



**Liliana Sofia Baptista
Ferreira**

**Efeito da IPL na oxidação de proteínas da pele e
associação ao cancro**

**Effect of IPL in the oxidation of skin proteins and
association cancer**



**Liliana Sofia Baptista
Ferreira**

**Efeito da IPL na oxidação de proteínas da pele e
associação ao cancro**

**Effect of IPL in the oxidation of skin proteins and
association cancer**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira professora associada com agregação do Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e da Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT, do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE) E Comparticipado pelo Fundo Comunitário Europeu (FEDER) ao projeto PEst-C/QUI/UI0062/2013



QOPNA
UI Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-alimentares

O júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

Doutora Regina Maria Rodrigues Arantes
Investigadora de Pós- doutoramento do Departamento de Ciências veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Prof. Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira
Professora Associada com Agregação do Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Agradecimentos

Às minhas orientadoras Professora Doutora Rita Ferreira e Professora Doutora Paula Oliveira pela orientação científica, disponibilidade, incansável ajuda, motivação e apoio ao longo da realização de todo este trabalho. Agradeço também a disponibilidade para a leitura crítica do presente relatório. Por último, e acima de tudo pelo exemplo de dedicação e trabalho pela busca de conhecimento científico.

Ao Professor Doutor Rui Vitorino pela colaboração e ajuda na realização das análises 2DE e MS, bem como na interpretação dos resultados.

A todo o grupo do laboratório, Fábio Trindade, Bruno Saraiva, Rui Pedro, Virgínia Carvalhais, Ana Azevedo e Rita Ferreira, pelo auxílio, disponibilidade e prontidão.

As minhas meninas Margarida Loureiro, Júlia Matos, Joana Simões pela amizade, paciência, apoio incansável, pelos bons momentos passados no laboratório bem como fora deste.

Aos meus amigos de longa data Luís Diogo, Sofia Soares, Bebian, Pedro, Jorge e Mário pela amizade, pela constante preocupação e apoio nos momentos mais difíceis.

A todos os meus familiares que sempre acompanharam o meu percurso e que sempre acreditaram em mim e nas minhas capacidades, e que nos fazem levantar a cabeça e ultrapassar os maiores desafios.

Às pessoas mais importantes da minha vida e sem as quais não seria quem sou e os quais proporcionaram todo o suporte para que mais esta etapa fosse possível, aos meus pais António e Celeste. E ainda ao meu mano, André, pela seu carinho.

Por último, mas não menos importante, à pessoa que me acompanha desde que entrei no mundo da Bioquímica, obrigado pelo companheirismo, paciência, dedicação, por ouvires os meus desabafos e me encorajares. Obrigado por estares sempre ao meu lado!

“Se estiver tudo errado, comece novamente, se estiver tudo certo continue...”

Fernando Pessoa

Palavras-chave Luz Intensa Pulsátil, cancro de pele, proteómica, oxidação proteica, murganho

Resumo

A Luz Intensa Pulsátil (IPL) tem tido muita aplicação na estética e dermatologia. Apesar de conhecidos alguns efeitos secundários do uso deste tipo de radiação, pouco se sabe sobre os seus efeitos a nível molecular na pele. Com o objetivo de melhor compreender a influência da IPL no proteoma da pele e no desenvolvimento de lesões cutâneas pré-neoplásicas foi utilizado um modelo animal de dois estadios de cancro de pele, de modo a identificar as proteínas mais suscetíveis à oxidação, e as vias moleculares associadas. Assim, para este estudo foram utilizados murganhos fêmeas (n=28) da estirpe ICR (CD-1), tendo sido constituídos 5 grupos experimentais distintos. O grupo DMBA, sujeito ao agente iniciador 7,12-dimetilbenzantraceno, sem mais nenhum tratamento; o grupo IPL, submetido à irradiação com IPL; o grupo DMBA+TPA, submetido ao tratamento com o composto promotor de carcinogénese acetato de tetradecanoilforbol, após a iniciação com DMBA; o grupo DMBA+IPL submetido à irradiação com IPL após a iniciação com DMBA; por último, o grupo Controlo que foi somente exposto a acetona (veículo). No final do protocolo verificou-se que a IPL promoveu um aumento do teor sérico de interleucina (IL-6) e proteína C reativa (CRP), mais exacerbado nos animais tratados com DMBA+TPA. Paralelamente à indução de uma resposta inflamatória, ao nível da pele verificou-se uma adaptação metabólica para um perfil mais glicolítico em resposta aos tratamentos testados. Concomitantemente, verificou-se um aumento do teor de proteínas oxidadas em resposta à exposição a IPL, mais exacerbado quando combinado com o tratamento com DMBA. Entre as proteínas mais suscetíveis à oxidação identificou-se por MS/MS várias isoformas de queratina e de actina, sugerindo que os processos biológicos organização do citoesqueleto e apoptose poderão intervir na adaptação da pele à exposição à IPL.

Em suma, a aplicação de IPL parece promover inflamação, alteração do metabolismo da pele e aumento da suscetibilidade das proteínas à oxidação embora sem consequências morfológicas significativas. Estas alterações são mais significativas quando a IPL é irradiada na pele com lesões neoplásicas. Estudos futuros serão importantes para melhor compreender o impacto a longo prazo das alterações bioquímicas observadas na pele e das vias de sinalização envolvidas.

Keywords

Intense pulsed light, skin cancer, proteomics, protein oxidation, mouse

Abstract

The Intense Pulsed Light (IPL) has been much application in aesthetic and dermatology. Although the side effects of using this type of radiation, remain is unknown principally its effects at the molecular level in the skin. With the objective of better understanding the influence of the IPL in skin proteome and the development of precancerous skin lesions, was used an animal model of two stages of skin cancer, in order to identify the proteins more susceptible to oxidation and molecular pathways associated. So, for this study we used female mice (n = 28) of ICR (CD-1) randomly distributed in five different experimental groups. In DMBA group, mice were subjected to the initiator 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, with no further treatment; IPL group, animals were submitted to irradiation with IPL; DMBA+TPA group, mice were subjected to treatment with the promoter of carcinogenesis 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, after initiation with DMBA; DMBA+IPL group, mice underwent irradiation with IPL after initiation with DMBA; control group, mice were only exposed to acetone (vehicle).

Data showed that IPL promote increased serum levels of interleukin (IL-6) and C-reactive protein (CRP), further exacerbated in animals treated with DMBA+TPA. In parallel to the induction of an inflammatory response in the skin, there was a metabolic adaptation to a more glycolytic profile in response to the tested treatments. Concomitantly, there was an increase in the level of oxidized protein in response to IPL exposure further exacerbated when combined with DMBA treatment. Between the proteins more susceptible to oxidation we identified by MS/MS several isoforms of keratin and actin, suggesting that the biological processes organization of the cytoskeleton and apoptosis underlie the adaptation of the skin to IPL exposure.

In short, the application of IPL appears to promote inflammation, alter the metabolism of the skin and increase proteome susceptibility to oxidation but with no significant morphological consequences. These changes are more significant when IPL is irradiated in skin with neoplastic lesions. Future studies are required to better understand the long-term impact of the biochemical changes observed in the skin and the signaling pathways involved.

Índice

Índice de Figuras.....	ii
Índice de Tabelas	iii
Nomenclatura	v
I. Introdução	1
1. Organização e constituição da pele.....	3
2. Luz Pulsátil.....	5
2.1. Efeitos provocados pela IPL na pele	6
3. Alterações moleculares associadas ao cancro da pele.....	9
3.1. Vias de sinalização moduladas no cancro da pele.....	9
3.2. Papel do stresse oxidativo no cancro da pele.....	12
3.2.1. Modificações oxidativas em proteínas e a sua análise por proteómica	14
3.2.2. Papel da radiação UV no stresse oxidativo: consequências no proteoma da pele	18
II. Objetivos	25
III. Material e Métodos	29
1. Reagentes	29
2. Desenho experimental.....	29
3. Protocolo animal.....	31
4. Preparação das amostras de soro e de extratos de pele	32
5. Determinação de parâmetros séricos.....	32
6. Quantificação da proteína total nos extratos de pele.....	33
7. Análise por <i>Western Blotting</i>	33
8. Determinação de proteínas oxidadas em extratos de pele	34
8.1. Determinação do teor total de 3-nitrotirosina e de grupos carbonilo.....	34
8.2. Oxyblot para determinação das proteínas oxidadas.....	35
9. Identificação das proteínas por MS/MS.....	37
10. Análise estatística	37
IV. Resultados	41
1. Caraterização da resposta animal aos tratamentos aplicados	41
2. Alterações morfológicas e bioquímicas nos extratos de pele	43
V. Discussão	55
VI. Conclusão.....	63
VII. Bibliografia.....	67

Índice de Figuras

Figura 1- Principais camadas constituintes da pele: epiderme, derme e hipoderme.	3
Figura 2- Representação esquemática das vias RAS/RAF/MEK/ERK e da via PI3K/PTEN/Akt. Após a estimulação por um sinal extracelular há a ativação da proteína RAS que por sua vez fosforila a proteína RAF iniciando assim uma cascata de reações que passa pela fosforilação da MEK e ERK e culmina com a variação da expressão de genes no núcleo. Por sua vez a proteína RAS pode ainda estar envolvida na ativação da via PI3K e na cascata de reações associadas regulando a transcrição de genes (adaptado de 19).....	11
Figura 3 – Esquema evidenciando a formação de espécies reativas de oxigénio, os mecanismos enzimáticos antioxidantes e as biomoléculas alvo a nível celular.	14
Figura 4 - Esquema representativo da abordagem de proteómica redox pelo método baseado em gel (adaptado de 75).	17
Figura 5 – Esquema do procedimento metodológico utilizado no presente estudo para avaliar o efeito da IPL na pele saudável e com lesões neoplásicas.....	30
Figura 6 - Derivatização das amostras para a determinação do teor em proteínas carboniladas (V refere-se a um dado volume de amostra contendo 20 µg de proteína total).	35
Figura 7- Variação dos níveis de Proteína C reativa (A) e de Interleucina-6 (B) nos diferentes grupos experimentais. Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas abaixo dos respetivos gráficos. Os valores da densidade ótica (DO) são expressos em unidades arbitrárias.....	43
Figura 8- Imagem histológica de seção da pele de um animal tratado com DMBA e TPA evidenciando hiperplasia na epiderme e ainda a presença de infiltrado inflamatório misto (mononuclear e polimorfonuclear) ao nível da derme.	44
Figura 9- Variação da expressão da subunidade β da ATP sintase (A) e da GAPDH (B) avaliada por <i>western blotting</i> em todos os grupos experimentais. Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas abaixo dos respetivos gráficos. Em (C) é apresentado o rácio ATP sintase/ GAPDH Os valores da densidade ótica são expressos em unidades arbitrárias.....	45
Figura 10- Variação do teor em proteínas nitradas (A) e carboniladas (B) avaliado por <i>Slot-Blot</i> em extratos de pele dos diferentes grupos experimentais. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos respetivos gráficos. Os valores de densidade ótica são expressos em unidades arbitrárias.	46
Figura 11- Imagens representativas do perfil 2-DE para cada grupo experimental e a comparação entre grupos dos western blots obtidos na deteção das proteínas carboniladas assinaladas nas caixas a azul) e nitradas (assinaladas caixas a vermelho). A-controlo; B-IPL; C-DMBA+TPA; D-DMBA+IPL;E- DMBA.	48
Figura 12- Análise das interações proteína-proteína com as isoformas de actina identificadas por MS/MS nos <i>spots</i> reativos ao anti-DNP, efetuada com a ferramenta bioinformática String 9.1.....	51
Figura 13- Análise das interações proteína-proteína com as isoformas de queratina identificadas por MS/MS nos <i>spots</i> reativos ao anti-DNP, efetuada com a ferramenta bioinformática String 9.1.....	52

Índice de Tabelas

Tabela 1- Análise da variação da massa dos animais dos cinco grupos experimentais ao longo do protocolo, tendo por base as massas iniciais e finais. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão.	41
Tabela 2 – Valores de parâmetros bioquímicos determinados no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão de concentração ou de atividade.....	42
Tabela 3- Lista de proteínas identificadas por MS/MS nos <i>spots</i> reativos ao anti- DNP ($p < 0,05$).....	50

Nomenclatura

Akt ou PKB	Proteína cinase B
ALAT	Alanina aminotransferase
ASAT	Aspartato aminotransferase
Anx2	Anexina 2
Arp3	<i>Actin related protein 3</i>
CAT	Catalase
CRP	Proteína C reativa
DMBA	7,12-dimetilbenzantraceno
DMBA+IPL	7,12-dimetilbenzantraceno + Luz Intensa Pulsátil
DMBA+TPA	7,12-dimetilbenzantraceno + Acetato de tetradecanoilforbol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNP	Dinitrofenilhidrazona
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DO	Densidade Ótica
DTT	Ditiotreitol
EGFR	Recetor do Fator de crescimento Endotelial
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	Proteína cinase regulada por sinais extracelulares
GAPDH	Gliceraldeído desidrogenase
GPR78	Proteína Regulada pela Glucose 78
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
GTP	Guanosina Trifosfato
HSF	Fator de choque térmico
HSP	Proteína de choque térmico
IL-6	Interleucina-6
IPL	Luz Intensa Pulsátil
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LC	Cromatografia Líquida
MAPK	Proteína cinase mitogénica ativada
MALDI	Ionização por dessorção por laser assistida por matriz
MEK	Proteína cinase mitogénica regulada por sinais extracelulares

MMP		Metaloproteinases da matriz
mTOR		<i>Mammalian Target of Rapamicin</i>
OMS		Organização Mundial de Saúde
PCNA		Antigénio nuclear de proliferação celular
PDI A3		Proteína dissulfeto isomerase
PHB		Proibitina
pI		Ponto isoeléctrico
PIP2		Fosfatidilinositol bifosfato
PI3K		Fosfatidilinositol-3-cinase
PMSF		Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PTEN		Homólogo da fosfatase e tensina
p16	ou	Inibidor da ciclina dependente de cinase
CDKN2A		
RAS		<i>Rat Sarcoma</i>
RAF		<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
ROS		Espécies Reativas de Oxigénio
RNS		Espécies Reativas de Azoto
RTK		Recetor da Tirosina Cinase
SDS		Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE		Electroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio
SOD		Superóxido Dismutase
TGF-β		Fator de transformação do crescimento – β
TIMPs		Inibidores de Metaloproteinases em tecidos
TPA		Acetato de tetradecanoilforbol
UPR		<i>Unfold protein response</i>
UVR		Radiação ultravioleta (que pode ser do subtipo A, B ou C)
2-DE		Electroforese Bidimensional
3-NT		3-nitrotirosina

I. Introdução

I. Introdução

O cancro da pele constitui um problema global de saúde pública que abrange todas as etnias, grupos socioeconómicos e demográficos. Esta neoplasia é uma das mais comuns em todo o mundo, com uma incidência que tem vindo a aumentar a nível mundial nas últimas décadas (1). O cancro de pele é geralmente classificado em dois tipos, o melanoma e o não-melanoma. O cancro do tipo não-melanoma (ou carcinoma derivado de alterações nos queratinócitos) inclui o carcinoma das células basais (carcinoma basocelular) e o carcinoma das células escamosas (carcinoma espinocelular), sendo este último menos frequente mas mais agressivo (2). O carcinoma basocelular é uma neoplasia maligna que tem origem nas células basais germinativas da pele e é caracterizado por um crescimento lento, nodular e superficial. Este tipo de cancro da pele raramente metastiza mas o seu crescimento pode promover a lesão dos tecidos envolventes (3), sendo que em 80% dos casos ocorre na cabeça e pescoço, o que torna a sua deteção mais fácil. O carcinoma espinocelular tem origem nos queratinócitos presentes na epiderme, que adquirem capacidade para atingir a derme, a corrente sanguínea e/ou o sistema linfático, apresentando potencial para metastizar (2). Este tipo de cancro geralmente manifesta-se como uma pápula ceratótica áspera, semelhante a verrugas, com um núcleo central queratinizado e um crescimento rápido. Estes carcinomas estão intimamente relacionados com a exposição ocupacional à radiação solar (2,4,5).

O cancro da pele do tipo melanoma deriva de alterações nos melanócitos presentes na epiderme e pode ocorrer em qualquer tecido que contenha este tipo de células (3). Os melanócitos são as células produtoras de melanina, pigmento responsável pela coloração da pele e que funciona como um filtro solar. Este tipo de cancro pode ser induzido por diversos mecanismos, tais como, pela supressão do sistema imune da pele, indução da divisão celular dos melanócitos, produção de radicais livres e ainda pelos danos causados no DNA. Este surge normalmente à superfície da pele, pelo que é visualmente detetável. O melanoma está frequentemente associado à exposição solar, que é muitas vezes acompanhada de queimaduras solares. Em indivíduos que apresentem um fenótipo sensível à radiação solar é maior a probabilidade de se desenvolverem este tipo de cancros (6).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro de pele do tipo não melanoma é o que apresenta uma maior incidência na Europa, com 356 casos por cada 100.000 habitantes (7), enquanto o melanoma apresenta uma incidência de 11 casos em cada 100.000 habitantes (8) e uma maior taxa de mortalidade (3). A mortalidade associada a este tipo de cancro da pele é maior nos indivíduos do sexo masculino do que do sexo feminino, em todas as regiões da Europa (8). O cancro de pele está associado a vários fatores de risco, tendo a exposição à radiação, ultravioleta (UV) em particular, um papel crucial, tanto a radiação UV resultante de fontes naturais (luz solar) como a que é produzida por fontes artificiais (9). Neste contexto uma exposição ocasional e aguda à radiação UV está relacionada com o desenvolvimento do melanoma cutâneo e com o carcinoma das células basais, enquanto a exposição crónica, que ocorre principalmente em trabalhadores que executam as suas atividades ao ar livre, está relacionada com o carcinoma das células escamosas (5). Todavia alguns tipos de radiação são usados no contexto da terapêutica, por exemplo, a radiação laser de baixa intensidade (usada para estimulação da regeneração, tratamento da dor e da inflamação) (10) e a radiação gama e os raios X (usados no tratamento de cancro e ainda no diagnóstico clínico) (11,12).

Hoje em dia, no tratamento de diversas condições vasculares congénitas ou adquiridas, em situações de fotoenvelhecimento e ainda por motivos meramente estéticos, tem sido utilizada a Luz Pulsátil (do inglês *Intense Pulsed Light*, IPL), tanto a nível clínico como a nível doméstico. A IPL é um tipo de radiação não laser com um comprimento de onda variável num intervalo de 500 a 1200 nm. Apesar de serem evidentes alguns benefícios clínicos obtidos com a IPL, não se conhecem ainda em detalhe os mecanismos biológicos e celulares subjacentes à sua ação, tendo já sido igualmente observados, efeitos secundários negativos (13,14). Sendo esta tecnologia relativamente recente e uma vez que tem sido muito utilizada no contexto da estética e dermatologia, é importante estudar os mecanismos de ação da IPL e ainda verificar se existe algum risco de gerar danos em biomoléculas, que a longo prazo provoquem o desenvolvimento de lesões pré- malignas ou malignas na pele.

