade são aqueles que apresentam maior conteúdo polifenólico, independentemente do tipo de polifenol que contém. Os extratos com menor toxicidade, Camomila, Figo e Mirtilo, tem PFT abaixo de 1 g/kg de extrato. Chá verde, Alecrim e Nogueira que apresentaram toxicidade intermediária apresentam PFT de aproximadamente 5 g/kg de extrato. Já o extrato de Romã, o mais citotóxico de todos, tem PFT acima de 15 g/kg de extrato.

Tabela 1: Teor de polifenóis dos extratos utilizados.

PFT - polifenóis totais medidos em equivalentes de ácido gálico.

Extrato	PFT (g/kg)
Romã HG	16,89 ± 0,41
Chá Verde HG	5,21 ± 0,13
Alecrim HG	4,44 ± 0,04
Nogueira HG	4,22 ± 0,19
Camomila HG	0,92 ± 0,01
Mirtilo HG	0,78 ± 0,04
Figo HG	0,19 ± 0,00

Os polifenóis têm sido considerados importante agentes anti-inflamatórios,<sup>37</sup> indutores de parada de ciclo celular e apoptose.<sup>38</sup> O efeito citotóxico de extratos tem sido avaliado frequentemente em linhagens tumorais com o intuito de usá-los como agentes antitumorais, porém existem relatos que o efeito em células normais é similar ao verificado em tumorais.<sup>38-40</sup> O mecanismo associado ao efeito citotóxico ainda não é bem descrito na literatura. Sabe-se que os polifenóis reagem com proteínas e poderiam alterar funções celulares.<sup>41</sup> A resposta biológica que tem sido observada é parada de ciclo celular e morte celular por apoptose, mas ainda não foi mostrado se estes eventos estão interligados.<sup>42</sup> Os compostos

fenólicos tendem a doar um elétron ou um átomo de hidrogênio à um radical livre, convertendo-o em uma molécula inofensiva. Desta forma apresentam atividade antioxidante bastante relevante.<sup>43</sup> Devido à sua capacidade antioxidante, os extratos naturais podem reduzir o estresse oxidativo induzido pela exposição ao UVA, protegendo a pele dos efeitos danosos. Porém, a administração de polifenóis deve respeitar o conceito dose-resposta, uma vez que efeitos adversos podem ser observados quando quantidades maiores de polifenóis são utilizadas. A literatura relata que doses excessivas de polifenóis podem promover efeitos adversos, como toxicidade.<sup>44,45</sup> Por exemplo, a administração de catequina em células de baço de ratos provocou dano em DNA,<sup>46</sup> extratos de uva em concentrações entre 75 e 300 µg/mL induziram a troca de cromátides irmãs em linfócitos sanguíneos. Nesse contexto, o estudo de viabilidade celular após exposição aos extratos é de essencial importância para se determinar a quantidade segura de extrato para que não promova efeitos indesejados.

#### Viabilidade dos queratinócitos tratados com LED

Foram avaliados vários tempos de exposição ao LED. A análise estatística mostrou diferença significativa do controle somente para 23 minutos de exposição. A partir de 11 minutos de exposição ao LED vermelho (1,7 J/cm<sup>2</sup>) foi observada uma tendência em decréscimo na viabilidade celular dos queratinócitos (Figura 3). Exposição por 17 minutos foi observada diferença significativa em relação aos 2, 5 e 7 minutos de exposição, mostrando que nesta situação já há morte celular. Desta forma, foi adotado o tempo de 7 minutos de exposição ao LED (1,0 J/cm<sup>2</sup>), pois se deseja utilizar uma quantidade de energia adequada para induzir a fotobiomodulação, não induzir perda de viabilidade.

