

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS -
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Interação entre as radiações infravermelha e ultravioleta em células melanocíticas

Biol. Aline Portantiolo Lettnin

Dissertação defendida no âmbito do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas- Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de MESTRE em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada.

Orientadora: Profa Dra Gilma Santos Trindade

Co-orientadora: Profa Dra Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira

RIO GRANDE
MARÇO DE 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao laboratório de Oncologia Experimental da USP e a Gildeíde pelo envio da linhagem melan-a.

Agradeço aos professores do ICB, PPGFAC e demais que me acompanharam e contribuíram para minha formação até aqui, e aos demais que ainda virão.

Agradeço à Maria e demais funcionários, pela disposição e manutenção do prédio da fisiologia.

Agradeço aos Técnicos, pela manutenção dos laboratórios organizados para o desenvolvimento dos nossos trabalhos, mas principalmente por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agradeço ao pessoal da salinha 2, pelo convívio diário, conversas, amizades e muitas risadas, resumindo, a melhor salinha da fisiologia! Também, aos colegas das demais salinhas, pelas trocas de experiências e conversas tanto em aulas como nos laboratórios.

Agradeço à Camila, Flávio e Ronan pela ajuda durante os experimentos e análises do cometa. Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agradeço à Camila, Mari, Ju e Fabi, que me acompanharam durante o mestrado em diferentes períodos e fases. Obrigada pelo comprometimento, carinho e amizade, a companhia e ajuda de vocês foi fundamental.

Agradeço à Bruna e à Ju, minhas professoras do inglês. Obrigada pelo carinho, atenção, paciência e por serem ótimas professoras, adoro vocês!

Agradeço à banca (Vinícius), por aceitar o convite, por ter vindo de tão longe e por, indiretamente, contribuir com este trabalho.

Agradeço ao Márcio, pelo carinho de sempre, pelo abraço de “urso”, pelas risadas, conversas, por orientações indiretas e por sempre perguntar “como estão as coisas?” Obrigada por ser esse amigão sempre presente, te admiro muito!

Agradeço à Ana, pelo carinho, apoio, orientações fora de hora, quando invadia a sala com alguma dúvida, sempre disposta a me ajudar. Obrigada por ter me escutado tantas vezes quando não sabia para onde correr, e por me incentivar a ser aluna do programa, lá no começo, lembra? És uma pessoa admirável, é uma honra poder trabalhar contigo.

Agradeço à Gilma, a nossa querida orientadora, o que seria do grupo sem tu Gilma? És a base e exemplo de profissional para todos nós. Obrigada pelo apoio, carinho, pela confiança, pelas palavras incentivadoras, por estar sempre presente, mas principalmente pelo teu coração enorme, sempre aberto para nos acolher em todos os momentos. Obrigada de coração!

Agradeço à Daza, que caminhou ao meu lado desde o começo. Obrigada pelo carinho, compreensão, paciência e dedicação, por me ajudar diariamente em tudo, desde os experimentos, análises, correções de escrita, leituras. Pelas conversas abertas, por me receber na tua casa para trabalhar e conversar, por ficar online na madrugada, por me dar força para ficar horas, dias e finais de semana em experimento, por me incentivar e confiar no meu trabalho. Não tenho palavras para te agradecer, te admiro muito. Mas te agradeço principalmente por me deixar “quebrar a cabeça”, aprendi muito dessa forma!

Agradeço à Maiara e Renatinha, minhas amigas queridas. Vocês estiveram presentes desde o começo, este caminho não teria sido o mesmo sem vocês. A Renatinha por me ensinar a cuidar das células como ninguém, pelas conversas e boas risadas, mesmo longe continuas sempre presente. À Mai, pelo carinho, pelo sorriso acolhedor, pela grande cumplicidade desde 2008, deve ser de outras vidas né! Tantos anos que passaram tão rápido, mas nada mudou. Amo vocês!

Agradeço ao Sergio, meu companheiro, obrigada por todo incentivo e paciência, nada foi tão valioso quanto a tua compreensão e dedicação nestes últimos meses. Com certeza sozinha não seria possível. Te amo!