1. Organização e constituição da pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano com um peso de cerca de 4 Kg, em indivíduos adultos, e com uma área de aproximadamente 2 m². Este órgão é indispensável à vida, visto que funciona como uma barreira protetora contra a ação de agentes externos (químicos e físicos), proteção imunológica, termorregulação, atividade sensorial, entre outras (15). É constituída por várias camadas, cada uma das quais com uma composição molecular característica devido às diferentes funções que desempenham. As principais camadas constituintes da pele são: a epiderme - camada mais externa; a derme - camada intermédia e ainda a hipoderme - camada mais interna (15,16) (**Figura 1**).

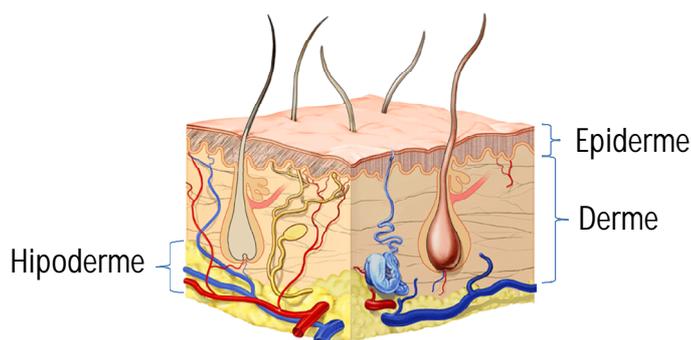


Figura 1- Principais camadas constituintes da pele: epiderme, derme e hipoderme.

As células mais representativas da epiderme são os queratinócitos (95%), sendo também encontradas em menor quantidade as células responsáveis pela produção de melanina, os melanócitos. Estes são fundamentais para proteger as células basais (mitoticamente ativas) contra os possíveis danos causados por agentes físico-químicos, como a radiação ultravioleta. A epiderme é composta por quatro subcamadas que correspondem a diferentes estados de maturação dos queratinócitos. Na epiderme estão presentes as seguintes subcamadas, da zona mais interna para a mais externa: basal, espinhosa, granulosa e por fim a camada córnea. A camada basal, também conhecida por camada germinativa, é formada por células com elevada capacidade proliferativa que são responsáveis por renovar as células da epiderme (3,15). A camada espinhosa é

constituída por células cuboides que apresentam desmossomas que permitem a ancoragem celular. A camada granulosa apresenta células poligonais, mais achatadas e que apresentam grânulos no citoplasma, ricos em histidina e precursores da proteína filagrina que promove a agregação dos filamentos de queratina à camada superior, a camada córnea. Esta última camada é a mais fina e superficial. É formada por células em placa, anucleares, os queratinócitos, na sua forma mais diferenciada. Estas células quase não apresentam organelos citoplasmáticos e são constituídas principalmente por filamentos de queratina de alto peso molecular. A epiderme é responsável por grande parte das funções gerais da pele. Na palma das mãos e dos pés considera-se ainda a existência de uma quinta subcamada localizada entre a camada granulosa e a camada córnea, a camada translúcida, assim denominada por ser muito fina, constituída apenas por cinco camadas de células e tendo como função um reforço mecânico das áreas da pele mais desgastadas (15).

A derme, localizada imediatamente sob a epiderme é um tecido conjuntivo que contém fibras proteicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas e ainda glândulas, sendo responsável por dar suporte e fornecer nutrientes à epiderme. A derme pode ser dividida em duas camadas, a papilar e a reticular. A derme papilar é constituída por fibras finas de colagénio, enquanto a derme reticular é essencialmente constituída por fibras de colagénio densas. Na derme são encontrados os fibroblastos que são responsáveis pela produção de colagénio e de elastina. Estas proteínas são os principais constituintes da matriz extracelular, responsável pela sustentação, extensibilidade e resistência da pele (3).

Por último, a camada mais profunda, a hipoderme é essencialmente constituída por tecido adiposo. Esta camada atua como reserva energética e como isolamento térmico do organismo, conferindo ainda proteção mecânica aos tecidos localizados sob esta camada (15,16). Deste modo, sendo que o cancro da pele é um dos mais incidentes, é fundamental a compreensão dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento deste tipo de cancro, por possíveis novos agentes carcinogénicos. Agentes como, possivelmente, a Luz Pulsátil, uma tecnologia atualmente muito usada no campo da estética e dermatologia, com objetivos vários. Apesar de conhecidos alguns dos seus efeitos secundários como queimaduras, inflamação e edema, pouco se sabe sobre os seus efeitos a nível molecular e celular, nomeadamente como interage com as diferentes camadas da pele e que alterações daí ocorrem.

2. Luz Pulsátil

A IPL foi descrita pela primeira vez em 1985 (13) mas só mais tarde, em 1994, foi comercializada como dispositivo médico, *Photoderme*[®]. Esta tecnologia consiste na aplicação de uma luz não laser de elevada intensidade que, abrange comprimentos de onda na gama dos 515 a 1200 nm (14). Os pulsos de luz não monocromática são gerados a partir da passagem de uma corrente elétrica numa câmara contendo gás xénon. A utilização de filtros permite obter uma radiação individualizada com uma duração, intensidade e distribuição específicas, permitindo atingir o alvo com um comprimento de onda específico. A ação da IPL baseia-se na absorção de fótons por determinados cromóforos existentes no tecido alvo, a fim de gerar calor e assim destruir as estruturas alvo, processo designado por fototermólise (17). No caso da pele, os cromóforos mais importantes são a hemoglobina, mais concretamente a oxihemoglobina (que apresenta picos de absorção a 418 nm, 542 nm e 577 nm), a melanina (com picos de absorção entre 250-1200 nm) e as fibras de colagénio (que conseguem absorver a luz a comprimentos de onda de 400 a 600 nm) (14). Em dermatologia, os comprimentos de onda, mais elevados, são usados para tratar alvos que se encontrem mais profundos, na derme reticular, enquanto os comprimentos de onda mais curtos, na zona típica da radiação UV, são usados para tratar alvos mais superficiais, na epiderme e derme papilar (17).

As principais aplicações dermatológicas deste tipo de radiação são o tratamento das telangiectasias (pequenas dilatações vasculares intradérmicas), da pigmentação irregular, a remoção de pelos, e ainda o fotorejuvenescimento (14,18). Neste contexto, têm sido desenvolvidos aparelhos de IPL para uso doméstico. Estes aparelhos estão configurados para uma duração fixa de pulso de luz, não sendo necessário uma formação prévia para a sua utilização (19).

A enorme aplicação da IPL tem despertado a atenção da comunidade científica para as possíveis repercussões a longo prazo do uso exagerado desta abordagem. Assim, alguns estudos têm sido realizados em modelos animais (20–22) e em culturas celulares (23–25) para melhor caracterizar os mecanismos moleculares subjacentes à ação da IPL e assim avaliar os potenciais efeitos negativos na saúde humana.

2.1. Efeitos provocados pela IPL na pele

Os principais efeitos secundários associados ao uso incorreto da IPL são a dor, a inflamação, o edema, a formação de vesículas de pus e crostas com possível ocorrência de infecções e de cicatrizes (13,14). Pode ainda ocorrer hiperpigmentação ou hipopigmentação cutânea (13,26), que resultam de danos permanentes que ocorrem nos melanócitos. Para melhor compreender os mecanismos subjacentes aos efeitos da IPL, têm sido utilizadas culturas de fibroblastos irradiados. Estas células são componentes maioritários da derme sendo os principais responsáveis pela biossíntese de proteínas da matriz extracelular. Esta é constituída por duas grandes classes de macromoléculas: os proteoglicanos e as proteínas fibrosas como o colagénio, a elastina, as fibronectinas e ainda as lamininas (25). A matriz extracelular é mantida através de um equilíbrio entre as reações de degradação dos seus constituintes (para as quais contribuem as metaloproteínases) e de síntese de novos componentes. As metaloproteínases são uma família de proteases dependentes de zinco (27,28), cuja função é regulada pelas TIMP's (*tissue inhibitors of metaloproteínases*), especialmente a TIMP-1 e -2. Wong *et al.* (25) verificaram que os fibroblastos isolados da derme em cultura apresentavam maior viabilidade, aumento dos níveis de mRNA de colagénio I e de fibronectinas, bem como da expressão de colagénio III e TGF- β 1 quando irradiados com IPL. Wong e colaboradores (23) estudaram o efeito da luz pulsátil na expressão de MMPs (*Matrix metalloproteínases*) em culturas de fibroblastos e verificaram uma redução dos níveis de MMP-2 e MMP-14, e ainda da TIMP-2. Um outro estudo realizado *in vivo* evidenciou uma menor expressão de MMP-2 e de MMP-1 (20).

A análise histopatológica e imunohistoquímica de amostras de pele de animais irradiados com IPL (com 30 J/cm²) evidenciaram um aumento da espessura das fibras de colagénio nas regiões da pele tratadas com IPL em relação às regiões não expostas. A análise da espessura das fibras de colagénio foi ainda confirmada por microscopia eletrónica, observando-se que a espessura e diâmetro das fibras de colagénio aumentaram com o tempo de irradiação com IPL (29). Num estudo efetuado com murganhos BALB/c submetidos a IPL (30 J/cm² e com intervalos de comprimentos de onda de 500-670 nm e 870-1400 nm), durante um período de 6 meses e irradiados duas vezes por semana, observou-se um aumento da espessura da derme devido à deposição gradual de colagénio tipo I e tipo III, o que se relacionou com o incremento dos níveis

de mRNA de procolagénio I e III (20). Resultados semelhantes foram descritos utilizando outro modelo animal, o porco, no qual foram irradiadas pequenas seções da pele deste animal, tendo-se verificado um aumento de procolagénio I, o que ocorreu unicamente entre os 21 a 42 dias de tratamento (22). Em resposta à aplicação da IPL foi ainda observado o rearranjo das fibras de colagénio, que passaram a apresentar uma orientação paralela à epiderme (20). Alguns autores sugeriram que o aumento da temperatura da pele devido à irradiação com IPL promove a degradação das fibras de colagénio, com posterior formação de novas fibras de colagénio (20,21). Em termos gerais, estas alterações promovidas pela IPL resultaram no melhoramento do aspeto físico da pele, um efeito denominado fotorejuvenescimento. Contudo há aspetos ainda por explorar, uma vez que, por exemplo, a irradiação com IPL leva ao aumento da expressão de TGF- β (24,30) que explica em parte os efeitos benéficos na pele tratada, todavia este é em simultâneo muitas vezes associado a situações de cancro.

O fator TGF - β é membro de uma grande família de citocinas que controla muitos aspetos funcionais nas células como a proliferação, a diferenciação, a adesão, a migração ou a apoptose. A sua ação é dependente de vários fatores como o tipo de células e a interação com outros fatores de crescimento (31). Em condições normais, o TGF- β inibe a proliferação da maior parte das células epiteliais por mecanismos autócrinos. Em estadios iniciais de cancro, o TGF- β atua como supressor tumoral inibindo o desenvolvimento do tumor primário, pela paragem do ciclo celular. Em estadios mais avançados, após as células adquirirem resistência ao TGF- β ou após inativação das suas vias de ação, este torna-se um agente promotor de crescimento tumoral aumentando a sua capacidade de invasão, angiogénese e metastização. Assim, o TGF- β tem sido considerado um biomarcador para avaliação da progressão tumoral e um alvo da prevenção e tratamento de metástases (30,32). Como tal o aumento da expressão de TGF- β induzido pela aplicação de IPL é um efeito a ter em conta em estudos futuros, pelo seu possível efeito pró-oncogénico, já que são detetados níveis de expressão de TGF- β aumentados em pele exposta a radiação, como a radiação UV (33).

Adicionalmente, Chan e colaboradores (21) verificaram que a luz pulsátil induz uma sobreexpressão de p16 e PCNA em ratos. Este facto sugere a existência de perturbações a nível genético que podem promover a carcinogénese, uma vez que, a proteína p16 (ou *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A)) codificada pelo gene *INK4a/CDKN2A* é uma importante proteína supressora tumoral. A ocorrência de

mutações neste gene ou a sobreexpressão da proteína p16 tem sido relacionada com diferentes tipos de carcinomas da pele (carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular) e ainda com o melanoma (34,35). Relativamente ao gene *PCNA* (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) este relaciona-se com a reparação do DNA antes da replicação. Uma maior expressão deste gene tem sido associada ao efeito da radiação ultravioleta (UVB), quer em cultura de células quer *in vivo* (36). Assim, a maior expressão destes dois fatores nas células expostas ao IPL, sugere a ocorrência de efeitos potencialmente associados ao processo de carcinogénese. Neste contexto, torna-se importante investigar quais os efeitos do IPL a nível celular, para avaliar o seu potencial carcinogénico, uma vez que neste campo, existe apenas um estudo de Hedelund (37) e colaboradores que avaliou o potencial carcinogénico desta radiação em conjunto com a radiação UV, verificando que esta por si só não apresenta potencial carcinogénico, mas que em pele irradiada com IPL e posteriormente com UV, há uma ligeira tendência para uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de carcinomas.

3. Alterações moleculares associadas ao cancro da pele

O desenvolvimento tumoral não resulta necessariamente de um aumento da proliferação celular, mas sim de um desequilíbrio entre a progressão do ciclo celular e o crescimento celular por um lado, e a morte celular programada, por outro. Estes processos são globalmente controlados por vias de sinalização potencialmente moduladas por diferentes fatores (38,39). O stresse oxidativo parece regular as vias de sinalização que regulam a proliferação e morte celular, uma vez que promovem alterações estruturais e funcionais das biomoléculas e do estado redox celular (40–43).

3.1. Vias de sinalização moduladas no cancro da pele

De entre as vias de sinalização envolvidas no cancro da pele têm sido sugeridas as vias de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK e a PI3K/PTEN/Akt/mTOR (44,45). A via RAS/RAF/MEK/ERK é uma das vias de sinalização do tipo MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e parece ter um papel importante no desenvolvimento de neoplasias melanocíticas (45–47). Esta via estabelece a ponte entre os sinais extracelulares e a maquinaria celular que controla processos fundamentais como a diferenciação, o crescimento, a proliferação, a migração e a apoptose (46–48). Nos melanócitos, esta via é ativada por fatores de crescimento ou por mutações que ocorrem nos genes *RAS* (abreviatura de *Rat Sarcoma*) (48,49). Esta via de sinalização é iniciada por ativação dos recetores tirosina cinase (RTK) com subsequente ativação da proteína Ras (48). Esta liga-se a uma molécula de GTP iniciando a sinalização por ativação de diferentes mediadores, sendo a RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) e a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), as cinases efetoras mais descritas (47,49). A proteína BRAF, membro da família RAF, é recrutada para a membrana onde é fosforilada e atua na fosforilação da MEK, com conseqüente fosforilação e ativação da ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), levando à propagação do sinal a diferentes alvos citoplasmáticos e nucleares (50), como esquematizado na **Figura 2**. A ativação da cinase ERK promove a

transcrição de genes envolvidos na proliferação, na organização da actina e na motilidade celular bem como na proteção contra mecanismos apoptóticos (45,48). Estudos referem que existem mutações que alteram o normal funcionamento de N-Ras (uma das isoformas da proteína Ras, presente em 20% dos melanomas) e mutações na BRAF (presente em cerca de 50% dos melanomas) (51), enquanto no carcinoma das células escamosas a mutação mais prevalente está associada à isoforma H-Ras (38), que evidencia a importância desta via no processo de carcinogénese. Esta ativação aparece assim, associada a indução da carcinogénese na pele, com DMBA/TPA. Uma vez, que o agente iniciador DMBA leva a mutação no códon 61, por transversão de CAA a CTA (52,53).

A ativação de PI3K por RTKs ou pela própria Ras induz a fosforilação de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) com subsequente formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) e ativação de PKB (proteína cinase B, também denominada Akt), que por sua vez ativa fatores de transcrição (**Figura 2**) e participa na inibição das caspases-3, -8 e -9, exercendo um efeito anti-apoptótico (54). Os níveis de PIP3 intracelulares são também regulados pela PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), cuja atividade se encontra alterada no melanoma (50), com consequente ativação da via PIP3/Akt/mTOR (55). A jusante da ativação da Akt surge uma outra serina/treonina cinase, a mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) que pode atuar via dois complexos multiproteicos diferentes designados por mTORC1 e mTORC2 que regulam a síntese proteica, a transcrição de genes e a proliferação celular (56). Existem 3 isoformas de Akt, a Akt1, a Akt2 e a Akt3, sendo que a última foi relacionada com o melanoma, visto que em linhas celulares de melanoma verificou-se uma maior expressão e fosforilação desta isoforma (57). Além disso, no cancro da pele do tipo não melanoma induzido quimicamente em ratos, verificou-se uma relação direta entre a atividade da Akt e a carcinogénese (58). A cinase mTOR está associada a diversos tipos de cancro, tendo sido sugerido que uma maior atividade da mTOR nos melanomas cutâneos (59) constitui um fator de mau prognóstico (60).

A PTEN é uma proteína supressora tumoral, cuja diminuição de atividade está relacionada com a ocorrência de mutações no gene que a codifica (61). Num estudo no qual se procedeu à análise de diferentes amostras biológicas, tais como, biopsias de pele humana normal, biopsias de lesões pré neoplásicas (ceratose actínica, lesão pré-maligna resultante da exposição a UV solar), biopsias de pele da zona dorsal de ratos e culturas

celulares de queratinócitos, os autores concluíram que após a irradiação com UVB havia uma redução na expressão de PTEN (39).

A desregulação destas vias de sinalização pode ter origem em alterações genéticas promovidas por agentes mutagênicos como a radiação UV, que entre vários efeitos induz a dimerização de timinas no DNA, mutações que resultam no comprometimento dos níveis de PI3K, na perda da função de PTEN e na elevada expressão e fosforilação da Akt (45,62).

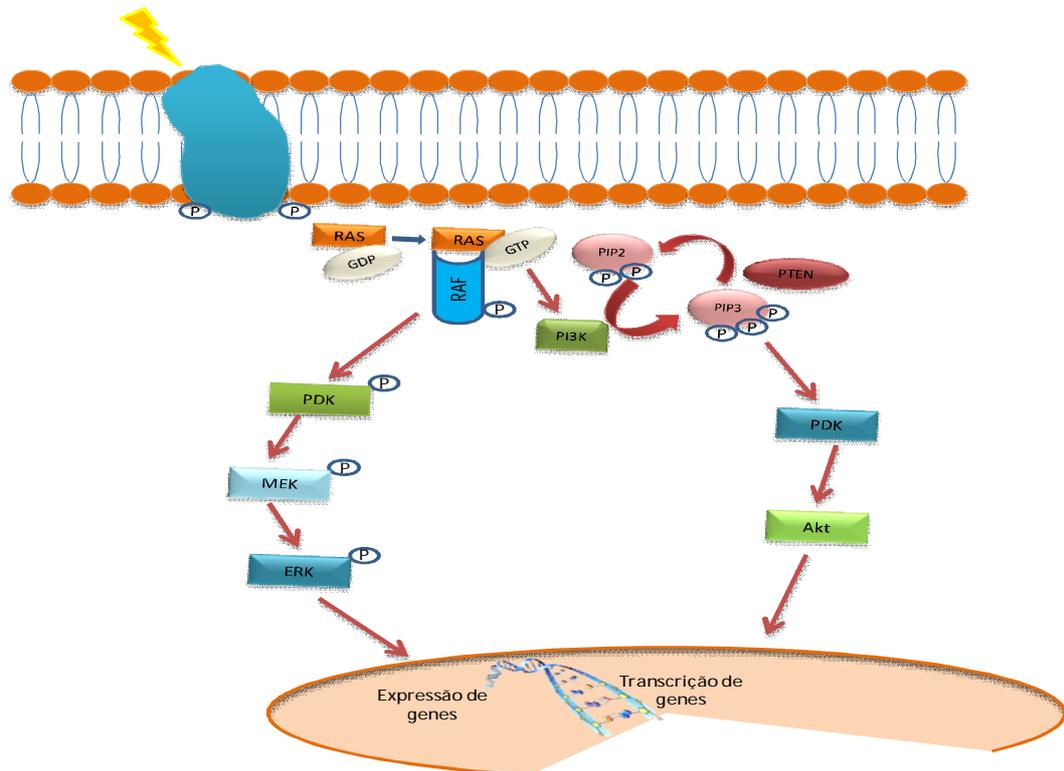


Figura 2- Representação esquemática das vias RAS/RAF/MEK/ERK e da via PI3K/PTEN/Akt. Após a estimulação por um sinal extracelular há a ativação da proteína RAS que por sua vez fosforila a proteína RAF iniciando assim uma cascata de reações que passa pela fosforilação da MEK e ERK e culmina com a variação da expressão de genes no núcleo. Por sua vez a proteína RAS pode ainda estar envolvida na ativação da via PI3K e na cascata de reações associadas regulando a transcrição de genes (adaptado de 19).

