



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

EFEITOS DA RADIAÇÃO UV SOBRE AS TERMINAÇÕES NERVOSAS DA PELE HUMANA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular co-
mo requisito para a obtenção do
grau de Mestre.

Autor

Adriane Lucia Rodriguez

Orientador

Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer

Co-Orientador

Prof^a. Dr^a. Cristina Bonorino

Porto Alegre, RS

Abril, 2008

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que, até hoje, são as pessoas mais importantes da minha vida, por me darem todo o amor e dedicação que foram capazes.

À minha melhor amiga, Renata, por estar sempre presente nos melhores e piores momentos da minha vida tornando-me uma pessoa muito mais feliz.

Ao professor Moisés Bauer, primeiramente pela oportunidade e confiança de realizar o mestrado, patrocinado pelo *O Boticário*. Segundo e mais importante, por sua amizade e reconhecimento do meu trabalho. Por sua paciência e experiência que me proporcionou um grande crescimento e amadurecimento profissional intelectual.

À professora Cristina Bonorino, pelo colo nos momentos de angústia, por me deixar de herança muitos protocolos e por compartilhar comigo sua sabedoria.

Aos meus colegas de Laboratório, Ana Paula cuja generosidade com certeza é a maior de suas virtudes, ao Fábio por tornar agradáveis os momentos mais difíceis no laboratório e por compartilhar comigo seus conhecimentos mais intrínsecos a respeito de criostato, à Caren pelo carinho e pelo ótimo desempenho da sua profissão de “salva-vidas” em todos os momentos que precisei de ajuda. Às minhas alunas de iniciação científica Amanda e Fernanda que foram meus “anjos-da-guarda” e que chegaram junto comigo até o final, caso contrário não teria conseguido. À Melissa, última integrante do laboratório, que acrescentou muitas experiências profissionais e principalmente pessoais, em minha vida.

Ao *O Boticário* pelo patrocínio da minha bolsa de mestrado.

Às demais pessoas que fizeram parte desse trabalho contribuindo, mesmo que indiretamente, para que ele pudesse ser realizado e concluído.

ÍNDICE

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.1.1. <i>A degradação da camada de ozônio e sua influência na incidência da radiação ultravioleta (UV)</i>	1
1.1.2. <i>A distribuição anatômica das terminações nervosas da pele</i>	2
1.1.3. <i>Relação da incidência da radiação UV e os danos celulares envolvidos</i>	4
1.1.4. <i>O uso de ativos com proteção solar e sua prevenção contra doenças provocadas pela radiação</i> ..	6
1.2. OBJETIVOS	8
1.2.1. <i>Hipótese</i>	8
1.2.2. <i>Objetivo Geral</i>	8
1.2.3. <i>Objetivos específicos</i>	8
2. CAPÍTULO 2 – ARTIGO: THE EFFECTS OF ULTRAVIOLET RADIATION ON HUMAN SKIN NERVE ENDINGS..	9
2.1. ABSTRACT	9
2.2. INTRODUCTION.....	10
2.3. MATERIALS AND METHODS.....	12
2.3.1. <i>Subjects</i>	12
2.3.2. <i>Skin biopsies</i>	12
2.3.3. <i>Skin care formulations</i>	12
2.3.4. <i>UV radiation</i>	13
2.3.5. <i>Immunofluorescence</i>	13
2.3.6. <i>Image analysis</i>	14
2.3.7. <i>Statistical analysis</i>	14
2.4. RESULTS	14
2.5. DISCUSSION.....	15
2.6. REFERENCES	17
2.7. FIGURE LEGENDS	19
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
CAPÍTULO 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMO

Introdução: Atualmente, devido à poluição e emissão de gases tóxicos, há uma degradação gradual da camada de ozônio que filtra uma grande parcela das emissões UV. A radiação UV altera significativamente as estruturas da pele, incluindo as terminações nervosas. Em decorrência do crescente aumento de doenças de pele relacionadas à exposição UV, faz-se necessária a avaliação da efetividade de novos princípios ativos com finalidade de proteção contra as radiações. Estudos anteriores não foram capazes de quantificar o dano induzido pela radiação UV nas terminações nervosas. Objetivos: identificar as terminações nervosas na pele humana, quantificar os efeitos das radiações UV sobre as terminações nervosas e verificar o efeito de princípios ativos neuroprotetores à exposição UV. Materiais e Métodos: biópsias de pele, de 35 adultos saudáveis, sob cirurgia plástica, foram obtidas e imediatamente tratadas com três emulsões: Creme1, Creme2 (placebo) e FPS 15. As amostras tratadas com as emulsões ou controle (sem creme) foram submetidas à exposição UVA e UVB por 60 min. Secções de 15 μm foram produzidas no criostato a partir de tecidos congelados e as estruturas nervosas foram identificadas por imunofluorescência utilizando um anticorpo monoclonal anti-CD56 (NCAM) humano. O dano nas terminações foi identificado a partir da seleção automática de pixels (verde – FITC) das imagens capturadas. Resultados: foram identificadas várias estruturas nervosas na pele, incluindo terminações livres, inervações do folículo piloso e glândulas sebáceas. As radiações UVA e UVB reduziram, significativamente (40-60%), a densidade das terminações nervosas na pele nas amostras controle, tratadas com placebo ou FPS 15 ($p < 0.001$). Não foram observadas diferenças morfológicas das terminações nervosas expostas a radiação UV. As amostras tratadas com o Creme1 bloquearam completamente os efeitos da radiação UV sobre as terminações nervosas ($p > 0.05$). Discussão: A quantificação dos danos celulares induzidos pela radiação UV possibilita a identificação de compostos ativos com propriedades neuroprotetoras. Os mecanismos de dano celular bem como as atividades neuroprotetoras merecem ser identificadas nos próximos estudos.

ABSTRACT

Introduction: Current pollution and emission of toxic gases is leading to a gradual deterioration of the ozone layer that filters out a large portion of the ultraviolet (UV) emission. It has been shown that UV radiation significantly alters the structure of the skin, including nerve endings. Due to the increasing number of skin diseases as a result of UV exposure, it is necessary to evaluate the effectiveness of new skin care formulations with broad-spectrum sunscreens. Previous studies have not been able to quantify the damage induced by UV radiation on peripheral nerve endings. Objectives: To identify the nerve endings in the skin, quantify the effects of UV radiation on nerve endings and evaluate the neuroprotective effects of new skin care formulation to UV exposure. Materials and methods: biopsies of skins were obtained from 35 healthy young adults, undergoing plastic surgery, and immediately treated (10 min) with three emulsions: Cream1, Cream2 (placebo) and commercially available sun protection factor (SPF) 15. Samples treated with the emulsions or control (untreated) were exposed to UVA and UVB for 60 min. Skin tissues were frozen and 15- μ m cryostat sections were produced. Peripheral nerve endings were identified by immunofluorescence using a monoclonal antibody anti-human CD56 (NCAM). The cell damage was identified from the automatic pixel selection (green - FITC) of captured images. Results: several cellular nervous structures were identified in the skin, including free nerve endings, innervations of the hair follicle and sebaceous glands. The UVA and UVB decreased significantly (40-60%) the density of nerve endings in the skin of control, samples treated with placebo or SPF 15 (all $p < 0.001$). No morphological changes were observed in the free nerve endings exposed to UV radiation. Samples treated with Cream1 completely blocked the effects of UV radiation on nerve endings ($p > 0.05$). Discussion: The quantification of cellular damage induced by UV radiation enables the identification of new skin care compounds with neuroprotective properties. The underlying mechanisms of UV-induced cellular damage as well as the neuroprotective actions should be further investigated in future studies.

1. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA

1.1. INTRODUÇÃO

1.1.1. *A degradação da camada de ozônio e sua influência na incidência da radiação ultravioleta (UV)*

A radiação ultravioleta pode ser dividida em três categorias, dependendo do comprimento de onda: UVC, 200-280 nm; UVB, 280-315 nm; UVA, 315-400 nm. A camada de ozônio estratosférica tem capacidade de bloquear comprimentos de onda menores de 290nm, filtrando cerca de 70-90% da radiação UVB. No entanto, desde 1970, verifica-se uma diminuição substancial na camada de ozônio com um aumento do alcance da radiação UVB na superfície da Terra - o que foi particularmente percebido na Antártida (1).

Desde o fim da produção de CFCs no Brasil, em 1999, a fabricação e o uso desses gases prejudiciais à Camada de Ozônio foram reduzidos em 82,8%. Até 1997, o Brasil consumia cerca de 10 mil toneladas ao ano de CFCs. Em 2004, o uso foi de menos de 2 mil toneladas. Além da significativa redução no uso de CFCs, o País eliminou 88% dos halons, usados em extintores de incêndios, 77,3% do tetracloreto de carbono, utilizado pela indústria química, e 76,3% do brometo de metila, aplicado principalmente na indústria do tabaco. Essas substâncias também prejudicam a Camada de Ozônio quando são lançadas no ambiente. Em frigoríficos, freezer, geladeiras, aparelhos de ar-condicionado e frigobares antigos, o CFC é o "gás de geladeira", usado para retirar o calor do aparelho e liberá-lo do lado de fora. O uso desse gás no meio ambiente provocou a redução na espessura da Camada de Ozônio em algumas regiões, principalmente no sul do Planeta. A camada é seme-

lhante a um grande filtro, e protege a saúde humana e os seres vivos dos efeitos nocivos dos raios ultravioleta.

Dentre os prejuízos causados pela degradação da Camada de Ozônio, está uma maior incidência de câncer de pele, de queimaduras e de casos de catarata, prejuízos ao sistema imunológico e a redução da fotossíntese, levando, também, a uma queda na produtividade de várias culturas agrícolas.

A radiação UV altera significativamente as estruturas da pele, bem como a saúde humana. A exposição pode ser benéfica como, por exemplo, no auxílio da produção de Vitamina D pela pele, porém também pode promover efeitos indesejáveis como queimaduras, envelhecimento cutâneo precoce, danos oculares e o desenvolvimento de câncer de pele (2). A radiação UV penetra através da camada mais externa da pele (epiderme) provocando, também, danos em várias estruturas celulares como as terminações nervosas.

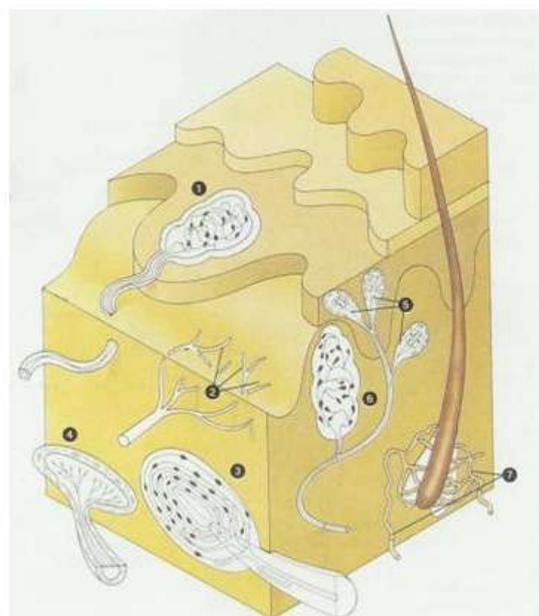
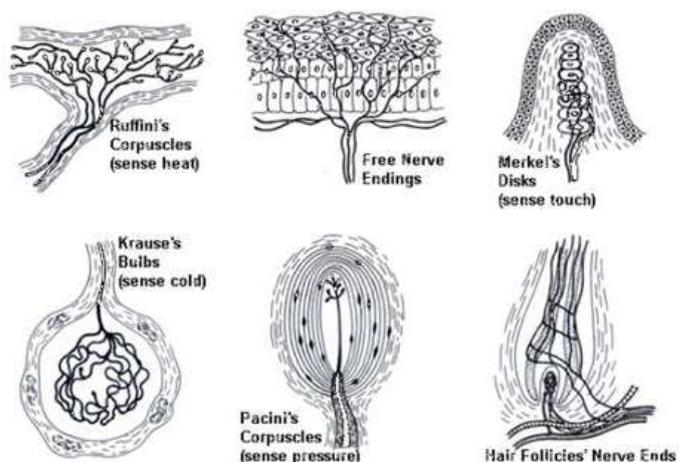
1.1.2. A distribuição anatômica das terminações nervosas da pele

A presença de fibras nervosas na epiderme humana tem sido debatida e especulada há mais de 120 anos. A primeira descrição essencialmente correta sobre fibras nervosas intra-epidérmicas foi publicada em 1868 por Langerhans, mostrando a presença de ramos penetrando a epiderme através da membrana basal (3). Existem várias estruturas nervosas na pele humana. Na parte superficial da derme, as terminações nervosas livres estão freqüentemente agrupadas em feixes de fibras nervosas (4). Num indivíduo saudável, o número de feixes de estruturas neurais é menos denso, devido à sua trajetória até a derme. Existem cerca de 10-20 fibras nervosas por feixe. Os feixes nervosos são largos em tamanho e geralmente vêm acompanhados por vasos sanguíneos e localizados ao redor de glândulas sudoríparas (5). A distribuição das fibras nervosas na epiderme obedece a um padrão seme-

lhante: a presença de vários feixes nervosos que partem da derme, penetrando a membrana basal e ramificando-se a partir da camada supra-basal da epiderme. Elas alcançam a parte mais externa com ramos muito finos e discretos espessamentos nas extremidades, semelhantes a sacos terminais (6).

Para cada sensação, existem diferentes receptores que levam o estímulo até o SNC (Sistema Nervoso Central), onde são transformados em sensações. Os Bulbos de Krause (responsáveis pela sensação de frio) apresentam-se como uma dilatação com terminações nervosas ramificadas envoltas por uma cápsula conjuntiva. A sensação de calor que, muitas vezes, é causa de desconforto é atribuída aos Órgãos de Ruffini que possui estrutura semelhante à dos bulbos de Krause, porém de aspecto mais achatado. Para as sensações de toque possuímos dois tipos de estruturas: os discos de Merkel e os Corpúsculos de Meissner. Os discos de Merkel são compostos de uma célula especializada, a célula de Merkel que, em contato com fibras amielínicas, penetram a membrana basal e terminam em forma de discos na parte inferior destas células. Os corpúsculos de Meissner são estruturas alongadas que se dispõem dentro de algumas papilas dérmicas. Apresentam-se formados por tecido conjuntivo regularmente disposto, dentro do qual penetram várias terminações nervosas. Por último, os corpúsculos de Paccini, responsáveis pela sensação de pressão, apresentam-se sob a forma de uma terminação nervosa, envolta por delgadas camadas concêntricas de tecido conjuntivo (7). A figura 1 representa detalhadamente as principais estruturas nervosas presentes na pele humana.