Agradeço à minha família, por toda base que recebi, desde meus avós maternos, irmã de criação, mas em especial minha mãe. Obrigada por sempre lutar por nós, pelas orações, pela preocupação, por me ensinar a andar sozinha desde sempre, enfim, por tudo. À minha irmã, que mesmo distante sempre esteve torcendo por mim e dizendo que sou capaz. Ao meu pai de criação, pelo apoio em todas as horas, e principalmente por ter me incentivado a estudar na FURG. Amo muito vocês!

Agradeço a DEUS, por último no texto, mas em primeiro lugar sempre. Por ter iluminado toda a minha caminhada como estudante e aprendiz da vida, por ter me dado forças para chegar até aqui.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO GERAL	8
INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
Artigo.....	26
Portecitve Effect of Infrared-A Against Damages Induced by UVB in Melan-a Cell Line.....	27
ABSTRACT	28
INTRODUCTION	29
MATERIALS AND METHODS	31
<i>Cells and culture condition</i>	31
<i>UVA, UVB and Infrared Lamps</i>	31
<i>Exposure of cells with UVA, UVB and IR radiation</i>	32
<i>Exposure of cells with interaction between IRR and UVA or UVB</i>	32
<i>Cell Viability</i>	33
<i>MTT assay</i>	33
<i>Trypan blue assay</i>	33
<i>Oxidative effects and DNA damage</i>	34
<i>Capaciy of induce DNA damage</i>	34
<i>Determination of lipid oxidative damage</i>	35
<i>Assessment of intracellular level of reactive oxygen specie</i>	35
<i>Response of the antioxidant defense system.</i>	36
<i>Statistical analysis</i>	36
RESULTS AND DISCUSSION	37
Acknowledgement	43
REFERENCES	44
Table 1	51
Figure 1	52
Figure 2	53
Figure 3	54
Figure 4	55
Figure 5	56
Figure 6	57
DISCUSSÃO GERAL	58
Referências	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAP	Capacidade antioxidante contra radicais peroxil
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	“Bcl-2 associated X protein”
Bcl2	“B-cell lymphoma protein 2”
BCL-XL	“B-cell lymphoma-extra large”
BRAF	“v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B”
CAT	Enzima Catalase
C57BL	Embrião de camundongo
DCFH	2,7-Diclorodihidrofluoresceína
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FLIPL	“FLICE-like inhibitory protein”
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GST	glutaciona s-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
•HO ₂	Radical hidroperoxil
LED	Diodos emissores de luz
LPO	Peroxidação lipídica
Melan-a	Linhagem de melanoblastos epidérmicos normais
NO	Óxido Nítrico
•OH	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito

O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
RAC1	“RAS-related C3 botulinum substrate 1”
RAS	“Member RAS oncogene Family”
RIV	Radiação infravermelha
RIV-A	Radiação infravermelha A
RIV-B	Radiação infravermelha B
RIV-C	Radiação infravermelha C
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β1	“Transforming growth factor-β1”
UV	Radiação Ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C