Outra via de sinalização com um papel importante na patogênese do cancro da pele envolve a família de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma/leucemia-2*) que regula a apoptose. Esta família de proteínas engloba membros anti- e pró-apoptóticos, localizados na membrana externa mitocondrial, na membrana nuclear e ainda no retículo endoplasmático. Dentro desta família, as proteínas Bcl-2, Mcl-1 e A1 inibem a

apoptose enquanto as proteínas Bax, Bak e Bad promovem a morte celular programada (50). A permeabilidade da membrana externa mitocondrial é regulada pela interação entre os membros pró- e anti-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2 (63). Na pele, mais concretamente na epiderme, foram detetados vários membros da família de proteínas Bcl-2, com ação anti-apoptótica nos queratinócitos e melanócitos (63–65). Níveis aumentados de Bcl-2 têm sido encontrados em lesões pré-malignas e malignas com origem nos queratinócitos, na ceratose actínica e carcinomas das células escamosas e basocelulares, o que sugere o envolvimento desta proteína no desenvolvimento da malignidade nos queratinócitos (66).

As espécies reativas de oxigénio e azoto têm sido associadas à desregulação de várias vias de sinalização, como por exemplo da via MAPK. Esta via de sinalização é ativada em condições de stresse oxidativo, pelo comprometimento da função da proteína tioredoxina, devido à oxidação de dois resíduos de cisteína que se encontram no seu centro ativo (40). Outra via modulada em vários tipos de cancro é a PI3K, sendo que a ativação desta via é controlada pela PTEN. Esta via é reversivelmente regulada pelo nível redox celular. A oxidação dos resíduos de cisteína presentes no domínio catalítico da PTEN resulta na sua inativação, um processo que parece ser mediado pelo H_2O_2 (40). Estas evidências suportam estudos anteriores que têm relacionado os níveis elevados de ROS com a aquisição de autossuficiência em fatores de crescimento, a insensibilidade a fatores anti-crescimento, a fuga à apoptose, a aquisição de um potencial replicativo ilimitado bem como a capacidade de invasão e metastização das células tumorais da pele (67–69).

3.2. Papel do stresse oxidativo no cancro da pele

O stresse oxidativo está associado à etiologia e progressão de diversas patologias incluindo o cancro da pele (41). A formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) é uma consequência da vida aeróbia, cuja ação potencialmente lesiva, na célula é controlada pelos sistemas antioxidantes. As ROS têm origem na redução parcial do oxigénio molecular (O_2) na mitocôndria, com conseqüente formação de espécies radicalares e não radicalares. De entre os radicais é de destacar o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o hidroxilo ($\bullet OH$), enquanto as espécies não radicalares incluem o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl). Além dos ROS existem também as

espécies reativas de azoto (RNS), que incluem entre outras espécies, o óxido nítrico (NO^\bullet) e ainda o peroxinitrito, que resulta da reação entre o NO^\bullet e o $\text{O}_2^{\bullet-}$. As células defendem-se destas espécies potencialmente lesivas recorrendo a sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. De entre os sistemas enzimáticos é de destacar a ação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e a tioredoxina. A superóxido dismutase catalisa a conversão do anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogénio (H_2O_2), sendo que este é o substrato da catalase ou da glutathione peroxidase que o convertem em H_2O (**Figura 3**). De entre os sistemas antioxidantes não enzimáticos é de salientar o ácido ascórbico (vitamina C), os carotenóides, os flavonóides, a glutathione (GSH) e o α -tocoferol (vitamina E). A inativação ou alteração dos sistemas antioxidantes parece ocorrer em células tumorais, manifestando-se numa menor atividade das enzimas CuZn-SOD, Mn-SOD, CAT e GPxs (70).

As fontes de espécies reativas de oxigénio são variadas, podendo ser endógenas e exógenas. A cadeia respiratória mitocondrial constitui uma das principais fontes endógenas de ROS, sendo ainda de salientar a ativação de células inflamatórias (71). No segundo grupo estão incluídos os vários tipos de agentes químicos e físicos como os metais pesados, compostos tóxicos e as radiações ionizantes (72). Dentro do espectro eletromagnético, as radiações dividem-se entre radiações ionizantes (com elevadas frequências e baixos comprimentos de onda) e não ionizantes (baixa frequência e elevado comprimento de onda). As radiações de muito elevada energia (elevada frequência) como os raios-X e os raios- γ podem causar danos severos na pele. No entanto, a exposição a estas radiações é menos frequente (41). Contudo, verificou-se que a exposição à luz visível, a mais comum, pode aumentar a produção de ROS, como demonstrado num estudo com culturas de queratinócitos humanos (73). Também a exposição prolongada à radiação infravermelha, está associada à ceratose actínica, uma lesão benigna precursora do carcinoma espinocelular (74). Todavia, o tipo de radiação mais associado ao stresse oxidativo e por sua vez ao cancro de pele é a Luz Ultravioleta (41,75).

O desenvolvimento do cancro da pele engloba três fases distintas: a iniciação, a promoção e a progressão. Estas são mediadas por uma variedade de alterações celulares e moleculares nas quais as espécies reativas de oxigénio e de azoto parecem ter um papel ativo (42). Em condições de stresse oxidativo as ROS podem reagir com as

biomoléculas, causando danos nas membranas celulares por peroxidação lipídica, danos no DNA e em proteínas, comprometendo a sua função (76) (Figura 3).

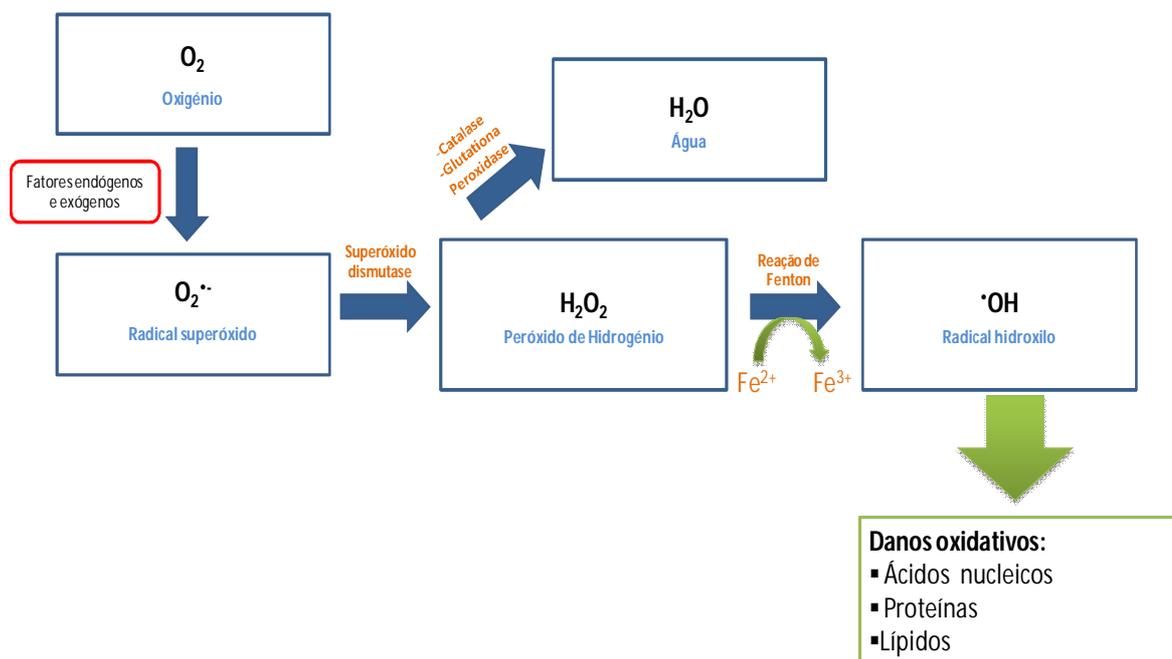


Figura 3 – Esquema evidenciando a formação de espécies reativas de oxigênio, os mecanismos enzimáticos antioxidantes e as biomoléculas alvo a nível celular.

Os danos oxidativos em proteínas dão origem a modificações na estrutura tridimensional e nas suas propriedades físico-químicas, o que resulta numa maior fragmentação, agregação e aumento da suscetibilidade à proteólise (77). A oxidação de proteínas pode ocorrer devido à ação das ROS ou RNS ou ainda pela reação com produtos secundários resultantes do stresse oxidativo, podendo assim promover o processo de carcinogénese (41).

3.2.1. Modificações oxidativas em proteínas e a sua análise por proteómica

O estudo das alterações oxidativas em proteínas é importante dado que estas biomoléculas desempenham papéis vitais na regulação da estrutura e sinalização celular, bem como em processos enzimáticos e metabólicos. Assim, qualquer alteração que comprometa a função das proteínas terá impacto na atividade celular (78).

A oxidação de proteínas corresponde a uma alteração covalente que ocorre na proteína e que pode ser induzida tanto por ROS e RNS como pela reação com produtos secundários resultantes do stresse oxidativo. São vários os tipos de oxidação que podem ocorrer ao nível das proteínas, sendo a carbonilação uma das mais comumente estudada (79,80). Os grupos carbonilos são altamente estáveis pelo que constituem um marcador adequado para deteção de danos oxidativos em proteínas. Estes grupos podem surgir da oxidação de cadeias laterais de aminoácidos em particular da prolina, arginina, lisina, treonina e ainda da histidina; da fragmentação do *backbone* da proteína, da remoção de hidrogénios do carbono alfa e ainda da adição de aminoácidos. Os grupos carbonilo também podem ser integrados nas proteínas pela introdução de aldeídos (ex: resultantes da peroxidação lipídica), ou por reação com outros derivados reativos de carbonilos (gerados pela reação de açúcares redutores, ou pelos seus produtos de oxidação, com resíduos de lisina nas proteínas) (81,82). Os resíduos de aminoácidos que contenham enxofre (cisteína e metionina) e os resíduos de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) são particularmente sensíveis à lesão oxidativa, tanto pela ação das ROS como das RNS (81,83). Assim, os grupos carbonilos presentes em proteínas indicam a extensão dos danos oxidativos causados numa dada situação de stresse, pelo que o teor de grupos carbonilo constitui um bom marcador de oxidação de proteínas. Em condições normais, os grupos carbonilo estão presentes em níveis muito baixos, aproximadamente 1 grupo carbonilo a cada 300 resíduos de aminoácidos, aumentando significativamente em condições de stresse oxidativo (80).

As RNS são também responsáveis pelos danos celulares pela nitração do aminoácido tirosina, a 3-nitrotirosina (3-NT), podendo assim, comprometer a integridade funcional e estrutural de diversas proteínas. A 3-NT tem sido avaliada laboratorialmente como um marcador dos efeitos lesivos do peroxinitrito, pelo aumento da produção de óxido nítrico e de superóxido, a nível celular. O aumento dos níveis de 3-NT tem sido associado a diversas condições patológicas, tais como as doenças neurodegenerativas (77). No entanto, não se conhecem estudos que estabeleçam uma associação direta entre os níveis de 3-NT e o cancro da pele, nem que defina quais as proteínas mais suscetíveis a esta modificação oxidativa.

Na caracterização das proteínas mais suscetíveis a modificações oxidativas, na identificação do tipo de modificação e na localização destas nos domínios estruturais da proteína, as abordagens de proteómica baseadas em espectrometria de massa (MS) são

as mais comuns. Efetivamente a MS permite mapear e quantificar os locais das modificações, fornecendo a localização da modificação oxidativa (79,84). No entanto, a análise de amostras biológicas mais complexas, como os extratos de pele ou culturas celulares é necessário uma preparação prévia da amostra e separação das proteínas antes de proceder à sua caracterização por MS. Neste contexto, tem sido aplicada um tipo de abordagem proteómica que assenta em dois tipos de abordagens na separação de proteínas: os métodos baseados em gel (*gel-based*) e os independentes de gel (*gel-free-based*) (77,85). Nos métodos baseados em gel as proteínas são extraídas dos tecidos biológicos e separadas por electroforese 2-DE. Na eletroforese em gel de poliacrilamida 2-DE, as proteínas são separadas, numa primeira etapa, de acordo com o seu ponto isoelétrico (Focagem isoelétrica) e pelo peso molecular (SDS-PAGE) (86), numa segunda etapa, sendo posteriormente extraídas do gel e digeridas enzimaticamente. Posteriormente são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, com vista à imunodeteção das proteínas oxidadas com anticorpos específicos para os diferentes tipos de modificações oxidativas. Contudo, a separação em gel apresenta algumas limitações relacionadas com a elevada quantidade de amostra requerida e a reprodutibilidade entre géis (87). Nos métodos independentes de géis, a forma de separação mais comum é a cromatografia de fase líquida. A separação por LC apresenta-se como uma alternativa adequada, pois permite separar os peptídeos resultantes da digestão proteolítica das proteínas da amostra com base em propriedades como a polaridade, permitindo aumentar a sensibilidade e seletividade da separação (88).

Para a análise e deteção dos grupos carbonilos é efetuado um tratamento prévio da amostra com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNHP) com vista à formação de aductos estáveis com as proteínas carboniladas (DNP)(89), posteriormente detetadas com um anticorpo anti-DNP (*imunoblotting* ou *oxyblotting*). Similarmente, outras modificações oxidativas, como a 3-NT são detetadas com recursos a anticorpos anti-nitrotirosina (77). Após a análise comparativa do *imunoblott* com um gel 2-DE corado, são seleccionados os *spots* correspondentes às proteínas oxidadas, para posterior identificação destas por MS (**Figura 4**).

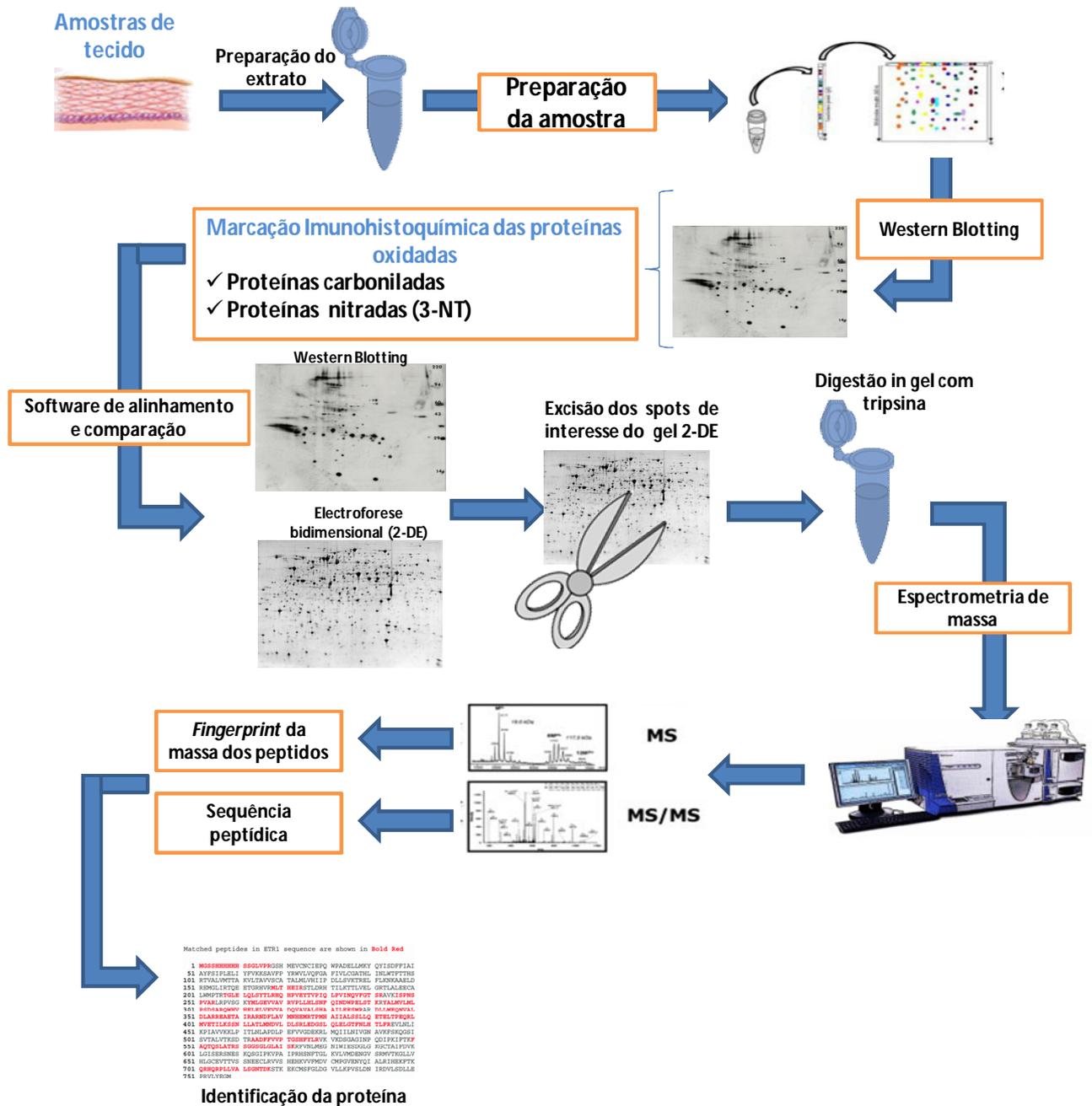


Figura 4 - Esquema representativo da abordagem de proteômica redox pelo método baseado em gel (adaptado de 75).