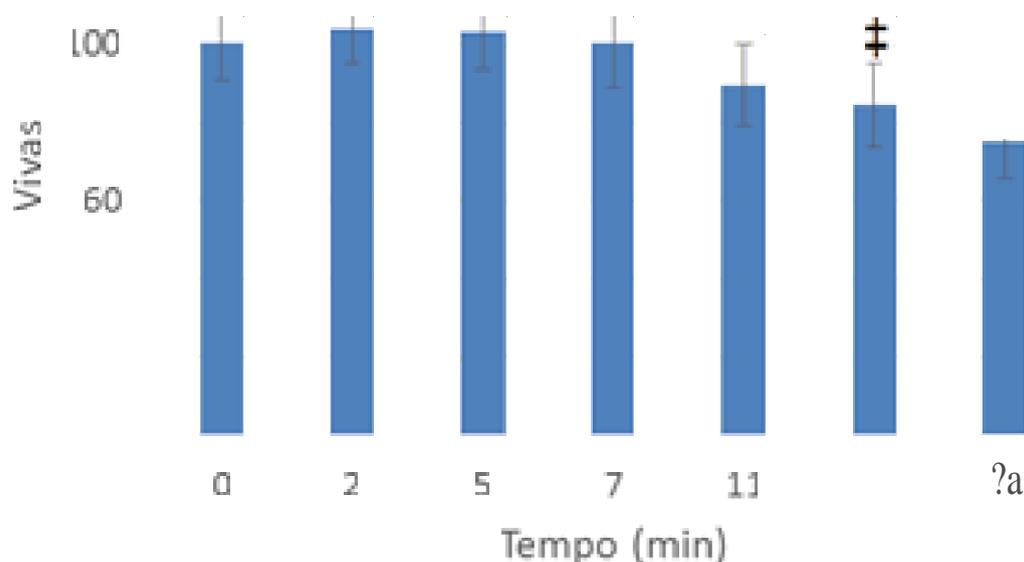


Figura 3. Viabilidade celular das queratinócitos expostos a LED vermelho. IuBS HaCaT foram expostas ao sistema LEE 840 12.5 nm. com densidade de potência de 2,0 mW·cm<sup>-2</sup>, e a viabilidade celular determinada por método de colorimetria. Media + SD, NO, 02 replicamentos independentes, \*p < 0.05 em relação ao controle; #p < 0,05 em relação a 2, 5 e 7 min.

O efeito fotobiomodulador em cultura celular pode variar em função de diversos fatores, tais como: dose de energia, densidade de potência e tipo de célula. Estes parâmetros físicos aplicados em valores elevados do que os adequados podem causar efeitos adversos em células, tais como danos estruturais ao DNA e aumento de EROS." Acredita-se que exposição radiante de 1,0 J/cm<sup>2</sup> seja suficiente para induzir fotobiomodulação uma vez que Zhang e colaboradores verificaram regulação direta de genes específicos relacionados à síntese, reparo e metabolismo celular quando fibroblastos normais submetidos ao LED vermelho (628 nm) por 3 dias com uma dose total de 0,88 J/EFfl<sup>\*</sup>.<sup>10</sup> Kim J2 colaboradores, utilizando LED vermelho (633 nm), mostraram aumento de QFOEOLâgeno do tipo I, redução em metaloproteinases (MMP-1 e MNP-2), além da redução na expressão de genes inflamatórios (CDX-2 e IU-a). Apesar de valores de exposição radiante que causaram este efeito ser da ordem de 4-12 J/cm<sup>2</sup>, a irradiância utilizada era muito baixa (5 µW/cm<sup>2</sup> e 47,5 pW/cm<sup>2</sup>) sendo necessário entre 24 e 72 horas de iluminação, o que não seria viável em um protocolo clínico.<sup>11</sup> Já Tian e colaboradores mostraram que, após a exposição de fibroblastos ao

UVB, o tratamento com LED 630 nm aumentou a quantidade relativa de células sendo que 1 J/cm<sup>2</sup> foi suficiente para causar este efeito. Além disso, após a exposição ao LED a expressão do colágeno tipo I aumentou e a expressão da metaloproteinase-1 diminuiu.<sup>50</sup>

## Conclusão

Sabendo-se da importância dos parâmetros de irradiação como a exposição radiante, bem como da possibilidade de toxicidade dos extratos naturais, o estabelecimento dos parâmetros experimentais para combinação de extratos naturais e fotobiomodulação é essencial. Diante dos resultados obtidos, as células serão expostas à 9 J/cm<sup>2</sup> de UVA para simular o dano causado pela exposição solar, 1 J/cm<sup>2</sup> de LED para desencadear o efeito fotobiomodulador e, dependendo do conteúdo polifenólico de cada extrato, receberão entre 0,01 e 0,3% de extratos. Estes parâmetros serão utilizados em estudos futuros que avaliarão parâmetros como o estresse oxidativo, inflamação e expressão/atividade de metaloproteinases.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (2012/50680-5), à FarmaService Bioextract que gentilmente forneceu os extratos e os valores de PFT. Agradecem a D. Severino pela idealização e construção do irradiador UVA.