RESUMO GERAL

Por muitos anos, pesquisas foram desenvolvidas para esclarecer o impacto da radiação ultravioleta (UV) sobre a saúde humana, por esta ser considerada a radiação solar mais nociva e mutagênica do espectro eletromagnético não ionizante. Posteriormente foi observado dentre as demais radiações solares, que a radiação infravermelha (RIV) também poderia causar efeitos biológicos sobre a pele humana. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a pré-exposição à RIV atérmica pode causar um efeito protetor dos danos citotóxicos causados pela UV, em uma linhagem celular melanocítica, melan-a. A partir deste propósito, foi analisada a proliferação e viabilidade celular após exposição à radiação ultravioleta A (UVA), radiação ultravioleta B (UVB), RIV e interação RIV com UVA ou UVB, a capacidade de causar danos no DNA, peroxidação lipídica, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante total. Para exposição à radiação UVA foram utilizadas as doses $0,2 \text{ J/cm}^2$; $0,4 \text{ J/cm}^2$; $0,8 \text{ J/cm}^2$; $1,2 \text{ J/cm}^2$ e $1,6 \text{ J/cm}^2$ para teste com MTT; $0,8 \text{ J/cm}^2$; $1,2 \text{ J/cm}^2$; $1,6 \text{ J/cm}^2$; $2,0 \text{ J/cm}^2$ e $2,4 \text{ J/cm}^2$ para teste com azul de trypan. Para exposição à radiação UVB foram utilizadas as doses $0,005 \text{ J/cm}^2$; $0,01 \text{ J/cm}^2$; $0,015 \text{ J/cm}^2$; $0,03 \text{ J/cm}^2$ e $0,05 \text{ J/cm}^2$ e para RIV-A as doses $0,8 \text{ J/cm}^2$; $1,6 \text{ J/cm}^2$; $2,5 \text{ J/cm}^2$; $3,3 \text{ J/cm}^2$ e $4,2 \text{ J/cm}^2$. Os resultados mostram que a radiação UVA, UVB e RIV foram capazes de inibir a proliferação e alterar a viabilidade de forma dose e tempo dependentes. Para os experimentos com interação, foram escolhidas as doses $1,2 \text{ J/cm}^2$ de UVA, $0,015 \text{ J/cm}^2$ de UVB e $0,8 \text{ J/cm}^2$ de RIV. A dose de UVA escolhida induziu proliferação celular, a dose de UVB inibiu proliferação celular, enquanto que a dose de RIV não alterou a proliferação celular. Na interação com a radiação UVA, a pré-exposição à RIV não foi capaz de diminuir a proliferação celular induzida pela radiação UVA, em todos os tempos analisados. Já na interação com a radiação UVB, a pré-exposição à RIV foi capaz de estimular a

proliferação celular 24 horas após a exposição, porém este efeito foi perdido nos demais tempos analisados. Desta forma, as análises de danos celulares e estresse oxidativo foram realizadas para interação entre RIV e UVB nos tempos 0, 24 e 48 horas após a exposição. A pré-exposição à RIV protegeu as células dos danos no DNA e peroxidação lipídica induzidos por UVB. Os danos no DNA foram protegidos em 0 e 24 horas após irradiações e a peroxidação lipídica foi protegida em todos os tempos. Esta proteção possivelmente não esteve relacionada ao estresse oxidativo observado, uma vez que houve o desbalanço entre produção de ERO e sistema de defesa antioxidante 24 e 48 horas após a exposição. Sendo assim, a RIV atérmica protegeu os melanócitos não tumorais (melan-a) dos danos causados pela exposição à radiação UVB e ainda, sugere-se a necessidade de reexposições a RIV para manter o efeito protetor desta radiação.

INTRODUÇÃO GERAL

Radiação Ultravioleta

Entre as faixas de radiação solar que atingem a superfície da terra encontram-se a radiação ultravioleta (UV), a luz visível e a radiação infravermelha (RIV) (Lee & Roque, 2002; Schroeder e colaboradores, 2008). Os efeitos biológicos da radiação UV podem variar de acordo com o comprimento de onda, sendo dessa forma dividida em três regiões do espectro solar, UVA (320-400nm), UVB (280-320nm) e UVC (200-280nm) (Diffey, 2002; Pfeifer et al., 2005; Kanavy & , 2011; Cadet et al., 2012).

A exposição excessiva ao sol é considerada o principal fator de risco ambiental para o envelhecimento precoce da pele (Kim et al., 2005) e para o desenvolvimento do câncer da pele (Kanavy & Gerstenblith, 2011). A radiação UV é conhecida como a mais nociva e mutagênica do espectro eletromagnético de radiação solar. Essa característica é decorrente da capacidade da molécula de DNA absorver fótons de energia emitidos pela radiação UVB e pela radiação UVA também apresentar características citotóxicas e mutagênicas (Ravanat et al., 2001).