3.2.2. Papel da radiação UV no stresse oxidativo: consequências no proteoma da pele

A pele está exposta a vários agentes químicos e físicos que promovem stresse oxidativo com subsequentes alterações moleculares. De entre os vários tipos de radiações que induzem o aumento stresse oxidativo na pele, a radiação ultravioleta constitui o fator etiológico mais estudado associado ao stresse oxidativo na pele, não sendo ainda conhecidos os efeitos de outros tipos de radiação, como a IPL, na suscetibilidade das proteínas a oxidação. A radiação UV compreende três tipos principais, de acordo com o comprimento de onda: UVC (100-280nm), UVB (280-320nm) e UVA (320-400nm). A radiação UVC é totalmente absorvida pela camada de ozono presente na atmosfera, assim como grande parte da radiação UVB, ao contrário da UVA que não é absorvida. A radiação UVB é absorvida pela epiderme, enquanto a UVA consegue penetrar mais profundamente na derme. As radiações UVA e UVB induzem stresse oxidativo na pele, pela formação de ROS e RNS ou por oxidar diretamente macromoléculas, como o DNA, provocando reações de dimerização e/ou promovendo a ativação de fatores de transcrição que são responsáveis pela sobreexpressão de genes que codificam fatores de sobrevivência celular (90,91). A radiação UV também ativa o processo inflamatório na pele, uma importante fonte de ROS, que está relacionada com doenças como o cancro da pele (melanoma e não-melanoma), eritema, queimaduras, imunossupressão e fotoenvelhecimento (92).

As proteínas devido à sua abundância tornam-se o maior alvo dos danos oxidativos. A radiação UV é capaz de induzir dano foto-oxidativo por dois mecanismos distintos, nas diferentes biomoléculas. A primeira envolve a foto-oxidação direta por absorção de UV, pela estrutura primária da proteína ou por cromóforos ligados a estas proteínas, resultando assim na formação de espécies no estado excitado, ou mesmo na formação de radicais pela foto-ionização, sendo que, no geral, estes mecanismos são designados por mecanismos do tipo 1. A segunda maior via diz respeito à oxidação indireta de proteínas via formação e subseqüente reações do oxigénio singleto (1O_2), formado a partir de oxigénio tripleto, pela transferência de energia absorvida pelas moléculas envolventes (cromóforos e ligações peptídicas, etc), sendo que estas reações são designadas por reações do tipo 2 (93). Quais quer que sejam os mecanismos, estas modificações oxidativas podem provocar a fragmentação, o *misfolding*, e a agregação de proteínas

que levam, em última instância, à alteração da sua função (94), e como estas são os principais efetores celulares, as alterações no proteoma podem levar à ativação de fatores de crescimento, recetores de citocinas bem como à ativação de moléculas de sinalização a nível intracelular e a alterações na apoptose celular.

Perluigi e colaboradores (95) avaliaram os efeitos de doses sub-tóxicas de radiação UVB (280-320nm) em culturas de queratinócitos epiteliais humanos, utilizando uma abordagem proteômica. Estes autores identificaram, por 2-DE-MS/MS, nas células expostas a radiação UVB 12 proteínas reguladas positivamente e 3 proteínas reguladas negativamente, envolvidas em diferentes processos celulares. Além disso mostraram ainda que 7 proteínas se encontravam significativamente carboniladas: a PDI A3 (*protein-disulfide isomerase A3*), a GPR78 (*Glucose protein regulated 78*), a Arp-3 (*actin-related protein 3*), a Anx 2 (*Anexina 2*), a α -enolase, a subunidade IIB da glucosidase e por último, as ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas C1/C2. Os autores verificaram ainda que a expressão das proteínas de choque térmico (HSPs) se encontrava aumentada. De referir que estas proteínas estão intimamente ligadas aos mecanismos de controlo da qualidade proteica, isto é, são elementos chave na resposta celular ao stresse oxidativo e ainda à manutenção do *foldings* correto das proteínas (96). Estes resultados sugerem que a radiação UV despoletou um aumento do stresse oxidativo e da oxidação de proteínas envolvidas no *foldings* proteico (como a GRP78 e a PDI). As HSPs atuam reduzindo os efeitos de stresse e previnem a apoptose, permitindo ativar mecanismos de sobrevivência. No entanto, tem sido demonstrado que o fator regulador das HSPs, o HSF-1 (*heat-shock factor 1*) se encontra sobre-expresso em diversas células tumorais da pele (97) e que a irradiação de células com UVB promove um aumento significativo da expressão da HSP70 e HSP60 (95,98). A função anti-apoptótica das HSPs parece estar relacionada com duas vias de sinalização distintas, nas quais a HSP70 parece ter um papel importante. A HSP70 promove a inativação da via de sinalização JNK, o que inibe a translocação da Bax para a mitocôndria contudo, alternativamente, a HSP70 interage com a Bax podendo inativá-la diretamente. Estas duas vias culminam na inibição da libertação do citocromo c para o citoplasma, inativando assim a via intrínseca da apoptose (98).

Outras proteínas importantes na manutenção da qualidade proteica são a GRP78 e a PDI. A GPR78 está envolvida na ativação da UPR (*Unfolded Protein Response*), um dos mecanismos do controlo de qualidade das proteínas que promove a sobrevivência celular e inibe a apoptose (99). A proteína dissulfeto isomerase (PDI) catalisa a formação e rearranjo de ligações dissulfeto entre aminoácidos durante o *folding* proteico, e parece também estar envolvida em processos de adesão celular, regulação génica, na polimerização dos filamentos de actina (95), e na migração e invasão das células tumorais (100). Esta proteína tem sido associada ao desenvolvimento do cancro da pele, à sua malignidade, e à elevada capacidade de invasão e metastização do melanoma (98,101). Após a inibição da atividade da PDI verifica-se um aumento da apoptose das células de melanoma (102).

Ainda relativamente ao papel da UV na carcinogénese, Wu e colaboradores (98), verificaram alterações da expressão de várias proteínas em linhas celulares de fibroblastos de pele normal (CCD-966SK), após exposição a diferentes doses de radiação UVB. Verificaram também que após 20 minutos de irradiação havia um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigénio, que era dependente da dose e ainda que a irradiação alterava o estado oxidativo dos grupos tióis de algumas das proteínas analisadas, o que pode resultar na alteração da função dessas proteínas. Este estudo sugere que a radiação UV tem a capacidade de regular a expressão das proteínas e que em combinação com as modificações redox, compromete a fisiologia celular.

De entre algumas das proteínas com expressão alterada pela radiação UV, destacam-se a PHB (proibitina), a fascina e a cofilina, proteínas que estão envolvidas em diferentes processos celulares como a proliferação e a migração celular. A proibitina é uma proteína ubiquamente expressa com um papel importante na regulação da transcrição, sendo ainda essencial para a proliferação celular. Esta proteína bloqueia a entrada da célula na fase S do ciclo celular, tendo uma baixa expressão em tecidos normais, mas uma expressão elevada em diversos tumores (103). É uma proteína cuja expressão aumenta em resposta à irradiação de UVB (98). A fascina e a cofilina constituem outro tipo de proteínas que parecem estar relacionadas na resposta celular à radiação UV. Estas proteínas participam na regulação da migração e motilidade celular, uma vez que controlam a ação da actina. A expressão destas proteínas encontra-se aumentada após a irradiação com UVB (98). A fascina encontra-se em níveis elevados nos carcinomas das células basais, que apresentam uma reduzida metastização, mas

encontra-se diminuída nos melanomas onde a metastização é muito elevada, sugerindo que a capacidade de metastização é inversamente proporcional à expressão de fascina (104,105). Neste sentido, os autores sugeriram que a modificação redox promovida pela radiação UVB pode alterar as condições fisiológicas celulares a ponto de desencadear prematuramente o processo de carcinogénese (98).

II. Objetivos

II. Objetivos

A IPL é uma tecnologia com bastante aplicação na estética e na dermatologia devido ao seu caráter não invasivo e aos efeitos visíveis no tratamento do fotoenvelhecimento, na remoção de pelos e ainda no tratamento de lesões vasculares. No sentido de melhor compreender os mecanismos moleculares regulados na pele pela exposição à IPL, o presente estudo teve como objetivos:

- i) Avaliar o efeito da IPL na suscetibilidade do proteoma da pele normal e da pele com lesões cutâneas pré-neoplásicas, à lesão oxidativa, utilizando um modelo animal de carcinogénese, tendo-se em consideração dois estadios do desenvolvimento neoplásico;

- ii) Relacionar as alterações do proteoma da pele com alterações sistémicas nos animais, de modo a avaliar o potencial efeito, a longo prazo, da utilização desta tecnologia em estética e dermatologia;

III. Material e Métodos

III. Material e Métodos

1. Reagentes

7,12-dimetilbenzentraceno (DMBA); acetato de tetradecanoilforbol (TPA), 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amónia]-1-propano-sulfonato (CHAPS); glicina; Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris) e os filmes de raio-X (Kodak Biomax Light Film) foram adquiridos à empresa Sigma Aldrich; ureia foi obtida da GE Health Life Sciences; tiourea foi adquirida à Riedel-de-Haën; mercaptoetanol foi obtido da Merck Millipore; os reagentes de ECL foram comprados à Amersham Pharmacia Biotech. A xilazina (Rompum) adquirida à Bayer HealthCare. Os anticorpos *rabbit polyclonal* anti-GAPDH (ab9485), *mouse monoclonal* anti-ATP sintase β (ab14730), *rabbit polyclonal* anti-IL-6 (ab6672), *rabbit monoclonal* anti-proteína C reativa (ab32412) foram adquiridos à empresa Abcam (Cambridge, UK). Os anticorpos secundários conjugados com peroxidases anti-*mouse* IgG e anti-*rabbit* IgG, adquiridos à empresa GE Healthcare (UK). O anticorpo *rabbit polyclonal* anti-DNP foi obtido à empresa DakoCytomation (Hamburg; Germany) e o anticorpo *rabbit monoclonal* anti-3-nitrotirosina adquirido à empresa Merck Millipore.

2. Desenho experimental

De forma a atingir os objetivos propostos para este estudo, realizou-se a abordagem experimental apresentada na Figura 5. Para este protocolo foram usados 28 murganhos, da espécie *Mus musculus*, estirpe ICR (CD-1[®]), do sexo feminino, com cerca de 5 semanas de idade, adquiridos à empresa Harlan-Interfauna (Barcelona, Espanha). Os murganhos foram distribuídos aleatoriamente por 5 grupos experimentais, sendo que os grupos DMBA e Controlo foram constituídos por 5 animais e os restantes grupos por 6 animais. O grupo DMBA foi submetido ao agente iniciador 7,12-dimetilbenzentraceno (DMBA); o grupo DMBA+IPL foi submetido à ação do DMBA e posteriormente a tratamento com IPL; o grupo DMBA+TPA foi submetido a tratamento com DMBA e posteriormente exposto ao composto promotor da carcinogénese, o acetato de

tetradecanoilforbol (TPA); o grupo IPL foi exposto apenas à IPL; aos animais do grupo Controlo foi aplicado na pele o veículo utilizado na preparação das soluções de DMBA e TPA, isto é, acetona.

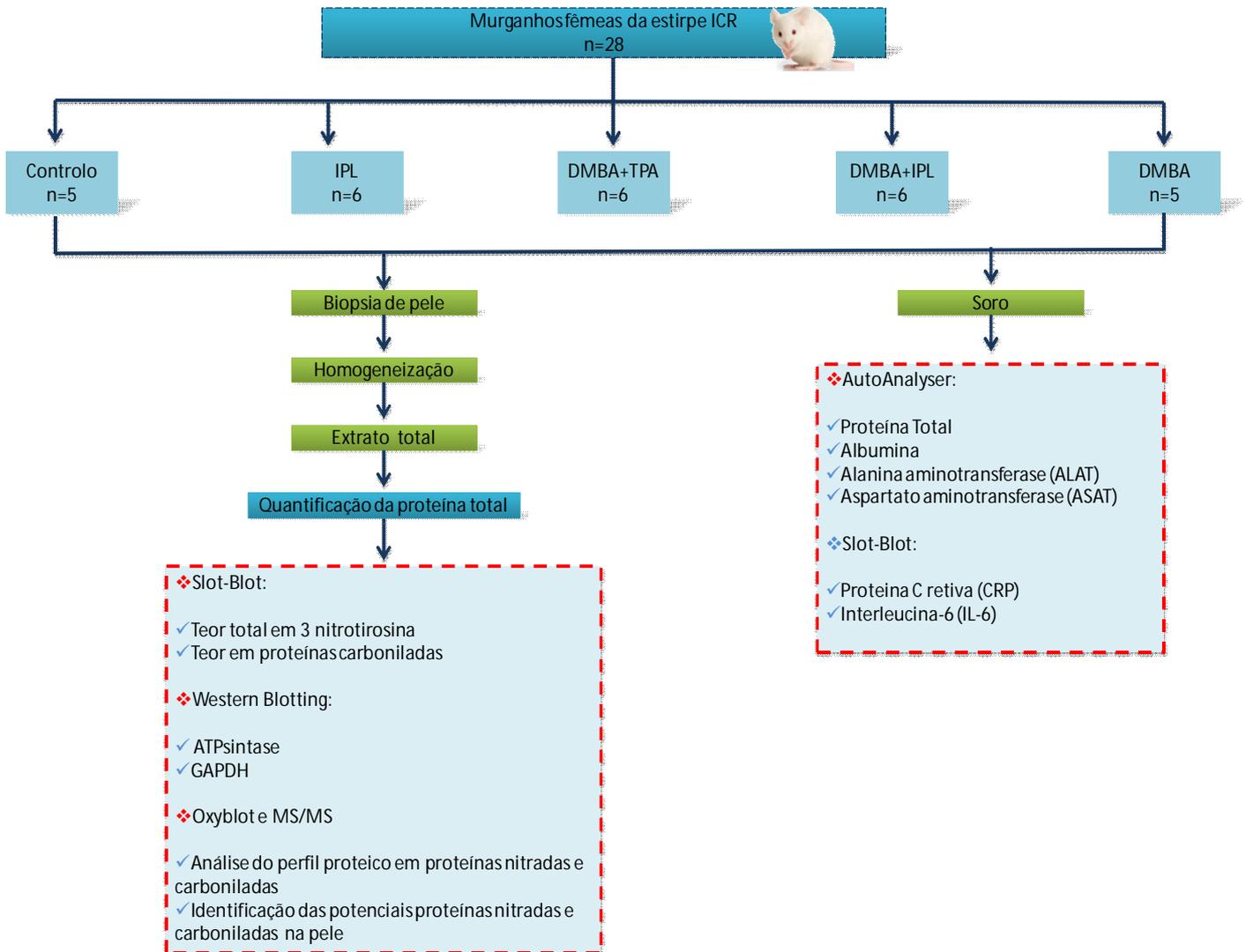


Figura 5 – Esquema do procedimento metodológico utilizado no presente estudo para avaliar o efeito da IPL na pele saudável e com lesões neoplásicas.

3. Protocolo animal

O protocolo animal foi realizado de acordo com a Portaria nº1005/92 de 23 de Outubro, e com os regulamentos da Legislação da Comunidade Europeia para o Bem-estar Animal e decorreu no biotério da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Este iniciou-se com o corte do pelo dos murganhos na região do dorso a ser exposta a agentes químicos e/ou IPL. O corte do pelo foi efetuado quinzenalmente, com uma máquina de tosquia (Braun, modelo AESCULAP, Isis GT 420). Aos animais dos grupos DMBA, DMBA+IPL e DMBA+TPA foi efetuada a aplicação tópica de uma única dose de solução do iniciador (2 mM de DMBA), uma semana após a remoção do pelo. Quatro dias após a aplicação do iniciador, aos animais do grupo DMBA+TPA passou a aplicar-se o TPA (100 µM), duas vezes por semana, durante 25 semanas. Os animais dos grupos DMBA+IPL e IPL foram submetidos a 2 pulsos de luz pulsátil, na intensidade 5 do aparelho (correspondente a uma fluência de 6,5 J/cm² numa área de 6 cm²), duas vezes por semana e durante todo o protocolo animal. Para o efeito utilizou-se um aparelho Phillips Lumea[®]. Os pulsos de IPL foram aplicados paralelamente à linha sagital do dorso dos murganhos. Aos animais do grupo Controlo foi aplicada acetona na pele, duas vezes por semana, até ao fim do ensaio. Utilizou-se este composto uma vez que as soluções de DMBA e TPA foram preparadas em acetona. A aplicação de TPA e DMBA foi realizada numa câmara de fluxo laminar.

Os animais foram pesados individualmente no início da experiência e imediatamente antes do sacrifício. Durante o protocolo animal controlou-se as variações de peso de animais vs. consumo de alimento e bebida. Para as pesagens dos animais utilizou-se uma balança Mettler PM 4000. Ao longo do protocolo animal monitorizou-se o aparecimento de lesões cutâneas nos locais da pele sob tratamento.

4. Preparação das amostras de soro e de extratos de pele

Uma vez concluído o protocolo experimental os animais foram eutanasiados por injeção de uma *overdose* de xilazina (Rompum) por administração intraperitoneal. Foi recolhido sangue por punção cardíaca direta, método aceite pela FELASA, para posteriores análises bioquímicas e, recolheram-se porções de pele submetidas aos tratamentos para análise histológica e bioquímica. As amostras para histologia foram colocadas em formol tamponado a 10% e processado de acordo com o procedimento de rotina para a microscopia ótica. Foram preparadas seções de tecido de 2 μm de espessura. Após desparafinação em xilol, as seções de tecido foram hidratadas em soluções de álcoois de concentração decrescente e coradas pelo método convencional de Hematoxilina-Eosina.

Para análise bioquímica homogeneizaram-se as amostras de pele em tampão de homogeneização (7 M ureia, 2 M tioureia, 4% CHAPS, 0,1% PMSF), na proporção de 50 mg de tecido por mililitro de tampão de homogeneização. A homogeneização foi realizada com um Potter-Elvehjem. Os extratos obtidos foram separados em alíquotas e guardados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Determinação de parâmetros séricos

A concentração de proteína total, de albumina, a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALAT) e aspartato aminotransferase (ASAT) foram determinadas nas amostras de soro dos animais de todos os grupos experimentais, em duplicado, num AutoAnalyzer (PRESTIGE 24i, Cormay PZ). O teor em interleucina-6 (IL-6) e de proteína C reativa (CRP) foi determinado por *Slot-Blot*. Para o efeito, diluíram-se 10 μL de cada amostra de soro em 450 μL de tampão TBS (10 mM Tris, 0,15 mM NaCl, pH 8,0) e adicionaram-se 100 μL de cada amostra a cada poço do *Slot-Blot*. Sob vácuo imobilizaram-se as proteínas do soro numa membrana de nitrocelulose (Whatman[®], Protan[®]). O procedimento de imunodeteção foi efetuado como descrito no ponto 7, utilizando como anticorpos primários anti-IL-6 e anti-CRP e anticorpos secundários anti-*rabbit* IgG.

6. Quantificação da proteína total nos extratos de pele

A quantificação de proteína total dos homogeneizados de pele foi efetuada com recurso ao kit comercial RC/DC (Bio-Rad, USA), um método colorimétrico que se baseia no procedimento descrito por Lowry (1956), com a vantagem de minimizar a interferência de constituintes do tampão de homogeneização. Amostras de extratos de pele e soluções de albumina de soro bovino (BSA), com concentrações entre 10 mg/mL a 0,3 mg/mL foram processadas simultaneamente de acordo com as instruções do fornecedor. As absorvências foram determinadas a 750 nm num leitor de placas (Multiscan 90, Thermocientific). Com os valores de absorvência das soluções de BSA construiu-se a curva de calibração utilizada para a determinação da concentração de proteína total nos extratos de pele.