## Referências

1. Delgado, J. A., Quesada, I., Montañó, L. M. & Anasagasti, L. Safety of UV radiation for autofluorescence diagnosis of skin cancer. *Rev. Mex. Fis.* **52**, 78–83 (2006).
2. Pietta P. Flavonoids as antioxidants. *Flavonoids as antioxidants* **63**, 1035–1042 (2000).
3. Pinnell, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**, 1–19 (2003).

- 4 Wlaschek M, Tantcheva-Poor T, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schulter J, Scharlletter-Kochanek K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B. E+ \fl-3*, (2001).
5. Gonzalez S, GiTaberte Y, Philips N. Mechanistic insights in the use of a Polypodium leucotomos extract as an oral and topical photoprotective agent. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9: 558—563 (2010).
6. Matsunura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 185: 298-308 (2004a).
7. Trevithick JR, Xiong H, Lee S, Shum DT, Salford SE, Kañik SJ, Noñey C, Dilworth GR. Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 296(2), 575—582 (1992a).
8. Nascimben CS, Nunes LCC, Lima AAN, Junior SG, Neto PJR. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de propolis verde e vermelha. *Rev Bras Farm. Soc*, 334-9 (2009).
9. Dal'belo S. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e Ginkgo biloba. (2008).
10. F'Guyer S, Afaq F, Mukhtar H. Photoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol. Photoimmunol Photomed* 19(2):56-72 (2003).
11. Kim HK. Protective effect of Garlic on Gene Expression and Senescence in UVB-Exposed HaCaT Human Keratinocytes. *Nutrients* 8, 464 (2016a).
- 12.** Aquino R, Moretti S, Tomaianni A, Petegrino M, Saya A, Grunnetto L, Puglia C, Ventura D, Bonina F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Calcium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *J Ethnopharmacol* 79(2), 189—197 (2002).
13. Simoes CMO, Schenkey EP, Gosmann G, Melito JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Pharmacognosia*. (1889).
14. Viotante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AFS, Santos RAN, Ferrari M. Avaliação in vivo da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Rev Bras Farm. Soc*, 452—57 (2008a).
15. Fuchs J, Kem H. Free Radical. *Biochem Biophys Res Commun* 25, 1006 (1978).
16. Ksotarczak K, Mankowska AO, Lodyga M, Polanska A, Mazur M, Adamski Z. Photoprotection: facts and controversies. *Eur. Rev. Biochem. Pharmacol. Sci.* 19, 8B-112 (2015).
17. Thomfeldt C. Cosmeceuticals containing herbs: lack, fiction, and future.

- Dermatol Surg* 31, 873–880 (2005).
18. Kasai K, Yoshimura M, Koga T, Arai 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* v. 52, , 383–388 (2006).
  19. Panda H. Aloe Vera Handbook Cultivation, Research Finding, Products, Formulations, Extraction and Processing. *Asia Pacific Bus. Press Inc.* (2003).
  20. Radava RK, Kapil MK. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacogn Rev* 5(10): 164–173 (2011).
  21. Scotti, L. *et al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Rev. Bras. Ciências Farm.* 43, 153–166 (2007).
  22. 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* 4:29-35 (2007).
  23. Collins T. *Inflamacao aguda e cronica.* In: Cotran K, Robbins C, Abbas AK, Kumar V, Fausto N. *Patologia estrutural e funcional.* (Guanabara Koogan, 2000).
  24. Oguz O. Treatment with LEDs: A New Perspective in phototherapy. *J Turk Acad Dermatol* 3 (1), 93101 (2009).
  25. Lee SY, Park KH, Choi JW, Kwon JK, Lee DR, Shin MS, Lee JS, You CE, Park MY. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blinded, and split-face clinical study on LED phototherapy for skin rejuvenation: Clinical, profilometric, histologic, ultrastructural, and biochemical evaluations and comparison of three different trea. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 51–67 (2007).
  26. Wunsch, A. & Matuschka, K. A Controlled Trial to Determine the Efficacy of Red and Near-Infrared Light Treatment in Patient Satisfaction of Fine Lines, Wrinkles, Skin Roughness, and Intradermal Collagen Density Increase. *Photomed. Laser Surg.* 32, 93–100 (2014).
  27. Barolet CJ, Robege FA, Bouche A, Germain L. . 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 (2009).
  28. Martins WK, Severio D, Souza C, Stoff BS, Baptista MS. Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. *Biotechnol. J.* 8, 730–7 (2013).
  29. Huynh TT, Chan KS, Piva TJ. Effect of ultraviolet radiation on the expression