Existem outros aspectos importantes a serem considerados no padrão de distribuição das fibras nervosas na pele: a variação de sua densidade entre as diferentes partes do corpo e a variação conforme a idade dos indivíduos. Essas informações podem ser utilizadas para identificar a presença de neuropatias periféricas e até mesmo danos provocados por agentes externos como a própria radiação UV (3).



1. Bulbos de Krause (perda de calor)
2. Terminações nervosas (dor e toque)
3. Corpúsculos de Pacini (pressão)
4. Órgãos de Ruffini (ganho de calor)
5. Discos de Merkel (toque)
6. Corpúsculos de Meissner (toque)

Figura 1. Diagrama das principais estruturas nervosas na pele. Adaptado de Young (2000) (8).

1.1.3. Relação da incidência da radiação UV e os danos celulares envolvidos

A pele está ligada ao SNC através de terminações nervosas cutâneas (terminações nervosas que chegam até a base da epiderme). Entre estas terminações nervosas e as células da pele, circulam mensageiros, substâncias imunomoduladoras, neurotransmissores e hormônios (9). Desta perfeita comunicação depende a normalidade de fenômenos fisiológicos tais como a renovação da pele, a cicatrização, a resposta imune, a síntese dos pigmentos que determinam a cor da pele (melanina), entre outros (10). Fatores como radiação solar, poluição, e o próprio envelhecimento intrínseco podem afetar a estrutura das terminações nervosas cutâneas, prejudicando, não somente o equilíbrio da comunicação entre células da pele, como os demais fenômenos fisiológicos envolvidos (11). Queimaduras solares, pigmentação, foto-envelhecimento e foto-carcinogênese, são, dentre outras, as maiores e mais marcantes conseqüências da exposição da pele à radiação UV (12). Os even-

tos moleculares iniciais que envolvem essas respostas são modificações diretas ao DNA, e formação de espécies reativas de oxigênio (13). As células reagem ao dano inicial com reparo de DNA, dentre outros mecanismos, incluindo a expressão de HSP's (Heat Shock Proteins) conhecidas por sua liberação em situações de estresse celular (14). Dependendo do comprimento de onda, da dose da radiação emitida e do tipo celular, uma porcentagem de células entra em uma via apoptótica (15).

Diversas são as respostas da pele frente à exposição crônica à radiação UV. Essas respostas, apesar de pouco entendidas, desenvolvem um papel fotoprotetor. O aumento da produção de melanina que se segue após a exposição solar resulta em um maior grau de fotoproteção (16). O mecanismo de fotoproteção desempenhado pela melanina envolve a dissipação da radiação UV em calor (conversão interna). Este processo fotoquímico é extremamente rápido e 99,9% da energia são dissipados em calor. Esta grande dissipação de calor não é prejudicial à saúde e é essencial para evitar o dano indireto ao DNA. Contudo, se a energia da radiação UV não for transformada em calor, ela pode produzir radicais livres na forma de espécies reativas do oxigênio como, por exemplo, ânions superóxido e radicais hidroxila. Um mecanismo de defesa da pele que reflete um dano direto é o aumento da produção de melanina frente à exposição UV (17). A avaliação do tipo de cor de pele seria um método individual de determinar o grau de proteção da pele quando há desenvolvimento de eritema, visto que níveis elevados de melanina desempenham papel protetor a esse dano (18).

O eficiente reparo ao DNA é um mecanismo de prevenção ao desenvolvimento de tumores e sua progressão. Alguns elementos celulares importantes como, por exemplo, o gene p53, desempenham papéis essenciais na resposta celular ao estresse citotóxico provocado pela radiação UV. O rompimento da função normal desse gene foi visto como um importante passo no desenvolvimento de carcinoma

humano. Mutações em p53 são comuns em câncer de pele de origem não melanocítica (19). A ineficiência de reparos ao DNA se inicia com o processo de apoptose, um mecanismo importante na eliminação de células cancerosas (20).

Um aspecto importante é o envelhecimento da pele provocado pela radiação UV (foto-envelhecimento). A pele cronicamente exposta tem características comuns, como o envelhecimento precoce, que pode ser notado pelo aspecto físico de enrugamento. Há um espessamento da membrana basal, que pode ser causado pelo dano aos queratinócitos, desordenamento na distribuição de melanócitos visto pela pigmentação irregular, entre outros (21). A severidade do dano pode ser quantificada pelo grau de exposição. As alterações de colágeno e fibras elásticas refletem proporcionalmente o nível do dano (22).

1.1.4. O uso de ativos com proteção solar e sua prevenção contra doenças provocadas pela radiação

Compostos químicos com atividade de proteção solar são conhecidos por prevenir eritema induzido por radiação UV. Compostos químicos de uso tópico, denominados comercialmente de protetores solares, são conhecidos por sua atividade de proteção à radiação UV. É ainda controverso se esses compostos são capazes de prevenir câncer de pele. Porém, experimentos realizados em outros modelos experimentais, como camundongos, foi demonstrada diminuição da formação de câncer com a utilização dessas substâncias (19). Muitas formulações estão sendo desenvolvidas e seus benefícios avaliados na proteção contra os diversos tipos de radiação. (22).

Na indústria de cosméticos, a medida mais estudada atualmente e que indica efetividade do filtro solar, ou seja, bloqueio contra radiações UV, é o fator de proteção solar (FPS). O FPS pode ser caracterizado, a partir do tempo necessário

para desenvolver um eritema após exposição UV ou solar. Contudo, a sua quantificação limita-se somente ao dano celular observado na epiderme. Outros métodos ainda quantificam o nível de pigmentação da pele (18). O uso de substâncias protetoras vem sendo essencial na proteção aos efeitos da incidência de radiação UV. São necessários estudos que preconizem o entendimento do funcionamento dos componentes celulares da pele, para que possa ser direcionado um tratamento para cada tipo de patologia provocada pela excessiva exposição à radiação UV. Quantificar o efeito dos compostos químicos com propósito protetor é o objetivo de muitos grupos de estudo atualmente e seria de grande relevância encontrar formulações que amenizassem ou até mesmo evitassem processos de dano e injúria celular.

O presente trabalho teve como objetivo a padronização de uma técnica para descrever e quantificar o dano da exposição UV em estruturas nervosas da pele. Em decorrência do crescente aumento de doenças relacionadas à exposição UV, faz necessária a avaliação da efetividade de novos princípios ativos com finalidade de proteção contra as radiações. Para a padronização desta técnica, amostras de peles humanas, previamente tratadas com emulsões fornecidas pela empresa *O Boticário*® (produtos ainda não disponíveis comercialmente) e um FPS 15 conhecido (*Coppertone*®, Schering-Plough), foram expostas à radiação UV *ex vivo*. Os detalhes desta padronização bem como os resultados obtidos são apresentados nas próximas seções desta dissertação.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Hipótese

A exposição UV deverá reduzir significativamente as terminações livres da pele humana e cremes com ativos FPS eficientes deverão induzir neuroproteção.

1.2.2. Objetivo Geral

Analisar os efeitos da exposição UVA e UVB, *ex vivo*, sobre as terminações nervosas da pele humana.