7. Análise por *Western Blotting*

Para a análise de proteínas alvo nas amostras de extratos de pele, procedeu-se à separação eletroforética num gel SDS-PAGE 12,5% de um dado volume de extrato contendo 40 µg de proteína. As amostras foram previamente diluídas em tampão de redução (10% SDS, 0,5 M de Tris pH 6,8, 15 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol e 20% β-mercaptoetanol) e fervidas durante 5 minutos. Depois de separadas as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman[®], Protan[®]), por eletrotransferência em tampão de 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20 % de metanol, durante 2 horas a 200 mA. Para a imunodeteção, numa primeira etapa procedeu-se ao bloqueamento da membrana com uma solução de 5 % de leite magro em pó em TBS-T (TBS com 0,5 % Tween 20), durante 1 hora sob agitação, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo. A membrana foi posteriormente incubada com uma solução de anticorpo primário diluído 1:1000 em solução de bloqueamento (*rabbit polyclonal* anti-GAPDH ou *mouse monoclonal* anti-ATP sintase subunidade β), durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. Após a lavagem da membrana com TBS-T, três vezes, 10 minutos cada, sob agitação, incubou-se a membrana com uma solução de anticorpo secundário diluído 1:1000 em solução de bloqueamento (anti-

rabbit ou anti-*mouse*), durante uma hora à temperatura ambiente, com agitação. A membrana foi posteriormente lavada com TBS-T, três vezes, 10 minutos cada, com agitação. A membrana foi finalmente incubada durante 1 minuto com uma solução de quimioluminescência e posteriormente exposta a um filme de raio-X, que após ser revelado e fixado, foi digitalizado no Gel Doc XR+ System (BioRad) e analisado com o *Software Image Lab* (BioRad, versão 5.0).

8. Determinação de proteínas oxidadas em extratos de pele

8.1. Determinação do teor total de 3-nitrotirosina e de grupos carbonilo

A detecção das proteínas nitradas foi realizada pela determinação de 3-nitrotirosina por *Slot-Blot*. Um volume (1V) de homogeneizado de pele foi diluído em tampão TBS para a obtenção de uma concentração final de 10 µg de proteína/100 µL. A cada poço do sistema de *Slot-Blot* adicionaram-se 100 µL de amostra diluída e sob vácuo imobilizaram-se as proteínas numa membrana de nitrocelulose (Whatman[®], Protan[®]). A imunodeteção foi efetuada como descrito no ponto 7, utilizando um anticorpo primário *rabbit monoclonal* anti-3-nitrotirosina e um anticorpo secundário anti-*rabbit*.

Para a detecção de grupos carbonilo seguiu-se o procedimento descrito na Figura 6. Em resumo, a um determinado volume (1V) de amostra contendo 20 µg de proteína adicionou-se 1V de solução de 12% SDS e 2V de solução 20 mM de DNPH preparado em 10% TFA, seguindo-se a sua incubação no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após este passo, procedeu-se à neutralização com 1,5 V de solução de 2 M de Tris e 18% β-mercaptoetanol. De seguida diluíram-se as amostras com TBS de forma a obter uma concentração final de 0,001 µg/µL e transferiu-se um volume de 100 µL para uma membrana de nitrocelulose (Whatman[®], Protan[®]) por *Slot-Blot*. A imunodeteção foi efetuada como descrito no ponto 7, utilizando um anticorpo *rabbit policlonal* anti-DNP, como anticorpo primário e um anticorpo anti-*rabbit* como anticorpo secundário.

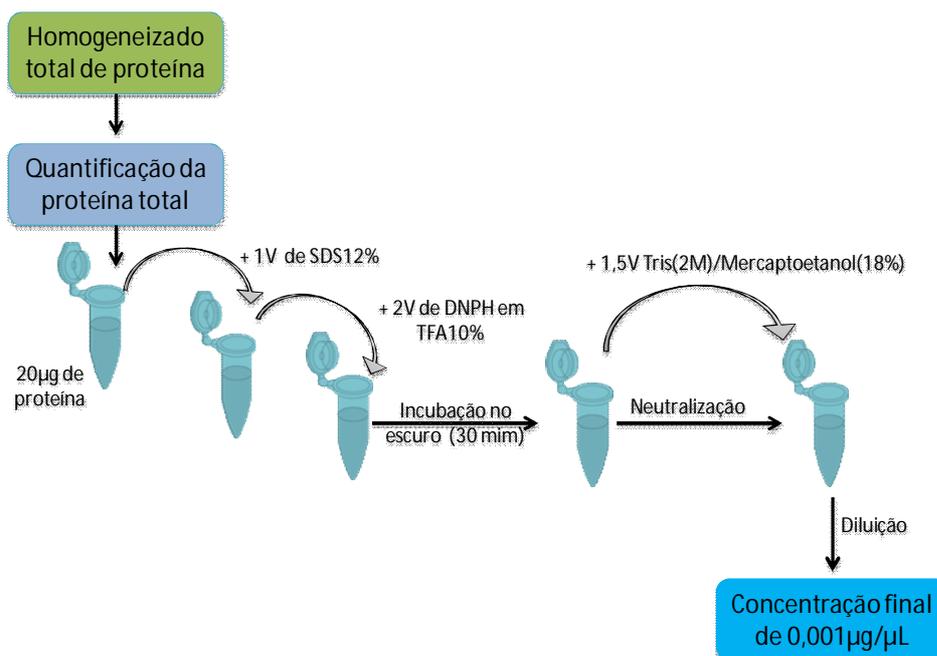


Figura 6 - Derivatização das amostras para a determinação do teor em proteínas carboniladas (V refere-se a um dado volume de amostra contendo 20 µg de proteína total).

8.2. Oxyblot para determinação das proteínas oxidadas

Para a análise por eletroforese bidimensional das proteínas dos extratos de pele solubilizou-se a amostra em tampão de rehidração (8 M ureia, 2 M tiourea, 1% CHAPS, 12,9 mM DTT, 1% anfólitos 3-10; 0,01% azul de bromofenol) perfazendo um volume de 120 µL. A amostra solubilizada foi aplicada na extremidade anódica do IPG *strip holder*. Com a ajuda de uma pinça, retirou-se a proteção da tira IPG e colocou-se esta no IPG *strip holder*, começando por encaixar a tira do lado do ânodo e evitou-se a formação de bolhas de ar sob a tira. Seguidamente, adicionaram-se algumas gotas de *Drystrip Cover Fluid* (Plusone) de forma a cobrir toda a tira, para evitar a desidratação. Finalmente, colocou-se o IPG *strip holder* no aparelho de focagem isoeletrica de acordo com as instruções do aparelho. O programa de focagem isoeletrica compreendeu as seguintes fases: (temperatura a 20°C): 12 horas de rehidratação; 1 hora a 150 V (gradiente); 1 hora a 500 V (gradiente); 1 hora a 1000 V (gradiente); 1,5 horas a 5000V (*Step-n-old*). Uma vez concluída a focagem isoeletrica retirou-se a tira, secou-se com papel de filtro e lavou-se com tampão de corrida. A tira foi colocada num tubo de vidro e adicionou-se 2 mL de tampão de equilíbrio (1,5 M Tris pH 8,8, ureia, 30% glicerol,

2% SDS), ficando sob agitação durante 15 minutos. A tira foi posteriormente colocada sobre um gel de 12,5 % SDS-PAGE, para a análise geral do perfil de proteínas ou para a identificação das proteínas nitradas.

Para a análise de proteínas carboniladas, a tira foi incubada com 5 mL de 12% SDS, no escuro e em agitação, durante 20 minutos. De seguida, a tira foi colocada numa solução de 20 mM DNPH, no escuro e em agitação, durante 1 hora e, por último, procedeu-se à incubação com 3 mL de tampão de equilíbrio, ficando sob agitação durante 30 minutos. De seguida, a tira foi aplicada sobre um gel de 12,5% SDS-PAGE.

A separação das proteínas com base no tamanho foi efetuada a 150 V. Finalizada a corrida, o gel foi corado ou transferido para uma membrana de nitrocelulose. Para coloração do gel utilizou-se o corante comercial BlueSafe (Nztech). Para a análise por imunoblotting das proteínas carboniladas e nitradas, procedeu-se à transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose de acordo com o procedimento descrito no ponto 7. Os géis e os filmes foram digitalizados no Gel Doc XR+System (BioRad) e analisados com o *software* PDQuest (BioRad).

Os *spots* de proteínas suscetíveis à carbonilação e à nitração foram extraídos do gel corado e posteriormente digeridos com tripsina. Em resumo, as porções de gel foram lavadas duas vezes com 25 mM de bicarbonato de amónia/50% acetonitrilo, seguido por uma lavagem com 100% acetonitrilo. Depois de secos sob vácuo (Speed Vac, Thermo Savant, USA), adicionaram-se 20 µL de uma solução com 10 µg/mL de tripsina diluída em 50 mM bicarbonato de amónia. As porções de gel foram incubadas em solução de tripsina durante a noite a 37°C. Os digestos trípticos foram extraídos do gel com ácido fórmico e depois de concentrados sob vácuo, foram ressuspensos em 10 µL de uma solução de 50% acetonitrilo e 0,1% de ácido trifluoracético.

9. Identificação das proteínas por MS/MS

Os espectros de massa foram obtidos num espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800 AbSCIEX). Os dez picos mais intensos em cada *spot* foram selecionados para posterior aquisição de espectros de MS/MS, excluindo os picos da matriz, da autólise da tripsina ou da acrilamida. Os picos da autólise da tripsina foram utilizados para calibração interna dos espectros de massa, permitindo uma precisão superior a 25 ppm. Os espectros foram processados e analisados pela *Global Protein Server Workstation* (Applied Biosystems), que usa como motor de busca Mascot (Matrix Science, UK), para a identificação de proteínas, conjugando dados de PMF (*peptide mass fingerprinting*) com dados de MS/MS para pesquisa numa base de dados interna. A identificação da proteína foi considerada, quando o grau de confiança foi superior a 98 %.

10. Análise estatística

As variáveis analisadas apresentaram uma distribuição normal, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. Por essa razão, os resultados obtidos das análises bioquímicas efetuadas foram processados recorrendo aos testes estatísticos paramétricos. Para testar as diferenças entre os diferentes grupos experimentais efetuou-se uma análise de variância multifatorial one-way ANOVA, seguida da aplicação do teste *Tukey post-hoc* de comparação múltipla. Os cálculos foram efetuados com o *software GrafPad Prism* (versão 5.0). Os valores obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os resultados para todas as variáveis são apresentados como média \pm desvio padrão.

IV. Resultados

IV. Resultados

1. Caracterização da resposta animal aos tratamentos aplicados

A análise da massa corporal dos animais, dos diferentes grupos experimentais no final do protocolo experimental e a sua comparação com as massas iniciais, evidenciou um ganho de massa estatisticamente inferior por parte dos animais do grupo DMBA+TPA comparativamente ao grupo controlo ($p < 0,05$; **Tabela 1**).

Tabela 1- Análise da variação da massa dos animais dos cinco grupos experimentais ao longo do protocolo, tendo por base as massas iniciais e finais. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão.

Grupo	Massa inicial (g)	Massa final (g)
DMBA	34,54 \pm 2,08	43,33 \pm 3,13
DMBA+IPL	35,44 \pm 1,76	41,90 \pm 2,71
DMBA+TPA	34,58 \pm 1,70	38,78 \pm 6,75*
IPL	34,31 \pm 3,00	41,18 \pm 2,75
Controlo	35,21 \pm 4,38	49,75 \pm 8,29

* $p < 0,05$ vs. Controlo

A nível sistémico observaram-se alterações significativas nos níveis séricos de albumina entre os grupos analisados, tendo-se registado uma diminuição significativa da concentração de albumina nos grupos DMBA+IPL ($p < 0,01$ vs. Controlo) e DMBA+TPA ($p < 0,01$ vs. Controlo) sugestiva de inflamação. De referir que os valores observados no grupo DMBA+TPA foram ainda estatisticamente inferiores ao grupo DMBA ($p < 0,001$ vs. DMBA+TPA), como se pode observar na **Tabela 2**. A mesma tendência foi observada para a concentração de proteína total no soro dos animais do grupo DMBA+IPL ($p < 0,001$ vs. Controlo) e DMBA+TPA ($p < 0,05$ vs. Controlo e $p < 0,01$ vs. DMBA).

Tabela 2 – Valores de parâmetros bioquímicos determinados no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão de concentração ou de atividade.

Grupo	Proteína Total (g/L)	Albumina (g/L)	Alanina aminotransferase (ALAT) (U/L)	Aspartato aminotransferase (ASAT) (U/L)
DMBA	54,57 \pm 0,90##	33,42 \pm 0,80###	39,68 \pm 4,11	169,50 \pm 40,63**###
DMBA+IPL	48,23 \pm 4,19***	29,33 \pm 2,40**	32,53 \pm 2,47##	180,60 \pm 66,23#
DMBA+TPA	49,82 \pm 2,69*	29,18 \pm 0,43**	47,12 \pm 14,22*	138,10 \pm 8,22
IPL	52,40 \pm 1,79	31,27 \pm 1,47#	42,40 \pm 3,63	150,60 \pm 45,81
Controlo	54,38 \pm 3,81	32,03 \pm 2,31	36,26 \pm 4,79	129,70 \pm 16,14

* $p < 0,05$ vs. Controlo; ** $p < 0,01$ vs. Controlo; *** $p < 0,001$ vs. Controlo; # $p < 0,05$ vs. DMBA+TPA; ## $p < 0,01$ vs. DMBA+TPA; ### $p < 0,001$ vs. DMBA+TPA

A atividade da alanina aminotransferase no soro dos animais do grupo DMBA foi superior ao observado no grupo controlo ($p < 0,01$ vs. Controlo). A aplicação de DMBA, DMBA combinado com IPL (grupo DMBA+IPL) e a irradiação somente com IPL, promoveu um aumento da atividade da ASAT comparativamente ao grupo DMBA+TPA, aumento esse significativo, para o primeiro e segundo grupo ($p < 0,001$ vs. DMBA+TPA e $p < 0,05$ vs. DMBA+TPA, respetivamente).

A análise dos níveis séricos de proteína C reativa (CRP) e de interleucina-6 (IL-6) foi efetuada por *Slot-Blot*. Os resultados obtidos evidenciaram um aumento significativo de CRP em todos os grupos experimentais comparativamente ao grupo controlo ($p < 0,001$ vs. Controlo), embora mais acentuado no grupo DMBA+TPA (**Figura 7A**). A mesma tendência foi observada para a IL-6, com valores significativamente mais elevados, induzidos pelos tratamentos ($p < 0,001$ vs. Controlo) sendo igualmente mais acentuado no grupo DMBA+TPA (**Figura 7B**). Em ambos os casos, verificou-se que os valores para o grupo DMBA+IPL são tendencialmente superiores aos valores observados no grupo DMBA enquanto os valores obtidos no grupo exposto apenas ao IPL, são tendencialmente inferiores aos valores obtidos pelo grupo DMBA.

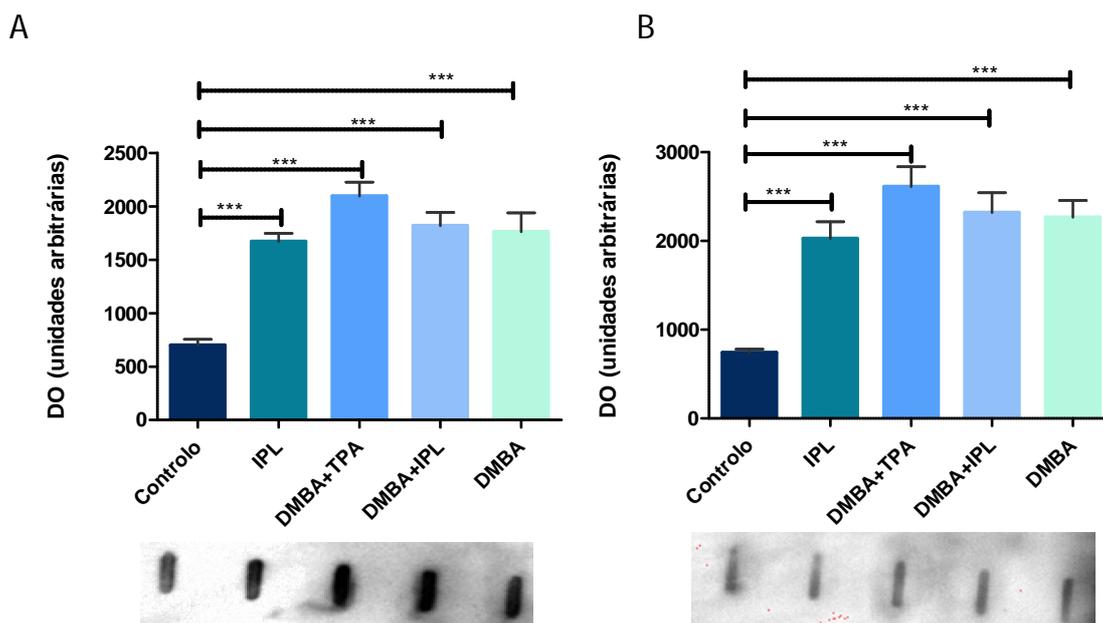


Figura 7- Variação dos níveis de Proteína C reativa (A) e de Interleucina-6 (B) nos diferentes grupos experimentais. Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas abaixo dos respectivos gráficos. Os valores da densidade ótica (DO) são expressos em unidades arbitrárias.

*** $p < 0,001$ vs. Controlo

2. Alterações morfológicas e bioquímicas nos extratos de pele

Ao longo do protocolo experimental verificaram-se nos animais do grupo DMBA+TPA alterações cutâneas, nomeadamente descamação nas regiões da pele submetida ao tratamento. No final do protocolo animal, a análise histológica confirmou a presença de lesões neoplásicas nos animais deste grupo. Três dos seis animais do grupo DMBA+TPA apresentaram carcinoma de células escamosas, associado à presença de infiltrado inflamatório (**Figura 8**). Já os animais do grupo DMBA apresentaram um infiltrado inflamatório pouco significativo e difuso, enquanto os animais do grupo DMBA+IPL evidenciaram infiltrado inflamatório na derme, embora menos significativo do que o observado no grupo DMBA+TPA, e hiperplasia focal na derme.

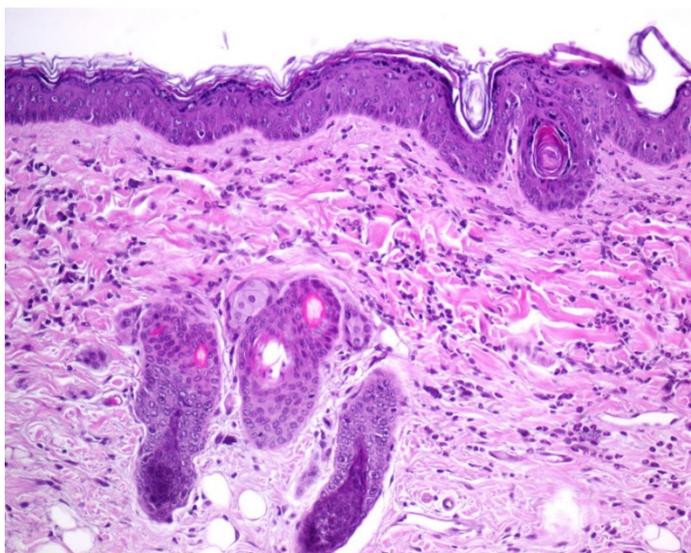


Figura 8- Imagem histológica de seção da pele de um animal tratado com DMBA e TPA evidenciando hiperplasia na epiderme e ainda a presença de infiltrado inflamatório misto (mononuclear e polimorfonuclear) ao nível da derme.