- of pp38MAPK and furin in human keratinocyte-derived cell lines. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **25**, 20–29 (2009).
30. Huang CH, Li HJ, Wu NL, Hsiao CY, Lin CN, Chang HH, Hung CF. Photoprotective Effects of Cycloheterophyllin against UVA-Induced Damage and Oxidative Stress in Human Dermal Fibroblasts. *Plos one* (2016).
  31. Chan CM, Huang CH, Li HJ, Hsiao CY, Su CC, Lee PL, Hung CF. Protective Effects of Resveratrol against UVA-Induced Damage in ARPE19 Cells. *Int. J. Mol. Sci* **16**, 5789–5802 (2015).
  32. Xu Q, Hou W, Zheng Y, Liu C, Gong Z, Lu C, Lai W, Maibach HI. Ultraviolet A-Induced Cathepsin K Expression Is Mediated via MAPK/AP-1 Pathway in Human Dermal Fibroblasts. *PLoS One* **9** (7), (2014).
  33. Battie C, Verschoore M. Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage. *Indian J. Dermatology Venereol. Leprol.* **78** (7), 9–14. (2012).
  34. Ichihashi M, Ando H. The maximal cumulative solar UVB dose allowed to maintain healthy and young skin and prevent premature photoaging. *Exp Dermatol* **1**, 43–6 (2014).
  35. Lavker RM, Gerberick GF, Veres D, Irwin CJ, Kaidbey KH. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **32**, 53–62 (1995).
  36. Veselská, R. & Janisch, R. The effect of UV irradiation on changes in cytoskeleton and viability of mouse fibroblasts L929 cell line. *Scr. Medica* **73**, 393–408 (2000).
  37. Maeda H, Yamazaki M, Katagata Y. Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil inhibits LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **77** (3), 482–6 (2013).
  38. Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M, Choudhary B, Raghavan SC. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
  39. Nemati F, Dehpouri AA, Eslami B, Mahdavi V, M. S. Iranian Red Crescent Medical Journal. **15**(11), (2013).
  40. Weaver J, Briscoe T, Hou M, Goodman C, Kata S, Ross H, McDougall G, S. D. R. A. Strawberry polyphenols are equally cytotoxic to tumourigenic and normal human breast and prostate cell lines. *Int. J. Oncol.* **34**, 777–786 (2009).
  41. Delfino RA, Canniatti-Brazaca SG. 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 (2010).

42. Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *J Biomed Biotechnol* (2009).
43. Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *J Mol Sci* 16(10), 24673–706 (2015).
44. Verschooten L, Claerhou S, Van Laethem A, Agostinis P, Garmyn M. New strategies of photoprotection. *Photochem. Photobiol* 82, 1016–1023 (2006).
45. Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol. Pharm. Bul* 28, 253–259 (2005).
46. Fan P, Lou H. Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. *Mol. Cell. Biochem* 267, 67–74 (2004).
47. Al Ghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 27, 237–249 (2011).
48. Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol* 120, 188–192 (2003).
49. Kim HS, Park WS, Baek JI, Lee BS, Yoo DS. Continuous irradiation with a 633-nm light-emitting diode exerts an anti-aging effect on human skin cells. *Int. Journal Mol. Med.* 35, 383–390 (2015).
50. Tian YS, Kim NH, Lee AY. Antiphotaging Effects of Light-Emitting Diode Irradiation on Narrow-Band Ultraviolet B-Exposed Cultured Human Skin Cells. *Dermatologic Surgery* 38, 1695–1703 (2012).

## **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. Apenas a referência completa do(s) manuscrito(s) publicado(s) ou aceito(s) para publicação. Os resultados em sua totalidade estarão disponíveis nos respectivos artigos 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.