1.2.3. Objetivos específicos

- Identificar terminações nervosas na pele humana.
- Analisar os efeitos da radiação UV sobre terminações nervosas da pele.
- Determinar o efeito das substâncias cosméticas nas alterações causadas pela exposição à radiação UV.

2. CAPÍTULO 2 – ARTIGO: THE EFFECTS OF ULTRAVIOLET RADIATION ON HUMAN SKIN NERVE ENDINGS

Adriane L. Rodriguez ¹, Fernanda S. Stefani ¹, Carlos E. Praes ⁵, Angela Piacieski ⁵,
Milton P. Oliveira ², Pedro Martins ², Vinicius D. da Silva³, Cristina Bonorino ^{1,4}
and Moisés E. Bauer ^{1,4}

Submitted to *Experimental Dermatology*

¹ *Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

² *Plastic Surgery Unit, Hospital São Lucas (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

³ *Pathology Unit, Hospital São Lucas (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

⁴ *Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.*

⁵ *O Boticário, São José dos Pinhais, PR, Brazil.*

2.1. ABSTRACT

Ultraviolet (UV) radiation significantly alters the structure of the skin, including nerve fibers. Due to the increasing number of skin diseases as a result of UV exposure, it is necessary to evaluate the effectiveness of new skin care formulations with broad-spectrum sunscreens. Previous studies were unable to quantify the damage induced by UV radiation on peripheral nerve endings. In this study, we assessed free nerve endings in healthy human skin, quantified the effects of UV radiation on nerve endings and evaluated the neuroprotective effects of new skin care formulation to UV exposure. All samples were leftover material of mastoplasty and abdominoplasty procedures of 34 female patients enrolled in plastic surgery. All samples were immediately treated (10 min) with three emulsions: Cream1, Cream2 (placebo) and a

commercially available sun protection factor (SPF) 15. Samples treated with the emulsions or control samples (untreated) were exposed to UVA and UVB for 60 min. Frozen sections of all specimens were prepared. Peripheral nerve endings were identified by immunofluorescence using a monoclonal antibody anti-human CD56 (NCAM). Cell damage was assessed by image analysis by automatic pixel selection of acquired images. Several cellular nervous structures were identified in the skin, including free nerve endings, innervations of hair follicles and sebaceous glands. The UVA and UVB decreased significantly (40-60%) the density of nerve endings in the skin of control, samples treated with placebo or SPF 15 (all $p < 0.001$). No morphological changes were observed in the free nerve endings exposed to UV radiation. Samples treated with Cream1 completely blocked the effects of UV radiation on nerve endings ($p > 0.05$). The quantification of cellular damage induced by UV radiation enables the identification of new skin care compounds with neuroprotective properties. The underlying mechanisms of UV-induced cellular damage as well as the neuroprotective actions should be further investigated in future studies.

Key words: skin, UV irradiation, nerve endings, broad-spectrum sunscreen

2.2. INTRODUCTION

The skin is linked to the central nervous system through peripheral innervations derived of the sensory ganglia dorsal. The free nerve endings of these fibers are projected to the epidermis where they come into close contact with keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells (1). These cellular structures release common messengers including neuropeptides, hormones and cytokines. This perfect communication depends on healthy integrity of the skin, including the renewal of the skin, photo-aging, wound healing, immune responses, melanin synthesis, melanin and others (2).

Solar ultraviolet (UV) radiation is one of the most powerful natural physical carcinogens able to disrupt the integrity of the skin. It is responsible for chronic inflammation, skin ageing and development of skin cancer. The UV radiation penetrates in the epidermis and induces a variety of biological effects in the nervous components of the skin (3). The further characterization of the skin sensory structures will lead to a better understanding of physiological and pathological conditions related to UV exposure (4). Changes in skin nerve endings have been related in neuropathies and other skin-related diseases. The chronic UV exposure is the major environmental factor that promotes the skin aging (photo-ageing). This form of photo-ageing overlaps the chronological aging and can be promptly compared to body areas that remain protected from solar exposure (3). The initial molecular event observed following UV exposure include direct DNA changes related to oxidative stress (5).

Previous studies investigated the cutaneous changes produced by UV exposure by qualitative methods. For instance, the SPF (sun protection factor) is the most common qualitative method employed by the cosmetics industry and measures the required time to develop an erythema. Recently, immunohistochemistry and immunofluorescence techniques have been developed for the identification of the intra-epidermal nerve fibers (1, 4, 6). These methods have a great specificity to study the peripheral nerve endings during both healthy and pathological conditions (7). In this study, we investigated free nerve endings in the healthy human skin, quantified the effects of UV radiation on nerve endings and evaluated the neuroprotective effects of new skin care formulation to UV irradiation.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Subjects

Thirty four female patients (all Caucasian), mean age 33 ± 12 yrs, were recruited in the Plastic Surgery Unit of the Hospital São Lucas (Porto Alegre, Brazil). All patients underwent cosmetic plastic surgery to reduce either breast (mamoplasty) (n=15) or abdomen (abdominoplasty) (n=19). A written informed consent were presented to and signed by all patients. The current research was approved by the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) Ethics Committee.

Exclusion criteria included indoor tanning during the last 6 months, diabetes, neoplasias or any other infectious, or chronic inflammatory diseases (e.g. arthritis, lupus, psoriasis, ptiriasis and vitiligo).

2.3.2. Skin biopsies

The biopsies consisted of skin fragments with approximately 7 cm^2 . The tissues were separated into smaller sections (1 cm^2) for all the treatments at room temperature. The biopsies were kept in saline solution following the surgical interventions and immediately taken to the laboratory for processing.

2.3.3. Skin care formulations

The skin care formulations consisted of Cream1, Cream2 (placebo) and a commercially available SPF 15. The cosmetics Cream1 and Cream2 were supplied by O Boticário® (São José dos Pinhais, Brazil) and consisted of complex mixtures with several bioactive compounds that were only added to the test cream, including: ethylhexyl methoxycinnamate, diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, ethylhexyl triazone, *Hypneia musciformis* extracts, *Gellidiela acerosa*, *Cucumis sativa*, *Citrus Unshiu*, Peg-6 isostearate, hesperetin laurate, sodium ascorbyl phosphate, retinyl palmitate and tocopheryl acetate. The emulsions were gently and manually

applied to the skin biopsies ($2 \text{ mg} / \text{cm}^2$) at 10 min prior the UV exposure in Petri dishes with saline (without covering up the samples).

2.3.4. *UV radiation*

UVA and UVB lamps with 45 cm (Phillips, 15W) were used to irradiate the skin biopsies for 60 min at sterile conditions provided in a laminar flow cabinet. The control skin samples were left untouched at the bench during the same period of time. The irradiances were dully measured before the treatments and consisted of $2.18 \pm 0.10 \text{ W} / \text{m}^2$ (UVA) and $2.48 \pm 0.11 \text{ W} / \text{m}^2$ (UVB). These measurements were performed with a spectro-radiometer by the Radiation Physics Group (GFR) of the Faculty of Physics of PUCRS.