No sentido de avaliar potenciais alterações metabólicas da pele induzidas pelos tratamentos, avaliou-se a expressão da subunidade β da ATP sintase e da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) por *western blotting*. Os resultados obtidos, expressos em unidades arbitrárias, evidenciaram um aumento significativo dos níveis da subunidade β da ATP sintase (**Figura 9A**), em todos os grupos de animais tratados com DMBA, comparativamente ao grupo controlo ($p < 0,001$ DMBA+TPA vs. Controlo e DMBA+IPL vs. Controlo; $p < 0,01$ DMBA vs. Controlo). Em relação ao grupo IPL não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controlo. De referir ainda que os valores obtidos para o grupo DMBA+TPA são estatisticamente diferentes em relação a todos os grupos ($p < 0,001$).

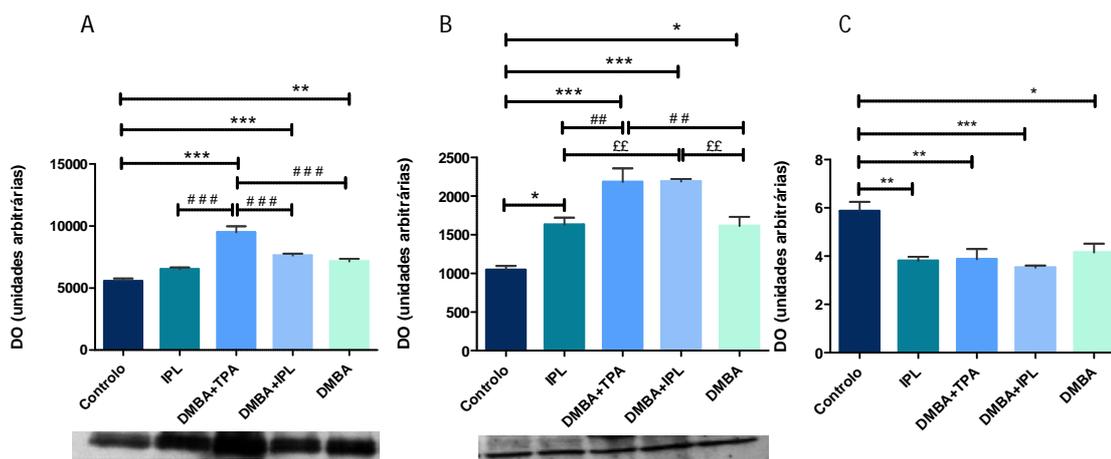


Figura 9- Variação da expressão da subunidade β da ATP sintase (A) e da GAPDH (B) avaliada por *western blotting* em todos os grupos experimentais. Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas abaixo dos respectivos gráficos. Em (C) é apresentado o rácio ATP sintase/ GAPDH. Os valores da densidade ótica são expressos em unidades arbitrárias.

* $p < 0,05$ vs. Controlo; ** $p < 0,01$ vs. Controlo; *** $p < 0,001$ vs. Controlo; ## $p < 0,01$ vs. DMBA+TPA; ### $p < 0,001$ vs. DMBA+TPA; ££ $p < 0,01$ vs. DMBA+IPL.

Relativamente à enzima glicolítica GAPDH (**Figura 9B**), verificou-se um aumento significativo dos seus níveis nos extratos de pele de todos os grupos experimentais quando comparados com o grupo controlo ($p < 0,05$ IPL vs. Controlo e DMBA vs. Controlo; $p < 0,001$ DMBA+TPA vs. Controlo e DMBA+IPL vs. Controlo). De constatar que os grupos DMBA+TPA e DMBA+IPL apresentaram valores semelhantes entre si e significativamente mais elevados comparativamente aos grupos IPL e DMBA ($p < 0,05$). A análise do coeficiente entre os níveis de subunidade β da ATP sintase e os de GAPDH sugere que o tratamento da pele com DMBA e/ou IPL promoveram um aumento significativo da atividade glicolítica da pele comparativamente ao grupo controlo (**Figura 9C**).

Com o intuito de avaliar a contribuição do stresse oxidativo para a adaptação da pele aos diferentes tratamentos, procedeu-se à quantificação do teor em proteínas oxidadas nos extratos de pele dos murganhos dos cinco grupos experimentais. A análise do teor de proteínas nitradas efetuada por *Slot-Blot* (**Figura 10A**) evidenciou um aumento significativo da nitração no grupo DMBA+TPA em relação aos restantes grupos experimentais ($p < 0,001$ todos os grupos vs. DMBA+TPA). O grupo DMBA+IPL apresentou níveis de proteínas nitradas significativamente mais elevados do que o grupo controlo ($p < 0,01$).

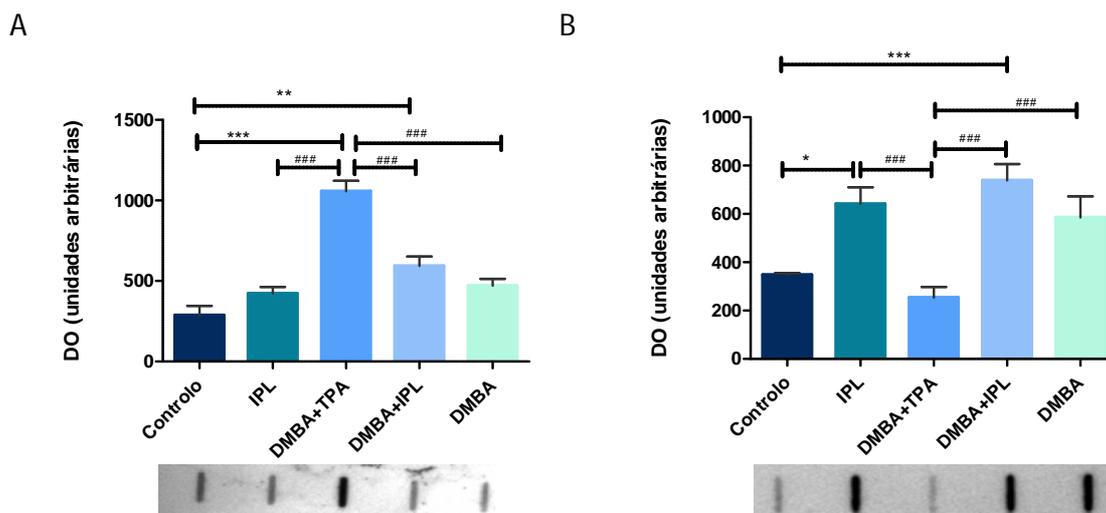
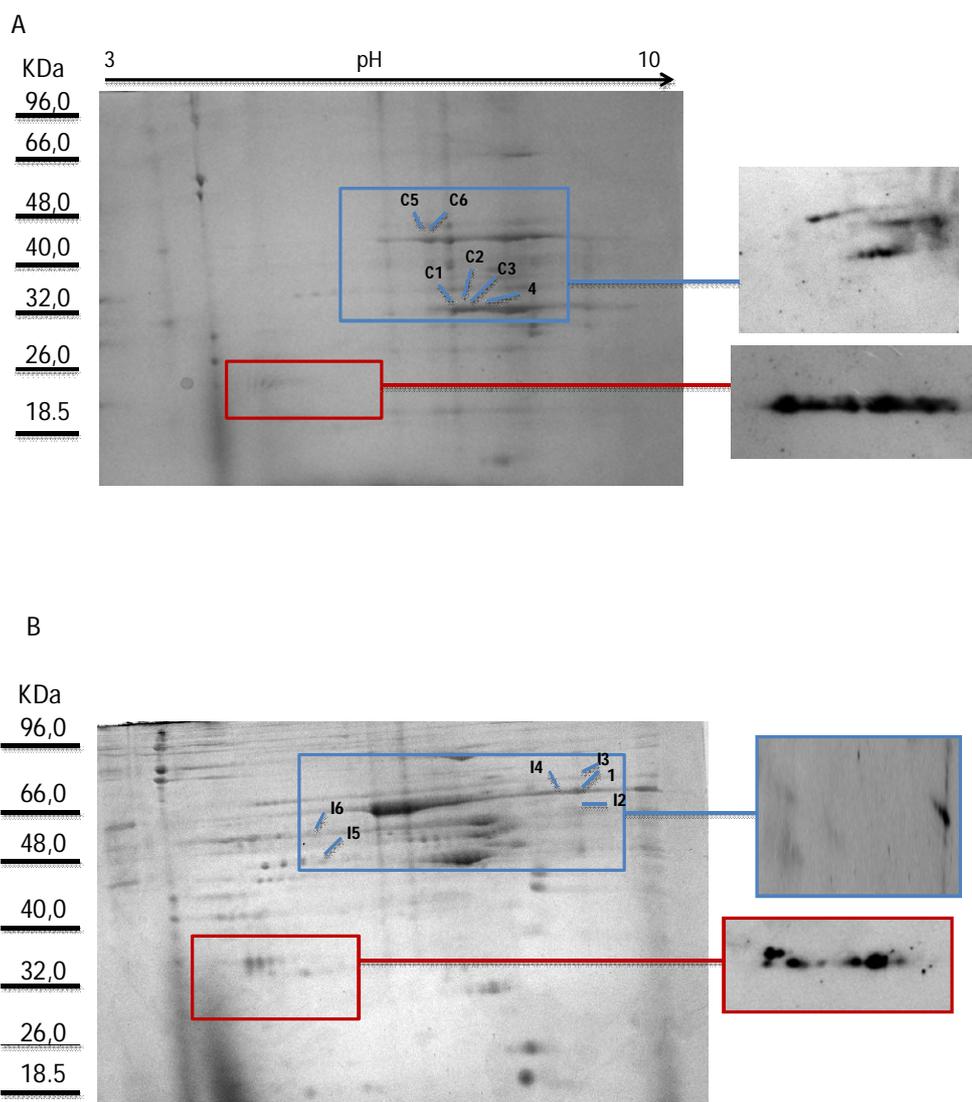


Figura 10- Variação do teor em proteínas nitradas (A) e carboniladas (B) avaliado por *Slot-Blot* em extratos de pele dos diferentes grupos experimentais. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos respectivos gráficos. Os valores de densidade ótica são expressos em unidades arbitrárias.

*($p < 0,05$) vs. Controlo; **($p < 0,01$) vs. Controlo; ***($p < 0,001$) vs. Controlo; ###($p < 0,001$) vs. DMBA+TPA.

Relativamente ao teor de proteínas carboniladas o perfil obtido foi diferente (**Figura 10B**). Verificou-se um aumento estatisticamente significativo dos níveis de proteínas carboniladas nos extratos de pele dos animais dos grupos IPL e DMBA+IPL, em relação ao grupo Controlo ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respetivamente), enquanto no grupo DMBA, o aumento verificado foi apenas tendencial. Por sua vez no grupo DMBA+TPA, observou-se uma diminuição significativa do teor em proteínas carboniladas, em relação a todos os grupos ($p < 0,001$), com exceção do grupo Controlo.

De modo a verificar se os diferentes tratamentos promoveram alterações do perfil de proteínas oxidadas, efetuou-se a separação das proteínas da pele por 2-DE e posterior deteção de proteínas carboniladas e nitradas. Como se pode constatar da análise da **Figura 11**, os diferentes tratamentos promoveram alterações do perfil proteico da pele. Contudo, verifica-se uma predominância de proteínas com pesos moleculares entre 40-70 kDa e *pI* entre 6-9, em todos os grupos experimentais com a exceção do grupo DMBA+TPA, onde mais *spots* foram observados na gama de peso molecular entre 30 e 40 kDa (**Figura 11**).



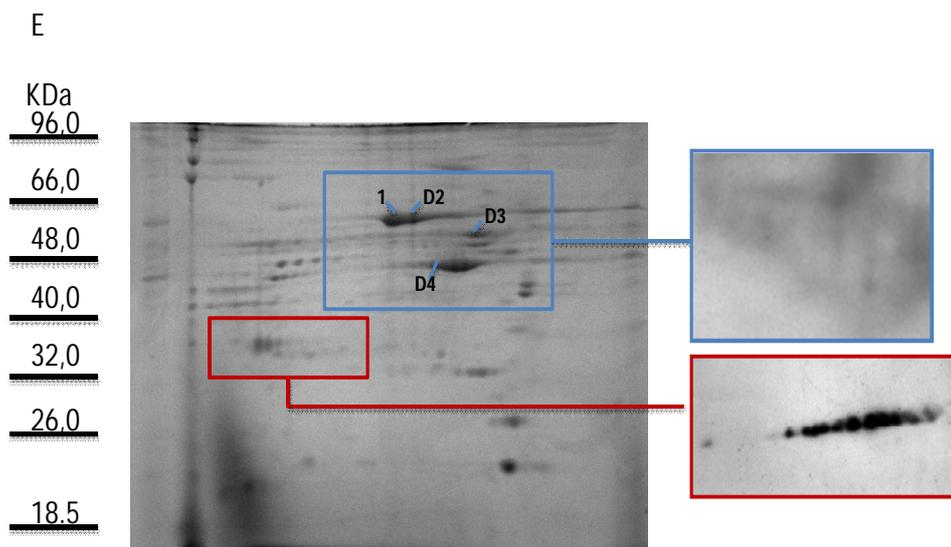
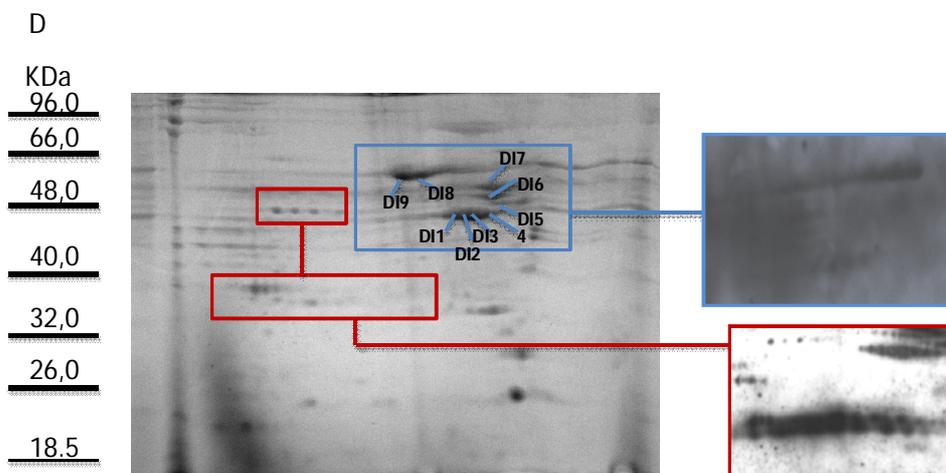
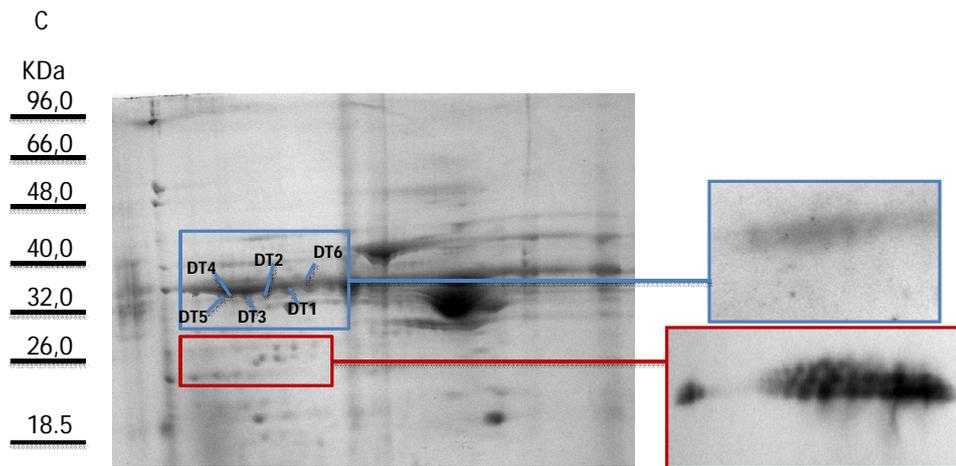


Figura 11- Imagens representativas do perfil 2-DE para cada grupo experimental e a comparação entre grupos dos western blots obtidos na detecção das proteínas carboniladas

assinhaladas nas caixas a azul) e nitradas (assinhaladas caixas a vermelho). A-controlo; B-IPL; C-DMBA+TPA; D-DMBA+IPL;E- DMBA.

Relativamente ao perfil de proteínas oxidadas, verificou-se que os tratamentos estudados não só promoveram alterações quantitativas (**Figura 10**), mas também qualitativas (**Figura 11**). No grupo Controlo, as proteínas que apresentaram reatividade para o anticorpo anti-DNP encontravam-se na zona correspondente aos pesos moleculares 32-48 kDa e *pI* 5-8. Na pele dos animais do grupo IPL, as proteínas carboniladas apresentavam peso moleculares superiores em relação ao grupo controlo (40-70 kDa). Os perfis dos grupos DMBA e DMBA+IPL foram semelhantes. Nos extratos de pele dos animais do grupo DMBA+IPL observou-se um maior número de *spots* de proteínas reativas ao anti-DNP, em relação ao detetado no grupo DMBA.

O perfil de proteínas nitradas diferiu do perfil de proteínas carboniladas. De um modo geral, os *spots* correspondentes às proteínas nitradas localizam-se na gama de *pI* 4-6 e peso molecular mais baixo, isto é, 30-40 kDa.

Os *spots* correspondentes às proteínas oxidadas (nitradas e carboniladas) foram excisados dos diferentes geis 2-DE, para posterior análise por MS/MS. As proteínas identificadas nos *spots* do gel 2-DE encontram-se apresentadas na **Tabela 3**. Devido a problemas técnicos, apenas se identificaram as proteínas reativas ao anticorpo anti-DNP. As proteínas identificadas como mais suscetíveis à carbonilação foram 4 isoformas diferentes de queratina, a α -actina, a actina citoplasmática 1 e a β -actina do tipo 2. Estas proteínas fazem parte dos filamentos intermédios e dos microfilamentos do citoesqueleto. Em relação às isoformas de queratina, foram identificadas isoformas do citoesqueleto, do tipo I (isoforma 10 e 17) e do tipo II (isoformas 6A e 6B). Estes tipos de queratina são frequentemente designados por citoqueratinas. As queratinas do tipo I (10 e 17) foram identificadas como carboniladas no grupo experimental DMBA+IPL, enquanto as queratinas do tipo II (6A e 6B), foram identificadas como carboniladas no grupo DMBA+TPA. Relativamente às isoformas de actina, no grupo controlo foram identificadas a α -actina e a β -actina do tipo 2, enquanto no grupo DMBA+IPL foram identificadas a α -actina e β -actina. Nos restantes grupos não foram identificadas isoformas de actina em *spots* de proteínas carboniladas.

Tabela 3- Lista de proteínas identificadas por MS/MS nos *spots* reativos ao anti- DNP ($p < 0,05$).