A radiação UV que chega à superfície da terra é de aproximadamente 90-95% UVA e 5-10% UVB, sendo a radiação UVC barrada pela camada de ozônio na estratosfera (Narayanan et al., 2010). Porém, a destruição desta camada tem sido um fator agravante para o desenvolvimento do câncer da pele, devido ao aumento da incidência da radiação UVB na superfície da terra, resultando em efeitos nocivos à saúde (Norval et al., 2011).

Os raios UVB são absorvidos principalmente por células da epiderme superior e a radiação UVA pode penetrar profundamente na derme interagindo com os queratinócitos, fibroblastos e melanócitos. No entanto, no processo de pigmentação celular, tanto a radiação UVA como a radiação UVB são responsáveis pelo efeito tardio

da síntese de melanina (Kadarko et al., 2003) podendo sugerir, dessa forma, que os efeitos da radiação UVB atinjam camadas basais da pele de forma indireta. Ademais, considerando o DNA como alvo celular, quanto menor o comprimento de onda maior será o efeito biológico sobre o organismo, sendo dessa forma a radiação UVB considerada mais prejudicial para a pele do que a radiação UVA (Birch-Machin & Swalwell, 2010).

Em aspectos clínicos, a radiação UVB é a principal responsável pelas queimaduras solares, podendo causar eritema, pigmentação, alterações que induzem ao câncer da pele, além de estimular a produção do hormônio α -MSH que regula a síntese de melanina nos melanócitos. Ao mesmo tempo, a radiação UVA é a principal indutora da fotossensibilidade, induzindo pigmentação, alterações cancerígenas e eritema, o qual surge mais tardiamente, podendo tornar-se gradualmente mais intenso (Miot et al., 2009).

Os efeitos adversos da radiação UV sobre a saúde podem ser observados após contato direto com a superfície corpórea, sendo os olhos e a pele os principais alvos. O desenvolvimento do melanoma ocular é menos frequente quando comparado ao câncer da pele. O câncer da pele pode ser considerado o resultado mais nocivo após exposição à radiação UV, devido o desenvolvimento do melanoma e dos tipos não melanoma, como carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas (Norval et al., 2011).

A pele é a primeira forma de defesa e proteção de um organismo contra agentes externos, sendo a radiação UV um dos principais fatores ambientais que influencia na função, sobrevivência e proliferação de diversos tipos celulares (Kadarko et al., 2003).

Os efeitos da radiação UV nos organismos (Fig. 1) podem ser observados após a absorção pelos cromóforos, componentes celulares ou moleculares com um espectro de absorção que interagem com determinado comprimento de onda (Baron & Suggs,

2014). Para radiação UVB, a molécula de DNA é o principal cromóforo, já para os raios UVA, as moléculas alvo preferenciais são as membranas biológicas. Contudo, a radiação UVA pode resultar em danos no DNA por ação indireta, através da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), resultantes de moléculas intermediárias, como a água, após serem expostas à radiação UV (Darr & Fridovich, 1994; Kozma & Eide, 2014).