2.3.5. *Immunofluorescence*

Skin biopsies were treated with 99% isopentane (Vetec, Brazil) and frozen in liquid nitrogen for 10 seconds. Four $15 \mu\text{m}$ longitudinal sections of the epidermis were made in a criostate (Sundown) per treatment. The slides were heated on a hot plate at 42°C for 5 min, and fixed in acetone for 10 min. At this point the slides could be either used or frozen at -20°C . Frozen slides were warmed up at room temperature for 10 min in a moist chamber (Erviogas), and following re-hydrated in PBS for 10 min. Fc blocking (solution of 10% sheep serum, 10% human serum in PBS) was performed during 20 min. Slides were washed (4X) in PBS and incubated overnight with primary antibody (anti-CD56 (NCAM), FK Biotec, Porto Alegre) diluted 1:200 in Fc block. Samples were washed (4X) in PBS and incubated with secondary antibody (FITC labeled goat anti mouse IgG - Sigma, St. Louis, USA) diluted 1:50 in Fc block, for 30 min. Counter staining was performed with DAPI (1:2000 in PBS) for 2 min. Slides were mounted in Vectasheild (Vector) for analysis in a fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 40).

2.3.6. *Image analysis*

Five fields (100X) per treatment were captured in a fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 40) equipped with an Image Pro Plus Capture Kit digital camera (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Cells were located using excitation in blue (488-nm) light and images were sequentially acquired using selective FITC (green) and DAPI (blue) filter blocks. The images were captured with the Image Pro-plus 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Image acquisition time was fixed by the software and the time from cell localization to initiation of image capture was less than 5 sec to minimize bleaching effects. No fluorescence bleaching was observed during the acquisitions. The density of nerve endings was evaluated by automatic pixel selection (color range function, Adobe Photoshop CS3) on the acquired images. Results are expressed in total number of green pixels (the stained neurofilaments). All images had a spatial resolution of 4 pixel per μm^2 . Evaluation of damage was performed in a double-blind fashion - the investigator responsible for analyzing the images was not aware of the treatment used in skin specimens.

2.3.7. *Statistical analysis*

Variables were tested for normality of distribution by Kolmogorov-Smirnov test. Data were analyzed by factorial ANOVA including three levels for the variable cream (absent, cream 1 and cream 2) and three levels for irradiation (absent, UVA and UVB). Differences among treatments were investigated through Tukey contrast analysis, with significance of $\alpha = 95\%$. Data were presented as mean \pm standard error (SE) and analyzed with the SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

2.4. RESULTS

In this study, it was possible to identify various cutaneous nerve fibers responsible for sensory stimulation. The neural structures identified under fluores-

cence microscopy were free and diffuse nerve endings, and innervations of hair follicles and sebaceous glands (Figure 1).

We then quantified the effects of UV radiation on nerve endings and assessed the neuroprotective effects of new skin care formulation. Both UVA and UVB significantly reduced (40-60%) nerve ending density in skin samples not treated with cream (control), Cream2 (placebo) or with a SPF 15 (all $p < 0.001$). Figure 2 shows representative images of samples exposed to UVA radiation – the same pattern was observed for skin samples exposed to UVB radiation. No morphological alterations were observed in cutaneous fibers exposed to UV radiation, as assessed by fluorescence microscopy. Samples treated with Cream1 completely blocked the UV-related damaging effects over nerve endings ($p > 0.05$, vs. samples not exposed to UV) (Figure 3). We performed additional statistical analyses in order to test whether the reported changes are tissue-specific. The skin biopsies were obtained from breast and abdomen that could theoretically present a differential pattern of innervations or solar exposure. However, the UV-induced effects were similarly observed for breast or abdomen samples when analyzed separately (all $p < 0.001$, vs. control). The broad-spectrum neuroprotective effects of Cream1 were also observed in breast (UVA, $p = 0.83$; UVB, $p = 0.84$) or abdomen (UVA, $p = 0.17$; UVB, $p = 0.10$) samples when analyzed separately.

2.5. DISCUSSION

UV radiation significantly alters cell structures in the skin, including nerve endings. In this study, we standardized a new method to quantify peripheral nerve cell damage produced by UV radiation. This method has the advantage of dispensing the use of experimental animals, employing plastic surgery leftovers that would otherwise be discarded. This technique allowed the identification of various cutaneous nerve fibers as well as enabled the prospection of active neuroprotective ingredients

against UV damage. UVA or UVB exposure significantly reduced the density of skin nerve endings and a new skin care formulation was identified with neuroprotective action.

The initial events that follow UV exposure include erythema, direct DNA modifications by action of free radicals and increase in the production of p53, and apoptotic marker. Cells react to this damage by repairing DNA, increasing melanin production, inducing heat shock proteins (HSPs), among other protective mechanisms (8). Depending on the wavelength, irradiance and cell type involved, apoptosis is induced. In some cases, these alterations result in cancer.

There is increasing evidence that genes involved in responses to cell damage induced by radiation may play a key role in cytotoxic responses to UV radiation (9). The biochemical processes involved are not completely understood, as well as the degree of involvement of skin components, as well as if there is a decrease in epidermal fibers when chronically exposed to UV radiation. However, the induction of photoproducts and the increase in proteins associated with cell damage can result in apoptosis of skin neurons, in an attempt to downregulate nociceptor stimuli (8). Moreover, the observed damage can be a consequence of direct penetrance of radiation, without the involvement of biochemical components (10).

Further studies should be performed to analyze the molecular mechanisms of UV-related cell damage, including the formation of pyrimidine dimers, induction of neurotrophins or HSPs. Neurotrophins are a group of diverse proteins secreted by target neurons that influence survival and maintenance of neurons. Neuronal growth factor (NGF) promotes growth and differentiation of sensory neurons, although a great variety of non-neuron cells, including macrophages and Langerhans cells, can secrete and react to these mediators. The induction of cutaneous inflamma-

tion with erythema that is induced by UV radiation correlates with a rapid increase in NGF production by the inflamed tissues (8). Other studies have associated the peripheral nerve endings with the exacerbation or maintenance of inflammatory diseases, due to secretion of neurotrophins (11).

Some shortcomings of this study should be discussed. Further studies are necessary to compare the observed *ex vivo* effects with *in vivo* effects of radiation. These studies are harder to be performed due to the invasiveness of biopsy procedures needed as well as the natural solar exposure, considered as intervening variable. Also, acute UV exposure effects should be compared to chronic exposure effects. There is growing need for the development of new techniques to evaluate and quantify the cell damage *in vivo*, as well as its reversion. Some recent studies indicate that skin pigmentation and melanin distribution can be considered indicative of damage when compared to other methods (12). It has been shown that susceptibility to alter pigmentation is probably indicative of a tendency to develop deleterious damage due to chronic exposure to UV, photo-ageing and skin cancer, while natural pigmentation could be related to protection (13). With growing exposure to UV radiation, further studies are required to dissect the biochemical factors present in the epidermis that could possibly contribute to the development of such pathologies.

2.6. REFERENCES

1. Legat F J, Jaiani L T, Wolf P, et al. The role of calcitonin gene-related peptide in cutaneous immunosuppression induced by repeated subinflammatory ultraviolet irradiation exposure. *Exp Dermatol* 2004; 13: 242-250.
2. Misery L. The neuro-immuno-cutaneous system and ultraviolet radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000; 16: 78-81.
3. Nielsen K P, Zhao L, Stamnes J J, Stamnes K, Moan J. The importance of the depth distribution of melanin in skin for DNA protection and other photobiological processes. *J Photochem Photobiol B* 2006; 82: 194-198.