Spot	Nome da Proteína	Número de acesso Uniprot	Código de Acesso	Peso Molecular (Da)	<i>pI</i>	Número de Péptidos	Score
C4	α -actina	P68134	ACTS_MOUSE	42024	5,23	6	127
D11						8	98
D12						13	208
D13						9	216
D14	actina citoplasmática 1	P60710	ACTB_MOUSE	41710	5,29	3	107
C3	β -actina do tipo 2	Q8BFZ3	ACTBL_MOUSE	41977	5,30	1	48
DT5	queratina tipo II isoforma 6B	Q9Z331	K2C6B_MOUSE	60285	8,51	11	209
DT2	queratina tipo II isoforma 6A	P50446	K2C6A_MOUSE	59299	8,04	10	101
DT3						11	144
DT6						4	62
D15	queratina tipo I isoforma 17	Q9QWL7	K1C17_MOUSE	60285	5,00	19	164
D17	queratina tipo isoforma 10	P02535	K1C10_MOUSE	57735	5,04	13	133
I1	albumina sérica	P07724	ALBU_MOUSE	68648	5,75	7	120
I4						10	128
I5						7	97
D19						8	160
D1						10	109
D2						13	139

C-Controlo; I-IPL ; DT-DMBA+TPA; DI-DMBA+IPL; D-DMBA

Considerando as proteínas identificadas como mais suscetíveis à carbonilação, procedeu-se a uma análise das potenciais interações proteína-proteína utilizando a ferramenta bioinformática String 9.1. A análise das interações proteína-proteína com as isoformas de actina identificadas por MS/MS (**Figura 12**) evidenciou a interação com diferentes isoformas de miosina (My11 e as Myo1f e Myo18b) e com proteínas reguladoras, tais como diferentes isoformas de profilina (Pfn), a troponina C (Tnnc2) e ainda a Proteína Cinase C (Prkce). Não se verificou interação entre a β -actina do tipo 2 (Actb12) e outras proteínas. As isoformas de miosina constituem, juntamente com as isoformas de actina, os microfilamentos, às quais se associa a troponina C. As isoformas de profilina estão envolvidas na regulação da polimerização dos filamentos de actina, motilidade, proliferação e tráfego membranar. De um modo geral, a carbonilação das isoformas de actina na pele sugere potencial comprometimento do funcionamento celular pela perturbação do citoesqueleto o que afeta interações entre organelos, o transporte de vesículas e a comunicação intra e extracelular.

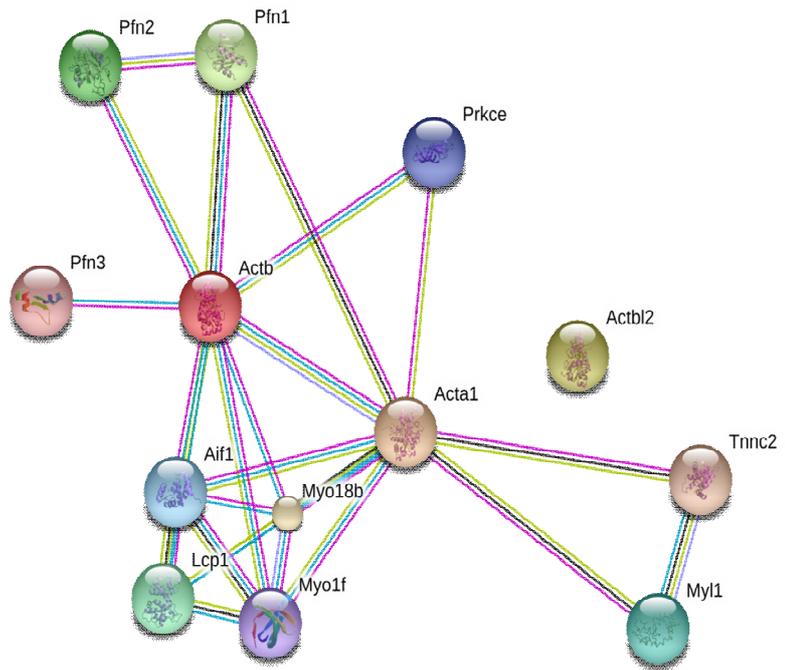


Figura 12- Análise das interações proteína-proteína com as isoformas de actina identificadas por MS/MS nos *spots* reativos ao anti-DNP, efetuada com a ferramenta bioinformática String 9.1.

A análise das interações proteína-proteína envolvendo as isoformas de queratina identificadas evidenciou para além de outras isoformas de queratina a caspase-14 (Casp14) e a *stratifin* (Sfn) (**Figura 13**). A Casp14 é uma proteína não-apoptótica que atua na diferenciação dos queratinócitos. Esta caspase parece estar ativa na pele em condições normais (107). A *stratifin* está envolvida em diversas vias de sinalização e está associada à síntese de proteínas e crescimento celular epitelial (108).

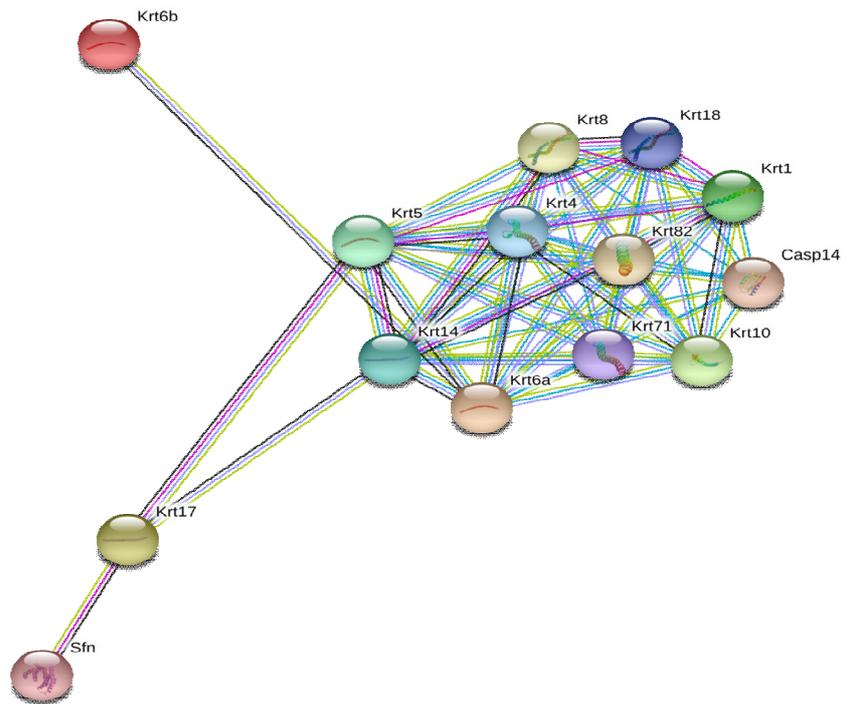


Figura 13- Análise das interações proteína-proteína com as isoformas de queratina identificadas por MS/MS nos *spots* reativos ao anti-DNP, efetuada com a ferramenta bioinformática String 9.1.

A maior suscetibilidade das isoformas de queratina à oxidação sugere um potencial comprometimento da viabilidade celular, pois algumas das suas isoformas estão intimamente ligadas a processos apoptóticos.

V. Discussão

V. Discussão

A IPL é uma tecnologia que foi descrita pela primeira vez em 1985 e consiste na utilização de uma luz não laser de elevada intensidade (515-1200 nm). As suas principais aplicações passam pelo campo da dermatologia e da estética, como no tratamento de pigmentação irregular, lesões vasculares, na remoção de pelos e no fotorejuvenescimento (14,17,18,109). Neste contexto, foram desenvolvidos aparelhos de IPL que podem ser usados a nível doméstico sem necessidade de uma formação prévia para a sua utilização. Este facto tem despertado a atenção da comunidade científica para as possíveis consequências do uso prolongado e por vezes abusivo deste tipo de radiação. Até ao momento, são poucos os estudos que evidenciam que a IPL por si só apresenta potencial lesivo e baseiam-se essencialmente na avaliação dos efeitos da IPL na expressão de proteínas associadas ao fotorejuvenescimento (20,24,25,29).

No sentido de melhor compreender os mecanismos subjacentes ao uso de IPL, no presente estudo utilizou-se um modelo animal de carcinogénese por indução química com DMBA e TPA de lesões pré-neoplásicas (110,111). O DMBA é um agente indutor que em baixas concentrações promove a ativação oncogénica da *H-ras* em células epiteliais da pele. A aplicação repetida de agente promotor TPA promove o desenvolvimento de lesões papilomatosas, que podem progredir para carcinoma das células escamosas (42,110,112). Estudos revelam que a aplicação de TPA promove a inflamação por indução da ciclooxigenase-2 (COX-2), com consequente aumento da produção de ROS e oxidação de biomoléculas (111,113). A análise histológica de seções de pele comprovou a eficácia da aplicação de DMBA e TPA na indução de lesões neoplásicas nos animais do grupo DMBA+TPA, uma vez que cinco dos seis animais deste grupo apresentavam papilomas e três dos seis animais deste mesmo grupo apresentaram carcinoma de células escamosas, associado à presença de infiltrado inflamatório (**Figura 8**). Os papilomas correspondem a lesões proliferativas benignas, que podem sofrer transformação maligna para carcinoma das células escamosas, que é considerado como o mais agressivo e letal cancro de pele do tipo não melanoma (114). Por seu lado, os animais do grupo DMBA apresentaram infiltrado inflamatório pouco significativo e difuso, enquanto os animais do grupo DMBA+IPL evidenciaram

infiltrado inflamatório pouco significativo mas acompanhado de hiperplasia focal na derme, à semelhança do descrito anteriormente (111). A fase de promoção tumoral, induzida pelo TPA, está diretamente associada à inflamação. Efetivamente, nos animais do grupo DMBA+TPA observou-se um infiltrado inflamatório misto (presença de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares) na derme (**Figura 8**). Estes resultados foram ainda corroborados pela análise bioquímica do soro. Apesar de se ter observado um aumento dos níveis séricos de IL-6 e de CRP em todos os grupos experimentais, foi no grupo DMBA+TPA que se registaram diferenças mais significativas (**Figura 7**). Mais ainda, os animais deste grupo apresentaram o maior decréscimo dos níveis séricos de albumina (tabela II), o que suporta o perfil inflamatório associado ao tratamento com DMBA e TPA. A IL-6 é uma citocina secretada por células inflamatórias do hospedeiro em resposta ao tumor, sendo sugerido que os seus níveis se correlacionam com a malignidade do carcinoma das células escamosas (115,116). As citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 têm a capacidade de desencadear a síntese hepática de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (116,117). Níveis plasmáticos elevados de CRP foram já associados ao risco de vários tipos de cancro, incluindo o cancro de pele do tipo não melanoma (118). Este perfil inflamatório pode justificar o menor peso corporal observado nos animais do grupo DMBA+TPA (**Tabela 1**), uma vez que, as citocinas pró-inflamatórias podem induzir a diminuição dos aminoácidos de reserva e, conseqüentemente, a perda de massa muscular. Kaur e colaboradores (119), quando sujeitaram murganhos ICR a um processo de carcinogénese química com DMBA e TPA durante 24 semanas verificaram pesos finais inferiores aos do grupo Controlo. Estes autores associaram o menor ganho de peso dos animais à inflamação e aos níveis de ROS. A exposição da pele à IPL promoveu por si só o aumento dos níveis de IL-6 e de CRP bem como a diminuição dos níveis séricos de albumina, o que sugere que esta estratégia utilizada na estética promove inflamação, embora menos acentuada. Alguns estudos têm referido que a irradiação da pele humana, com IPL, provoca o aparecimento de sinais como o eritema, o edema e ainda a hiperpigmentação pós-inflamatória que podem ser associados a inflamação (13,26). Os níveis elevados de atividade das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase no soro dos animais do grupo DMBA+TPA e DMBA (**Tabela 2**) podem estar associados à metabolização hepática do DMBA (113).

Ao nível da pele, verificou-se que os diferentes tratamentos promoveram alterações no metabolismo energético, atendendo à expressão da subunidade β da ATP sintase e da GAPDH, marcadores do metabolismo oxidativo e glicolítico, respetivamente. Nas células tumorais há geralmente uma prevalência da via glicolítica sobre a via fosforilativa, que se caracteriza por níveis elevados de GAPDH (120), enquanto a expressão da subunidade β da ATP sintase se encontra reduzida (121). No presente trabalho verificámos que ambas as enzimas se encontravam sobre-expressas na pele dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. No entanto, o rácio ATP sintase/GAPDH diminuiu, o que corrobora a prevalência do metabolismo glicolítico.

A presença de infiltrado de células inflamatórias na pele tem sido associada a níveis elevados de ROS (113,122), que ao reagirem com as diferentes biomoléculas, nomeadamente com as proteínas, promovem lesões oxidativas, como a carbonilação e a nitração. Estas modificações promovem muitas vezes a perda de função, a fragmentação, o *unfolding/misfolding* ou a agregação de proteínas (95). A oxidação induzida por ROS de alguns resíduos de aminoácidos das proteínas ou da ligação peptídica pode levar à formação de grupos carbonilo (CO), sendo um fenómeno comum em condições de stresse oxidativo (81,82). De entre os ROS, o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pode ainda reagir com o óxido nítrico com formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), que apresenta elevada reatividade com as proteínas, resultando na formação de 3-nitrotirosina (123). Vários processos inflamatórios estão associados ao aumento de óxido nítrico pela atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), expressa em resposta a citocinas pró-inflamatórias (124). O peroxinitrito pode reagir com os resíduos de tirosina das proteínas formando-se 3-nitrotirosina, uma modificação pós-traducional das proteínas geralmente associada a perda de função das mesmas. O aumento dos níveis de 3-nitrotirosina já foi descrito em várias doenças, como o cancro (125).

No nosso estudo, verificou-se que os perfis de nitração e de carbonilação foram distintos, nos diferentes grupos experimentais. De uma forma geral, os níveis de proteínas nitradas aumentaram em todos os grupos experimentais, em relação ao grupo controlo, sendo este aumento mais evidente no grupo DMBA+TPA. Contudo, em relação às proteínas carboniladas, verificou-se um aumento dos seus níveis, em todos os grupos experimentais, em relação ao controlo, exceto no grupo DMBA+TPA, onde curiosamente, se verificou uma diminuição dos níveis de proteínas carboniladas. A

análise comparativa dos níveis de proteínas nitradas com o teor de proteínas carboniladas juntamente com o aumento dos marcadores inflamatórios sugere que na pele dos animais do grupo DMBA+TPA a resposta inflamatória envolvendo infiltração de macrófagos promoveu o aumento de NO, por ação de óxido nítrico sintase (126), que ao reagir com o anião superóxido para formação de peroxinitrito favoreceu a nitração em detrimento da carbonilação das proteínas da pele. Entre as proteínas mais suscetíveis à carbonilação, identificaram-se diferentes isoformas de queratina, as proteínas mais abundantes da camada córnea. Thiele *et al.*(127) também identificaram diferentes isoformas de queratina, como as proteínas mais suscetíveis a esta modificação oxidativa quando expuseram a pele a agentes oxidantes (UVA, benzoil-hidroperóxido e o hipoclorito). No entanto, os diferentes tratamentos em estudo no presente trabalho pareceram afetar de forma distinta a suscetibilidade das isoformas de queratina à oxidação e, conseqüentemente, à apoptose, o principal processo biológico em que intervêm, de acordo com a ferramenta bioinformática String. Esta ferramenta indicou-nos ainda que existe uma interação entre as diferentes queratinas identificadas e stratifina e a caspase14. A stratifina é uma proteína que interage com isoformas de queratina sendo que quando interage com a queratina-17 regula a síntese de proteínas e o crescimento epitelial por estimulação da via Akt/mTOR. Esta via é responsável por regular diversas funções celulares, tais como, a síntese proteica, a transcrição de genes e ainda a proliferação celular (56). A atividade desta proteína tem sido relacionada com o cancro do tipo melanoma e não melanoma (59,128). A Casp14 é outra das proteínas que interatua com isoformas de queratina. Esta caspase é principalmente expressa em tecidos epiteliais, especialmente nos queratinócitos, durante a diferenciação da epiderme. A expressão da Casp14 é necessária para manter a homeostase da epiderme (107). As células tumorais não têm capacidade para expressar a Casp14 (129). Esta caspase interage com a queratina tipo I (10) e com a queratina tipo II (6A), que foram identificadas como alvo de carbonilação nos grupos DMBA+IPL e DMBA+TPA, respetivamente, podendo justificar, pelo menos em parte, as alterações morfológicas observadas na pele dos animais destes grupos experimentais. Os filamentos de actina também são particularmente suscetíveis a modificações oxidativas, com possíveis conseqüências funcionais. Quando a oxidação é moderada, esta tem um efeito limitado sobre a capacidade de polimerização destes filamentos, caso contrário formam-se agregados de actina carboniladas, que se não forem degradados pelo proteossoma

tornam-se tóxicos para a célula (130,131). No nosso estudo, verificou-se que os diferentes tratamentos alteraram o estado redox deste grupo de proteínas com maior suscetibilidade da α -actina e a β -actina do tipo 2 à carbonilação observada nos grupos Controlo e DMBA+IPL. A modificação oxidativa destas proteínas pode comprometer as interações proteína-proteína fundamentais para a manutenção da organização do citoesqueleto. Entre as proteínas que interagem com as isoformas de actina identificadas encontra-se a PKC ξ , homóloga à PKC ξ humana e que é expressa na epiderme. Esta isoforma participa na regulação de diversas funções celulares, incluindo na expressão de genes, transformação neoplásica, adesão celular e a motilidade celular. A PKC ξ tem sido sugerida como um importante mediador da carcinogénese da pele, e a sua elevada expressão foi observada na epiderme de murganhos com carcinoma das células escamosas induzido pelo agente promotor TPA ou radiação ultravioleta (132).

VI. *Conclusão*

VI. Conclusão

Com o objetivo de avaliar o efeito da IPL na suscetibilidade do proteoma da pele normal e da pele com lesões cutâneas pré-neoplásicas à lesão oxidativa, utilizou-se um modelo animal de carcinogênese, e os resultados obtidos da análise de parâmetros sistêmicos e da pele permitiram chegar às seguintes conclusões:

- i. O tratamento com IPL promoveu o aumento sérico de proteína C-reativa e de IL-6, sugerindo a ocorrência de inflamação. Esta resposta inflamatória foi mais acentuada nos animais expostos ao DMBA.
- ii. Ao nível da pele a IPL promoveu alteração do metabolismo tornando-o mais glicolítico.
- iii. O tratamento com IPL promoveu o aumento do teor de proteínas carboniladas na pele. Nos animais tratados com DMBA e IPL verificou-se também um aumento do teor de proteínas nitradas.
- iv. A análise das proteínas presentes nos *spots* do gel 2-DE reativos ao anticorpo anti-DNP por MS/MS permitiu identificar isoformas de queratina e de actina como as proteínas da pele mais suscetíveis à oxidação. Os tratamentos em estudo parecem promover uma remodelação do citoesqueleto da pele e alterar a suscetibilidade das células epiteliais à apoptose.

Em suma, os resultados sugerem que a aplicação de IPL promove inflamação, alteração do metabolismo da pele e aumento da suscetibilidade das proteínas à oxidação embora sem manifestações histológicas significativas. A exposição da pele tratada com DMBA à IPL exacerba as alterações sistêmicas e bioquímicas da pele. Estudos futuros serão importantes para melhor compreender o impacto a longo prazo das alterações bioquímicas observadas na pele e das vias de sinalização envolvidas.