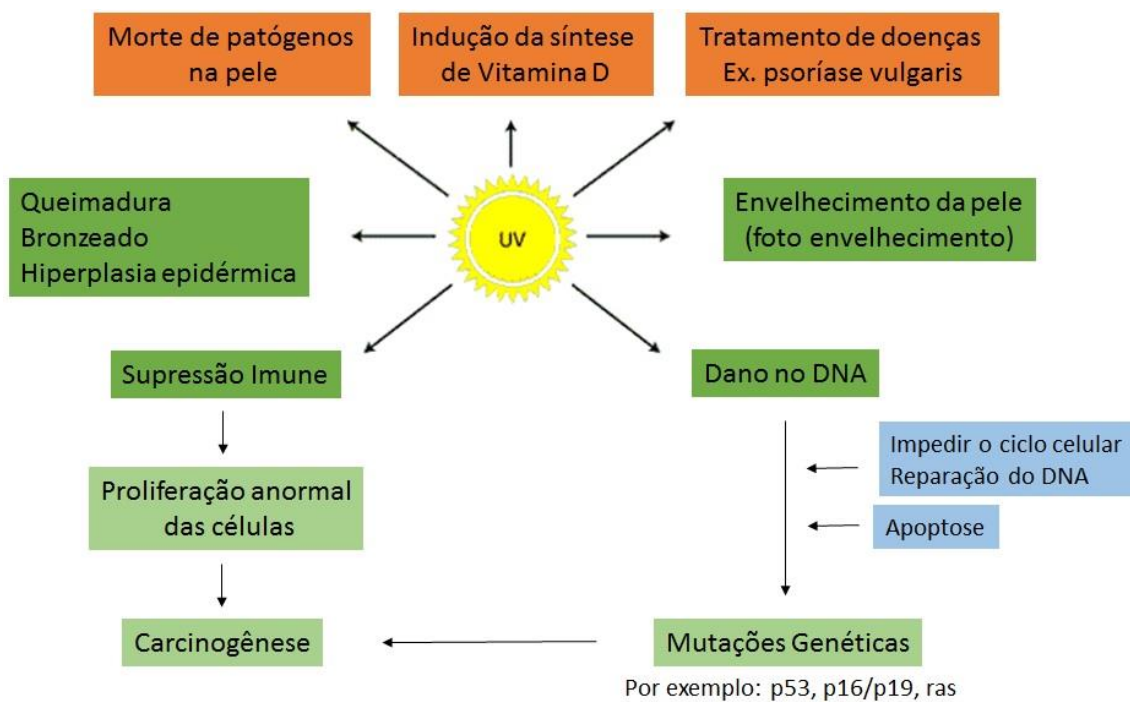


Fig. 1 Efeitos da radiação UV nos organismos

Adaptado de: <http://www.healthyfellow.com/220/skin-aging-and-ellagic-acid/>

Danos resultantes na molécula de DNA podem ser reparados pela proteína P53 sintetizada pelo gene supressor de tumor p53 com atuação direta na reparação celular, apoptose e parada do ciclo celular. Este processo de dano pode decorrer da ação direta ou indireta da radiação UV no DNA, sendo o principal dano a formação de dímero de

pirimidina (Kozma & Eide, 2014) e fotoprodutos pirimidona (6-4) pirimidina (Swalwell e colaboradores, 2012). Em Huang e colaboradores (2009) foi observado, em experimentos utilizando um modelo semelhante à pele humana, que tanto a radiação UVA como a radiação UVB podem induzir mutação no gene p53 em queratinócitos, a partir da exposição a doses semelhantes à UV solar, conferindo as radiações UVA e UVB um importante papel carcinogênico.

Quando expostas a radiação UV, as células da pele ativam diferentes vias de sinalização como forma de defesa. A produção de ERO é um dos principais mecanismos de resposta molecular da pele em exposição a esta radiação (Fischer et al., 2002). ERO são moléculas químicas produzidas pelo metabolismo energético dependente de oxigênio e são conhecidas como radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$), oxigênio singlete, ozônio e peróxidos lipídicos (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002).

Na maioria dos organismos aeróbicos, de 85 a 90% do oxigênio consumido pela mitocôndria é utilizado para produção de energia. Porém, produtos do metabolismo oxidativo podem causar danos aos organismos, principalmente pela oxidação de componentes celulares. A geração de ERO pode induzir modificações químicas em outras moléculas, gerar dano oxidativo e ainda, agir como um segundo mensageiro em vias de transdução de sinal (Pamplona & Constantini, 2011).

A formação de ERO tem início através da redução de um elétron da molécula de oxigênio, o que resulta na produção de $O_2^{\cdot -}$, o qual é o precursor da maioria das ERO e um mediador de reações oxidativas em cadeia. Naturalmente ou por reações catalisadas pela superóxido dismutase (SOD), o $O_2^{\cdot -}$ sofre dismutação resultando na produção de H_2O_2 , que pode ser parcialmente reduzido a $\cdot OH$ ou totalmente reduzido a água (Turrens, 2003). Além da formação do H_2O_2 , o $O_2^{\cdot -}$ pode reagir com o NO produzindo

ONOO⁻, o qual é capaz de oxidar moléculas biológicas como DNA, RNA, proteínas e lipídios. As reações a partir do NO geram oxidantes denominados espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Pamplona & Constantini, 2011).