4. Tschachler E, Reinisch C M, Mayer C, Paiha K, Lassmann H, Weninger W. Sheet preparations expose the dermal nerve plexus of human skin and render the dermal nerve end organ accessible to extensive analysis. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 177-182.
5. Tyrrell R M. Role for singlet oxygen in biological effects of ultraviolet A radiation. *Methods Enzymol* 2000; 319: 290-296.
6. Nedelec B, Hou Q, Sohbi I, Choiniere M, Beauregard G, Dykes R W. Sensory perception and neuroanatomical structures in normal and grafted skin of burn survivors. *Burns* 2005; 31: 817-830.
7. Jung K, Seifert M, Herrling T, Fuchs J. UV-generated free radicals (FR) in skin: Their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2007.
8. Chen W P, Chang Y C, Hsieh S T. Trophic interactions between sensory nerves and their targets. *J Biomed Sci* 1999; 6: 79-85.
9. Backvall H, Wassberg C, Berne B, Ponten F. Similar UV responses are seen in a skin organ culture as in human skin in vivo. *Exp Dermatol* 2002; 11: 349-356.
10. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000; 16: 239-244.
11. Legat F J, Wolf P. Photodamage to the cutaneous sensory nerves: role in photoaging and carcinogenesis of the skin? *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5: 170-176.
12. Latreille J, Gardinier S, Ambroisine L, et al. Influence of skin colour on the detection of cutaneous erythema and tanning phenomena using reflectance spectrophotometry. *Skin Res Technol* 2007; 13: 236-241.
13. Del Bino S, Sok J, Bessac E, Bernerd F. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Res* 2006; 19: 606-614.

2.7. FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Nerve endings in human skin. Free nerve endings in human skin (A), hair follicle innervation (B) and sebaceous glands (C) were identified by fluorescence microscopy (green, FITC, anti-NCAM). Nuclei are stained with DAPI (blue). 200X.

FIGURE 2. Effects of UVA over skin nerve free endings. A reduction in green fluorescence (FITC anti-NCAM) associated with free endings in human skin is observed with UV exposure . Skin samples were exposed to UVA ex vivo for 60 min after applying emulsions containing neuroprotective active ingredients, SPF 15 or placebo. (A) control, no UV; (B) UVA without cream; (C) UVA + Cream1; (D) UVA + Cream 2; (E) UVA + SPF 15. 200X.

FIGURE 3. Quantitative analysis of nerve damage induced by UVA or UVB and neuroprotection by active ingredients. A, neuroprotective effects of Cream 1; B, cell damage in nerve endings of skin samples treated with commercially available SPF 15. Statistically significant differences are indicated ** $p < 0.001$.