VII. Bibliografia

VII. Bibliografia

1. WHO. Skin cancers [Internet]. World Health Organization. 2013. Available from: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/print.html>
2. Ahmed AH, Soyer HP, Saunders N, Boukamp P, Roberts MS. Non-melanoma skin cancers. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2008;5(1):e55–e62.
3. Gordon R. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. *Seminars in Oncology Nursing*. 2013;29(3):160–9.
4. Lauth M, Uden AB, Toftgård R. Non-melanoma skin cancer: pathogenesis and mechanisms. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2004;1(2):267–72.
5. Milon A, Vuilleumier L, Danuser B, Vernez D. Estimating the contribution of occupational solar UV exposure to skin cancer. *British Journal of Dermatology*. 2013;170(1):157-64
6. Bishop J, Chang Y, Elliott F, Chan M, Leake S, Barrett J. Relationship between sun exposure and melanoma risk for tumours in different body sites in a large case-control study in a temperate climate. *European Journal of Cancer*. 2011;47(5):732–41.
7. WHO. All sites but non-melanoma skin [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://eco.iarc.fr/eucan/Cancer.aspx?Cancer=0>
8. WHO. Malignant melanoma of skin [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://eco.iarc.fr/eucan/Cancer.aspx?Cancer=20>
9. Weir HK, Marrett LD, Cokkinides V, Sloan JB, Ekwueme DU. Melanoma in adolescents and young adults (ages 15-39 years): United States, 1999-2006. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;65(5):S38–e13.

10. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Hamblin MR. Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. *Cutaneous Medicine and Surgery*. 2013;32:41–52.
11. Borek C. Antioxidants and Radiation Therapy. *American Society for Nutritional Science*. 2004;134:3207–9.
12. Cognetta AB, Howard BM, Heaton HP, Stoddard ER, Hong HG, Green WH. Superficial x-ray in the treatment of basal and squamous cell carcinomas: a viable option in select patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012;67(6):1235–41.
13. Stangl S, Hadshiew I, Kimmig W. Side effects and complications using intense pulsed light (IPL) sources. *Medical Laser Application*. 2008;23(1):15–20.
14. Babilas P, Schreml S, Szeimies R-M, Landthaler M. Intense pulsed light (IPL): a review. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2010;42(2):93–104.
15. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery*. 2011;29(10):471–4.
16. Mikesh LM, Aramadhaka LR, Moskaluk C, Zigrino P, Mauch C, Fox JW. Proteomic anatomy of human skin. *Journal of Proteomics*. 2013;84:190–200.
17. Goldberg DJ. Current trends in intense pulsed light. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2012;5(6):45–53.
18. Raulin C, Greve B, Grema H. IPL technology: a review. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2003;32(2):78–87.
19. Town G, Ash C. Are home-use intense pulsed light (IPL) devices safe? *Lasers in Medical Science*. 2010;25(6):773–80.
20. Luo D, Cao Y, Wu D, Xu Y, Chen B, Xue Z. Impact of intense pulse light irradiation on BALB/c mouse skin-in vivo study on collagens, matrix

- metalloproteinases and vascular endothelial growth factor. *Lasers in Medical Science*. 2009;24(1):101–8.
21. Chan HHL, Yang CH, Leung JCK, Wei WI, Lai KN. An animal study of the effects on p16 and PCNA expression of repeated treatment with high-energy laser and intense pulsed light exposure. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2007;39(1):8–13.
 22. Iyer S, Carranza D, Kolodney M, Macgregor D, Chipps L, Soriano T. Evaluation of procollagen I deposition after intense pulsed light treatments at varying parameters in a porcine model. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2007;9(2):75–8.
 23. Wong W-R, Shyu W-L, Tsai J-W, Hsu K-H, Lee H-Y, Pang J-HS. Intense pulsed light modulates the expressions of MMP-2, MMP-14 and TIMP-2 in skin dermal fibroblasts cultured within contracted collagen lattices. *Journal of Dermatological Science*. 2008;51(1):70–3.
 24. Huang J, Luo X, Lu J, Chen J, Zuo C, Bi Z. IPL irradiation rejuvenates skin collagen via the bidirectional regulation of MMP-1 and TGF- β 1 mediated by MAPKs in fibroblasts. *Lasers in Medical Science*. 2011;26(3):381–7.
 25. Wong W-R, Shyu W-L, Tsai J-W, Hsu K-H, Pang J-HS. Intense pulsed light effects on the expression of extracellular matrix proteins and transforming growth factor beta-1 in skin dermal fibroblasts cultured within contracted collagen lattices. *American Society for Dermatologic Surgery*. 2009;35(5):816–25.
 26. Arias GAM, Branco CC, Ferrando J. Side-effects after IPL photodepilation. *American Society for Dermatologic Surgery*. 2002;28(12):1131–4.
 27. Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011;68(23):3853–68.

28. Nagase H. Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(31):21491–4.
29. Cho EB, Park H, Kim KJ, Park HR. Effect of intense pulsed light on rat skin. *Dermatologic Surgery*. 2012;38(3):430–6.
30. Ali MM, Porter RM, Gonzalez ML. Intense pulsed light enhances transforming growth factor beta1 / Smad3 signaling in acne-prone skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2013;195–203.
31. Xu D, Yuan R, He L. The effect of ultraviolet radiation on the transforming growth factor beta 1/Smads pathway and p53 in actinic keratosis and normal skin. *Archives of Dermatological Research*. 2013;305(9):777–86.
32. Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*. 2006;25(3):435–57.
33. Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smard pathway in human skin in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2002;119(2):499–506.
34. Conscience I, Jovenin N, Coissard C, Lorenzato M, Durlach A, Grange F, et al. P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas. *European Journal of Dermatology*. 2006;16(5):518–22.
35. Pavey S, Conroy S, Russell T, Gabrielli B. Ultraviolet Radiation Induces p16 CDKN2A Expression in Human Skin. *Cancer Research*. 1999;59:4185–9.
36. Ahmed NU, Ueda M, Ichihashi M. Induced expression of p16 and p21 proteins in UVB-irradiated human epidermis and cultured keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*. 1999;19(3):175–81.
37. Hedelund L, Lerche C, Wulf HC, Haedersdal M. Carcinogenesis related to intense pulsed light and UV exposure: an experimental animal study. *Lasers in Medical Science*. 2006;21(4):198–201.

38. Thieu K, Ruiz ME, Owens DM. Cells of origin and tumor-initiating cells for nonmelanoma skin cancers. *Cancer Letters*. 2013;338(1):82–8.
39. Ming M, Han W, Maddox J, Soltani K, Shea CR, Freeman DM, et al. UVB induced ERK/AKT- dependent PTEN suppression promotes survival of epidermal keratinocytes. *Oncogene*. 2010;29(4):492–502.
40. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*. 2012;24(5):981–90.
41. Narendhirakannan RT, Hannah MAC. Oxidative Stress and Skin Cancer: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2012;28(2):110–5.
42. Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126:2565–75.
43. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive Oxygen Species, Cell Signaling, and Cell Injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000;28(10):1449–50.
44. Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
45. Yajima I, Kumasaka MY, Yamanoshita O, Iida M, Ohgami N, Tamura H, et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatology Research and Practice*. 2012;2012:1–5.
46. Cheng Y, Zhang G, Li G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Reviews*. 2013;32(3-4):567–84.
47. Meier F, Schittek B, Satyamoorthy K, Li G, Herlyn M. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for effective treatment of advanced melanoma. *Frontiers in Bioscience*. 2005;10:2986–3001.

48. Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Current Opinion in Oncology*. 2008;20(2):183–9.
49. Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(12):1606–20.
50. Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annual Review of Pathology*. 2009;4:551–79.
51. Sullivan RJ, Flaherty K. MAP kinase signaling and inhibition in melanoma. *Oncogene*. 2013;32(19):2373–9.
52. Mao J, To MD, Perez-losada J, Wu D, Rosario R Del, Balmain A. Mutually exclusive mutations of the Pten and ras pathways in skin tumor progression. *Genes & Development*. 2004;18:1800–5.
53. Ise K, Nakamura K, Nakao K, Shimizu S, Harada H, Ichise T, et al. Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*. 2000;16:2951–6.
54. Butts BD, Kwei KA, Bowden GT, Briehl MM. Elevated basal reactive oxygen species and phospho-Akt in murine keratinocytes resistant to ultraviolet B-induced apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*. 2003;37:149–57.
55. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Research*. 2006;66(13):6546–52.
56. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Hall MN. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*. 2002;10(3):457–68.
57. Davies MA, Hale KS, Prieto VG, Lazar a JF, Gershenwald JE, Mills GB. A novel Akt3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *British Journal of Cancer*. 2008;99(8):1265–8.

58. Segrelles C, Ruiz S, Perez P, Larcher F, Slaga TJ, Gutkind JS, et al. Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene*. 2002;21:53–64.
59. Karbowniczek M, Spittle CS, Morrison T, Wu H, Henske EP. mTOR is activated in the majority of malignant melanomas. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128:980–7.
60. Pópulo H, Soares P, Faustino A, Rocha a S, Silva P, Azevedo F, et al. mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics. *Pigment cell & melanoma research*. 2011;24(1):254–7.
61. Ming M, He Y-Y. PTEN: New Insights into Its Regulation and Function in Skin Cancer. *Journal of Investigativ Dermatololy*. 2009;129(9):2109–12.
62. Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, Tsao H. Melanoma: new insights and new therapies. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132:854–63.
63. Nys K, Agostinis P. Bcl-2 family members: essential players in skin cancer. *Cancer Letters*. 2012;320(1):1–13.
64. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 2003;22(20):3138–51.
65. Sitailo LA, Morais AJ, Denning MF. Mcl-1 functions as major epidermal survival protein required for proper keratinocyte differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(6):1351–60.
66. Giannetti L, Consolo U, Magnoni C, Muzio LL. Apoptosis: escaping strategies in human skin cancer. *Oncology Reports*. 2004;11(2):401–5.
67. Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Reviews*. 2010;29:351–78.
68. Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Research*. 2008;68(6):1777–85.

69. Campos ACE, Molognoni F, Melo FHM, Galdieri LC, Carneiro CRW, D'Almeida V, et al. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia*. 2007;9(12):1111–21.
70. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico Biological Interactions*. 2006;160:1–40.
71. Kunisada M, Yogianti F, Sakumi K, Ono R, Nakabeppu Y, Nishigori C. Increased expression of versican in the inflammatory response to UVB- and reactive oxygen species-induced skin tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*. 2011;179(6):3056–65.
72. Li C, Xu J, Li F, Chaudhary SC, Weng Z, Wen J, et al. Unfolded Protein Response Signaling and MAP Kinase Pathways Underlie Pathogenesis of Arsenic-induced Cutaneous Inflammation. *Cancer Prevention Research*. 2012;4(12):2101–9.
73. Liebel F, Kaur S, Ruvolo E, Kollias N, Southall MD. Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132:1901–7.
74. Ayala F, Palla M, Di Trollo R, Mozzillo N, Ascierio P a. The role of optical radiations in skin cancer. *ISRN dermatology*. 2013;2013:1–8.
75. Tuohimaa P, Pukkala E, Scélo G, Olsen JH, Brewster DH, Hemminki K, et al. Does solar exposure, as indicated by the non-melanoma skin cancers, protect from solid cancers: vitamin D as a possible explanation. *European Journal of Cancer*. 2007;43(11):1701–12.
76. Muthusamy V, Piva TJ. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNF- α signal transduction pathways. *Archives of Dermatological Research*. 2010;302:5–17.

77. Butterfield DA, Gu L, Domenico F Di. Mass Spectrometry and redox proteomics: Mass Spectrometry Reviews. 2013;9999:1–25.
78. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. Annals of the New York Academy of Sciences. 2000;899:191–208.
79. Møller IM, Rogowska-Wrzesinska A, Rao RSP. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. Journal of proteomics. 2011;74(11):2228–42.
80. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metabolism Reviews. 2000;32(3-4):307–26.
81. Berlett BS, Stadtman ER. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. Journal of Biological Chemistry. 1997;272(33):20313–6.
82. Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update on analytical strategies. Mass Spectrometry Reviews. 2013;1–19.
83. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids. 2003;25(3-4):207–18.
84. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. Trends in Molecular Medicine. 2003;9(4):169–76.
85. D'Alessandro A, Rinalducci S, Zolla L. Redox proteomics and drug development. Journal of Proteomics. 2011;74:2575–95.
86. Moyers GK, McDonald WH. Developments in mass spectrometry for the analysis of complex protein mixtures. Briefings in Functional Genomics & Proteomics. 2006;5(2):98–111.

87. Cañas B, Ferrer DL, Fernández AR, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*. 2006;4(4):295–320.
88. America AHP, Cordewener JHG. Comparative LC-MS: A landscape of peaks and valleys. *Proteomics*. 2008;8:731–49.
89. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: Lester Packer ANGBT-M in E, editor. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants*. 1990. p. 464–78.
90. Huang C-M, Xu H, Wang CC, Elmets CA. Proteomic characterization of skin and epidermis in response to environmental agents. *Expert Review of Proteomics*. 2005;2(5):809–20.
91. Filipe P, Morlière P, Silva JN, Mazière J-C, Patterson LK, Freitas JP, et al. Plasma lipoproteins as mediators of the oxidative stress induced by UV light in human skin: a review of biochemical and biophysical studies on mechanisms of apolipoprotein alteration, lipid peroxidation, and associated skin cell responses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;2013:285825.
92. Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research*. 2005;571:153–73.
93. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;305(3):761–70.
94. Chen B, Retzlaff M, Roos T, Frydman J. Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(a004374):1–14.
95. Perluigi M, Di Domenico F, Blarzino C, Foppoli C, Cini C, Giorgi A, et al. Effects of UVB-induced oxidative stress on protein expression and specific protein oxidation in normal human epithelial keratinocytes: a proteomic approach. *Proteome Science*. 2010;8(13):1–14.

96. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jäättelä M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes & Development*. 2005;19:570–82.
97. Calapre L, Gray ES, Ziman M. Heat stress: a risk factor for skin carcinogenesis. *Cancer Letters*. 2013;337:35–40.
98. Wu C-L, Chou H-C, Cheng C-S, Li J-M, Lin S-T, Chen Y-W, et al. Proteomic analysis of UVB-induced protein expression- and redox-dependent changes in skin fibroblasts using lysine- and cysteine-labeling two-dimensional difference gel electrophoresis. *Journal of Proteomics*. 2012;75:1991–2014.
99. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009;11(9):2307–16.
100. Goplen D, Wang J, Enger PØ, Tysnes BB, Terzis AJA, Laerum OD, et al. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. *Cancer Research*. 2006;66(20):9895–902.
101. Caputo E, Maiorana L, Vasta V, Pezzino FM, Sunkara S, Wynne K, et al. Characterization of human melanoma cell lines and melanocytes by proteome analyses. *Landes Bioscience*. 2011;10(17):2924–36.
102. Lovat PE, Corazzari M, Armstrong JL, Martin S, Pagliarini V, Hill D, et al. Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Research*. 2008;68(13):5363–9.
103. Huang C, Foster KW, Desilva T, Zhang J, Yusuf N, Kampen KR Van, et al. Comparative Proteomic Profiling of Murine Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003;51–64.
104. Goncharuk VN, Ross JS, Carlson JA. Actin-binding protein fascin expression in skin neoplasia. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2002;29(7):430–8.

105. Yildiz L, Kefeli M, Aydin O, Kandemir B. Fascin expression in melanocytic lesions of the skin. *European Journal of Dermatology*. 2009;19(5):445–50.
106. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951;193:265–75.
107. Presland RB. Function of Filaggrin and Caspase-14 in Formation and Maintenance of the Epithelial Barrier. 1959;
108. Mhaweche P. 14-3-3 Proteins-an Update. *Cell Research*. 2005;15(4):228–36.
109. Ciocon DH, Boker A, Goldberg DJ. Intense Pulsed Light : What Works , What’s New , What ’ s Next. *Facial Plastic Surgery*. 2009;
110. Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, Digiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals an applications. *Nature Protocols*. 2011;4(9):1350–62.
111. Chaudhary SC, Alam MS, Siddiqui MS, Athar M. Chemopreventive effect of farnesol on DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis: involvement of inflammation, Ras-ERK pathway and apoptosis. *Life Sciences*. 2009;85(5-6):196–205.
112. Ishikawa T, Kumar IP, Machado HB, Wong K, Kusewitt D, Huang S, et al. Positron emission tomography imaging of DMBA/TPA mouse skin multi-step tumorigenesis. *Molecular Oncology*. 2011;4(2):119–25.
113. Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. *Cancers*. 2010;2(2):436–82.
114. Kemp CJ. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15(6):460–73.
115. Lederle W, Depner S, Schnur S, Obermueller E, Catone N, Just A, et al. IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines. *International Journal of Cancer*. 2011;128(12):2803–14.

116. Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*. 2014;26(1):54–74.
117. Ravishankaran P, Karunanithi R. Clinical significance of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in breast cancer patients. *World Journal of Surgical Oncology*. 2011;9(1):18.
118. Trichopoulos D, Psaltopoulou T, Orfanos P, Trichopoulou A, Boffetta P. Plasma C-reactive protein and risk of cancer: a prospective study from Greece. *American Association for Cancer Researchs*. 2006;15(2):381–4.
119. Kaur J, Sharma M, Sharma PD, Bansal MP. Antitumor Activity of Lantadenes in DMBA / TPA Induced Skin Tumors in Mice : Expression of Transcription Factors. *Americal Journal of Biomedical Sciences*. 2009;2(1):79–90.
120. Colell A, Green DR, Ricci J-E. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell death and differentiation*. 2009;16(12):1573–81.
121. De Heredia ML, Izquierdo JM, Cuezva JM. A Conserved Mechanism for Controlling the Translation of β -F1-ATPase mRNA between the Fetal Liver and Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(10):7430–7.
122. Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF-alpha. *Oncology Reports*. 2003;10(3):537–43.
123. Sultana R, Butterfield DA. Slot-blot analysis of 3-nitrotyrosine-modified brain proteins. *Methods in Enzymology*. 2008;440(07):309–16.
124. Greenacre S a B, Rocha F a C, Rawlingson A, Meinerikandathevan S, Poston RN, Ruiz E, et al. Protein nitration in cutaneous inflammation in the rat: essential role of inducible nitric oxide synthase and polymorphonuclear leukocytes. *British Journal of Pharmacology*. 2002;136(7):985–94.

125. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, Milzani A. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Cell*. 2009;34(2):85–96.
126. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003;417(1):3–11.
127. Thiele JJ, Hsieh SN, Briviba K, Sies H. Protein Oxidation in Human Stratum Corneum: Susceptibility of Keratins to Oxidation In Vitro and Presence of a Keratin Oxidation Gradient In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999;113(3):335–9.
128. Athar M, Kopelovich L. Rapamycin and mTORC1 inhibition in the mouse: skin cancer prevention. *Cancer prevention Research*. 2011;4(7):957–61.
129. Hsu S, Qin H, Dickinson D, Xie D, Bollag WB, Stoppler H, et al. Expression of caspase-14 reduces tumorigenicity of skin cancer cells. In vivo (Athens, Greece). 2007;21(2):279–83.
130. Castro JP, Jung T, Grune T, Almeida H. Actin carbonylation: from cell dysfunction to organism disorder. *Journal of Proteomics*. 2013;92:171–80.
131. Castro JP, Ott C, Jung T, Grune T, Almeida H. Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. *Free Radical biology and Medicine*. 2012;53(4):916–25.
132. Marengo B, Ciucis C De, Ricciarelli R, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C, et al. Protein Kinase C: An Attractive Target for Cancer Therapy. *Cancers*. 2011;3:531–67.