FIGURE 1

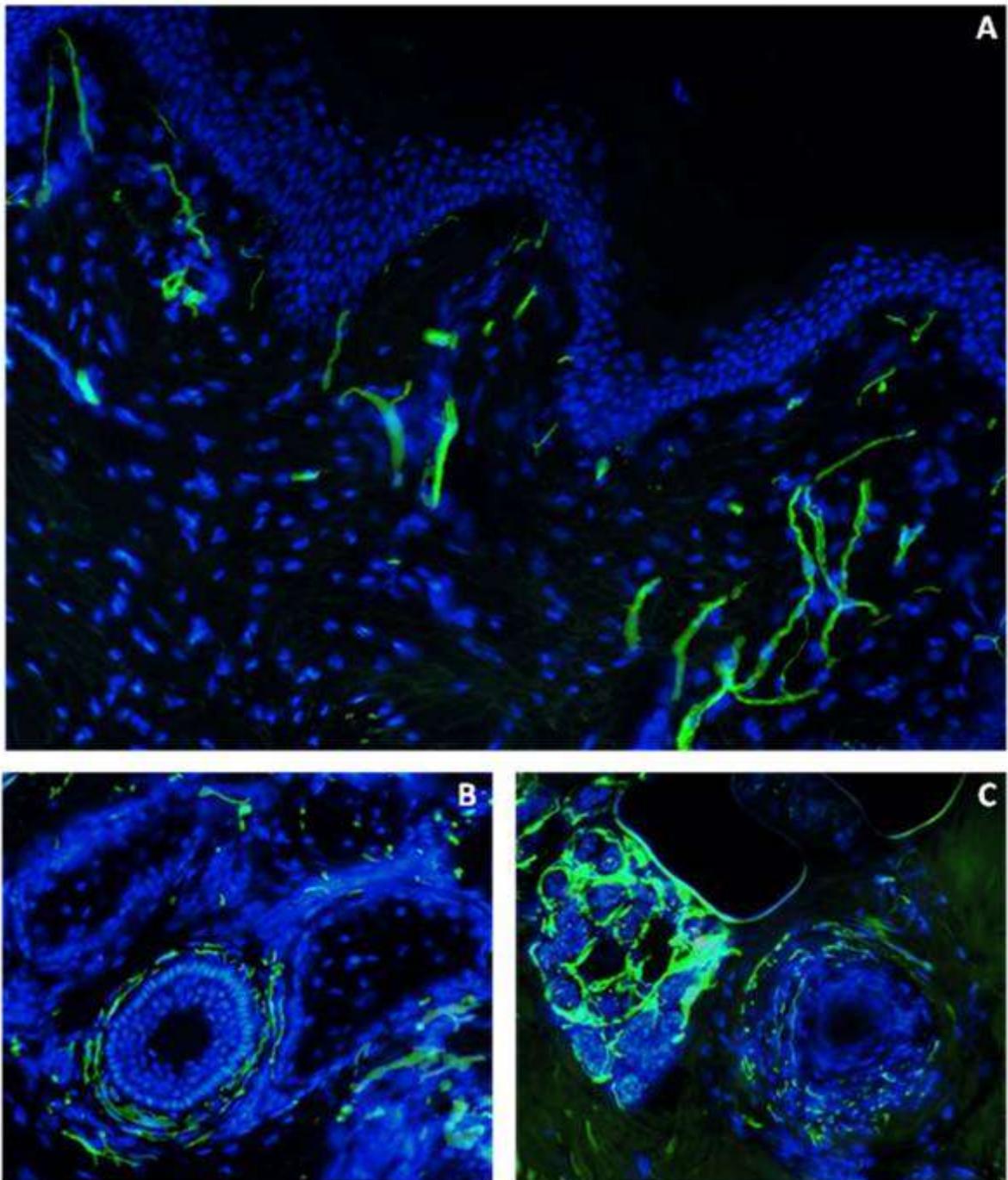


FIGURE 2

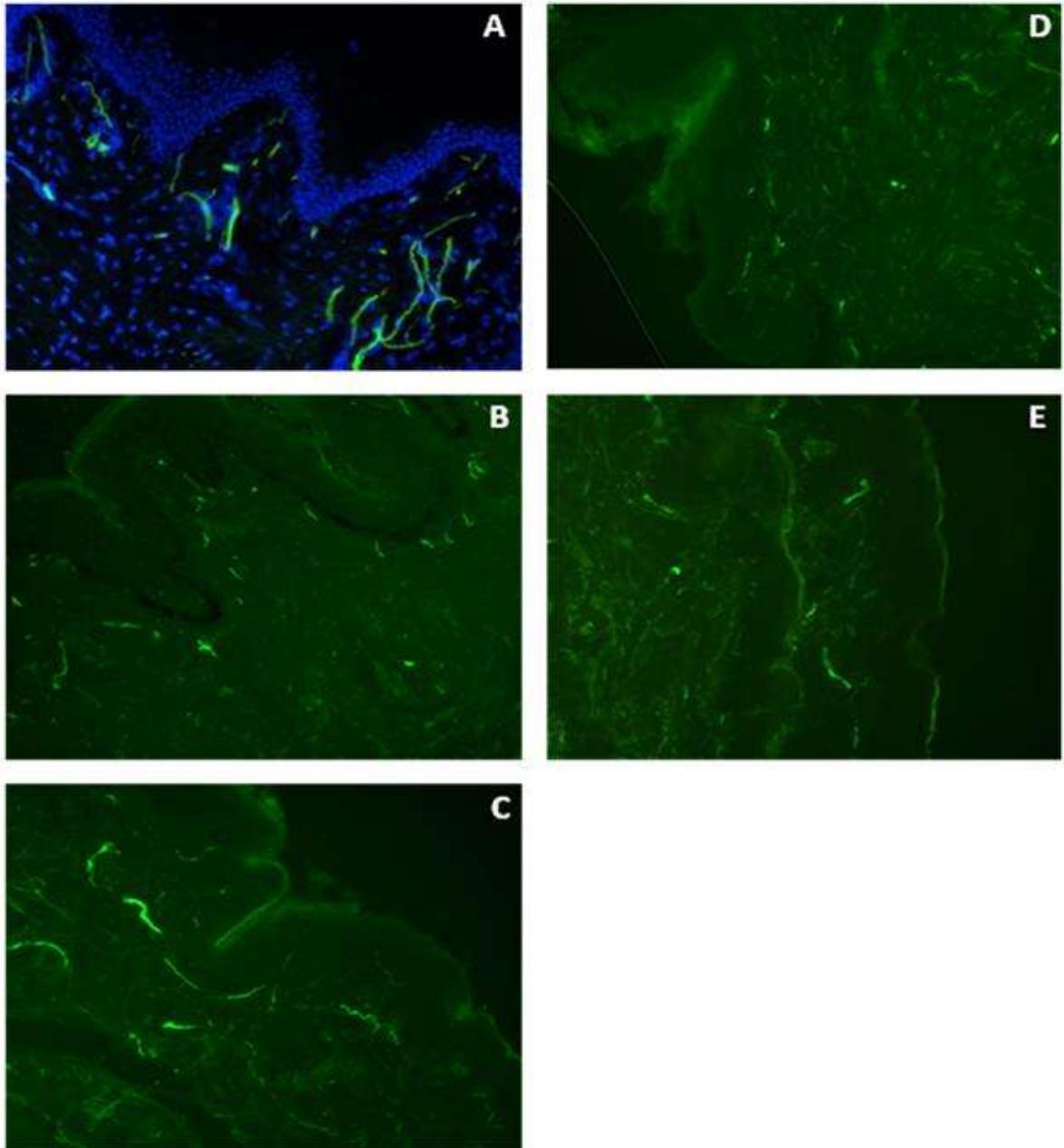
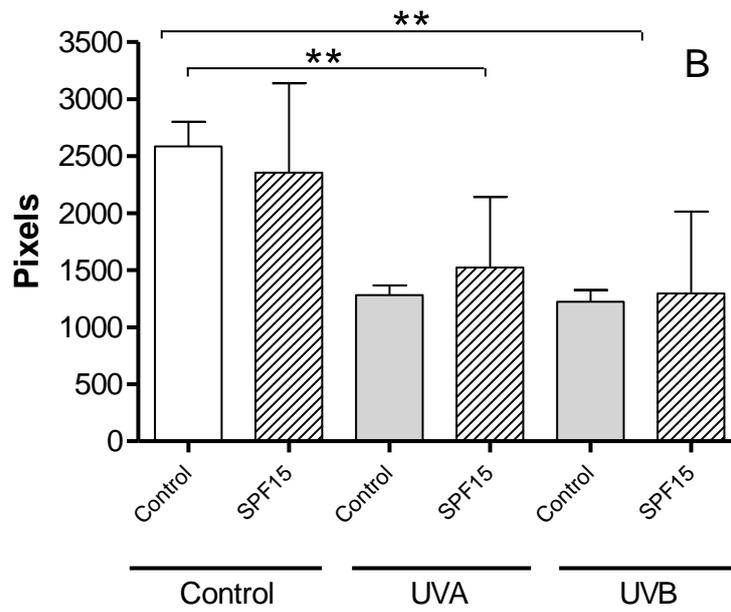
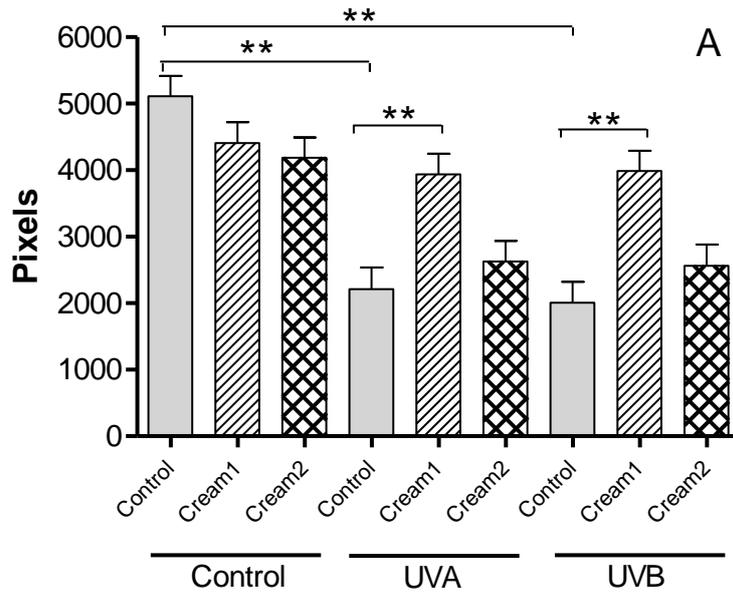


FIGURE 3



CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo, através de uma técnica de imunofluorescência, permitiu identificar com sucesso inúmeras estruturas nervosas da pele. Estas estruturas incluem as terminações livres cutâneas, inervações do folículo piloso e glândulas sebáceas. Alguns estudos mostram que a radiação UV penetra na pele e, dependendo do seu comprimento de onda, interage com diferentes tipos celulares localizados em diferentes camadas da pele (19).

Através da identificação das estruturas nervosas da pele, podemos obter um maior entendimento sobre as consequências da exposição UV crônica neste tecido. Por exemplo, num estudo recente envolvendo transplantes de pele em queimados, verificou-se uma redução na percepção sensorial do tecido transplantado associado com uma diminuição nas fibras nervosas deste tecido (5).

Com o desenvolvimento da técnica e o sucesso da identificação das fibras, podemos prever a evolução do quadro de regeneração, e visualizando possíveis reversões de dano. A possibilidade de comprovar uma possível relação entre dano celular provocado pela radiação e a ativação de genes envolvidos em respostas citotóxicas, como o p53, seriam de grande utilidade (19). Sabe-se que essas alterações estão diretamente ligadas ao envolvimento de mediadores químicos (neuropeptídeos) liberados pelas células nervosas, presentes na pele, após exposição crônica à radiação UV (2). A partir desses dados, seria interessante utilizar essa técnica para avaliar o grau de dano e, se possível, relacionar as demais substâncias envolvidas com aos processos patológicos que se desenvolvem.

Atendendo o segundo objetivo deste estudo, verificamos que a radiação UVA e UVB têm capacidade de destruição das fibras nervosas da pele. As mesmas

alterações foram observadas após exposição UVC (dados não apresentados). Os estudos anteriores, que investigaram os danos provocados pelas radiações UV, mostram alterações qualitativas na pele (eritema, foto-envelhecimento, câncer, entre outros). Neste estudo, padronizamos um método quantitativo para mensuração de dano nas estruturas nervosas da pele humana. Essas alterações mimetizam, em laboratório, os danos possivelmente observados durante exposição UV crônica natural ou artificial. Não sabemos o grau de envolvimento das terminações nervosas e seu efeito na participação de respostas celulares que envolvem sinalização. No entanto, sabemos que existe uma grande possibilidade de sua atividade através da liberação de substâncias no momento da injúria, o que poderia promover alterações moleculares, processos de dano, envelhecimento, câncer entre outros (18). Podemos citar alguns mecanismos envolvidos no dano, como ativação da via apoptótica de células danificadas pela radiação, a partir do acúmulo de p53 (19); o envelhecimento celular, que pode ser entendido pela exposição crônica à radiação, onde foram observadas alterações como espessamento da camada basal, distribuição irregular de melanócitos, dentre outros (22). A técnica desenvolvida poderia auxiliar a revelar se existe e qual o grau de envolvimento das fibras nervosas com os demais danos sofridos pela exposição crônica à radiação UV.

Como último objetivo do trabalho, descrevemos a capacidade neuroprotetora de cosméticos ao dano celular descrito após a exposição UV. A grande necessidade de se desenvolver produtos com capacidade neuroprotetora, ou mesmo substâncias que amenizem os efeitos das radiações, mostra-se cada vez maior pela crescente associação de doenças de pele à radiação UV. Os estudos até o momento avaliaram a capacidade de substâncias cosméticas e filtros solares na manutenção de um nível de umidade e suavidade da pele, cujos parâmetros foram indicativos

de diminuição de dano ao DNA (23). Outros estudos mostram os efeitos dos Fatores de Proteção Solar (FPS), na proteção contra eritema (18) e envelhecimento (24).

O nosso trabalho mostrou a eficácia da nova substância com proposição neuroprotetora, resultado esse que não pode ser observado com a substância FPS testada no presente estudo, mostrando que existe uma ação diferenciada do novo produto na proteção contra a radiação UV. Estudos posteriores deverão testar outros FPS da mesma categoria de proteção ou superior. O conhecimento do instrumento de quantificação e a observação dos danos causados pela radiação, quando há incidência direta, poderiam revelar diferentes aspectos bioquímicos e promover o descobrimento de novas estratégias de reparo ou tratamento de doenças relacionadas. Deve haver também incentivos por parte do governo, à indústria de cosméticos, para prospecção de produtos que contenham formulações que possam de alguma maneira proteger dos efeitos nocivos das radiações UV-A e UV-B. Seria interessante buscar a ampliação de nossos conhecimentos para aplicação da presente técnica, em estudos *in vivo*, cuja limitação, até o momento, envolve questões éticas e humanas.

A utilidade da técnica desenvolvida será de grande aplicabilidade para testes futuros em produtos com finalidade neuroprotetora da pele, que se propõem amenizar ou mesmo reverter os danos provocados pela radiação UV. A crescente incidência de doenças provocadas pela exposição à radiação UV em detrimento da degradação da camada de ozônio, induzem ao reconhecimento de que os dados obtidos no presente estudo são de grande relevância.

CAPÍTULO 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frederick JE, Snell HE. Ultraviolet Radiation Levels During the Antarctic Spring. *Science* 1988;241(4864):438-440.
2. Seiffert K, Granstein RD. Neuropeptides and neuroendocrine hormones in ultraviolet radiation-induced immunosuppression. *Methods* 2002;28(1):97-103.
3. Moura L. Padronização normal das fibras nervosas intraepidérmicas em 30 voluntários saudáveis com PGP 9,5. In: *Arq. Neuropsiquiatr*; 2004. p. 271-275.
4. Chien HF, Tseng TJ, Lin WM, Yang CC, Chang YC, Chen RC, et al. Quantitative pathology of cutaneous nerve terminal degeneration in the human skin. *Acta Neuropathol* 2001;102(5):455-61.
5. Nedelec B, Hou Q, Sohbi I, Choiniere M, Beauregard G, Dykes RW. Sensory perception and neuroanatomical structures in normal and grafted skin of burn survivors. *Burns* 2005;31(7):817-30.
6. McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 1998;55(12):1513-20.
7. Krauspe R, Schmitz F, Zoller G, Drenckhahn D. Distribution of neurofilament-positive nerve fibres and sensory endings in the human anterior cruciate ligament. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995;114(4):194-8.
8. Young B. *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000.
9. Waris T, Astrand K, Hamalainen H, Piironen J, Valtimo J, Jarvilehto T. Regeneration of cold, warmth and heat-pain sensibility in human skin grafts. *Br J Plast Surg* 1989;42(5):576-80.
10. Nielsen KP, Zhao L, Stamnes JJ, Stamnes K, Moan J. The importance of the depth distribution of melanin in skin for DNA protection and other photobiological processes. *J Photochem Photobiol B* 2006;82(3):194-8.

11. Townley SL, Grimbaldston MA, Ferguson I, Rush RA, Zhang SH, Zhou XF, et al. Nerve growth factor, neuropeptides, and mast cells in ultraviolet-B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Invest Dermatol* 2002;118(3):396-401.
12. Merwald H, Kokesch C, Klosner G, Matsui M, Trautinger F. Induction of the 72-kilodalton heat shock protein and protection from ultraviolet B-induced cell death in human keratinocytes by repetitive exposure to heat shock or 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2. *Cell Stress Chaperones* 2006;11(1):81-8.
13. Tyrrell RM. Role for singlet oxygen in biological effects of ultraviolet A radiation. *Methods Enzymol* 2000;319:290-6.
14. Gilchrest BA, Eller MS. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999;4(1):35-40.
15. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994;372(6508):773-6.
16. Hennessy A, Oh C, Rees J, Diffey B. The photoadaptive response to ultraviolet exposure in human skin using ultraviolet spectrophotometry. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005;21(5):229-33.
17. Del Bino S, Sok J, Bessac E, Bernerd F. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Res* 2006;19(6):606-14.
18. Jung K, Seifert M, Herrling T, Fuchs J. UV-generated free radicals (FR) in skin: Their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2007.
19. Backvall H, Wassberg C, Berne B, Ponten F. Similar UV responses are seen in a skin organ culture as in human skin in vivo. *Exp Dermatol* 2002;11(4):349-56.

20. Mori E, Takahashi A, Kitagawa K, Kakei S, Tsujinaka D, Unno M, et al. Time Course and Spacial Distribution of UV Effects on Human Skin in Organ Culture. *J Radiat Res (Tokyo)* 2008.
21. Gilchrest BA, Blog FB, Szabo G. Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *J Invest Dermatol* 1979;73(2):141-3.
22. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photo-dermatol Photoimmunol Photomed* 2000;16(6):239-44.
23. Cheng Y, Dong YY, Dong MX, Wang C, Su N, Sun YT, et al. Protection effect of cosmetics on human skin under simulated rigorous environment. *Skin Res Technol* 2008;14(1):45-52.
24. Legat FJ, Wolf P. Photodamage to the cutaneous sensory nerves: role in photoaging and carcinogenesis of the skin? *Photochem Photobiol Sci* 2006;5(2):170-6.