Em sistemas biológicos, o [•]OH também pode ser formado por ciclos redox pelas reações de Fenton (Haber-Weiss), em que metais como o ferro e outros metais de transição podem ser responsáveis pela formação deste radical. Outra via importante é do radical hidroperoxil ([•]HO₂), o qual representa a forma protonada dos superóxidos e pode formar H₂O₂, o qual pode reagir com metais como ferro e cobre gerando ainda mais [•]OH (Ayala et al., 2014).

O processo da peroxidação lipídica nas membranas biológicas pode ter início a partir do [•]OH, assim como na oxidação e dano de proteínas, lipídios, DNA e DNA mitocondrial. Assim como este radical, moléculas intermediárias reativas ao oxigênio também podem desencadear este processo, como: hidroperóxidos de alquil (LOOH), radicais peroxil alquílicos (LOO[•]) e radicais alcoxil (LO[•]). Os LOOH não são radicais, mas são instáveis na presença de metais de transição, enquanto os LO[•] são espécies reativas e participam diretamente na propagação da peroxidação lipídica (Hermes-Lima, 2004).

O desequilíbrio na produção destas moléculas como ERO e ERN ativa o sistema de defesa antioxidante (Birch-Machin & Swalwell, 2010) formado por compostos responsáveis pelo mecanismo de defesa, como pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona s-transferase (GST) e por compostos não enzimático como, pela glutatona (GSH), ubiquinona, ácido úrico, vitamina E, entre outros. Porém, quando a alta produção de ERO ou ERN é capaz de exceder a capacidade antioxidante, resulta em estresse oxidativo (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002).

Adicionalmente, ERO podem induzir diversos danos à célula, como ativação de complexas vias de sinalização, indução da matriz de metaloproteinases, e degradação ou inibição da síntese do colágeno da matriz extracelular nos tecidos conjuntivos (Oh et al., 2004). De acordo com Peres e colaboradores (2011), a radiação UVB é um dos principais agentes cancerígenos para a saúde humana, devido a sua capacidade de estimular a produção de ERO. Da mesma forma, a radiação UVA induz a produção de ERO no meio intracelular, sendo os principais, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete (Pirev et al., 2008), os quais podem causar danos no DNA (Pfeifer et al., 2005).

Uma das formas naturais de proteção da pele é a síntese da melanina, um pigmento que desempenha papel importante como agente fotoprotetor contra os efeitos prejudiciais da radiação UV (Rouzaud et al., 2005). Embora a proteção seja importante, a produção de melanina torna as células sensíveis a ERO, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Meierjohann, 2014). Smit e colaboradores (2008) observaram, em experimentos com cultivo primário de melanócitos humanos, que a síntese de melanina esteve associada ao acúmulo de ERO intracelular, sendo este aumento de ERO capaz de induzir a redução do antioxidante glutathiona (GSH). De acordo com Jenkins & Grossman (2013), o aumento nos níveis de ERO intracelular pode tornar as células mais sensíveis ao desenvolvimento do melanoma.

ERO apresentam um papel importante como reguladores da sinalização celular, modulando processos biológicos como proliferação e apoptose. No entanto, alterações nos níveis de ERO podem afetar mecanismos epigenéticos, resultando na progressão de tumores e transformação maligna (Molognoni et al., 2013). Em estudos realizados *in vitro* por Campos e colaboradores (2007), com uma linhagem não tumoral de melanócitos murinos, foi observado, após indução de bloqueio de ancoragem, um aumento dos níveis de glutathiona, óxido nítrico e ERO intracelular.

O aumento nos níveis de ERO pode resultar em alterações nos níveis de metilação do DNA, processo este capaz de contribuir diretamente para o desenvolvimento de fenótipos de resistência, uma característica de tumores que adquirem resistência a drogas que podem ou não ter relação química e ou estrutural com aquelas as quais inicialmente respondiam durante a quimioterapia (Gottesman & Pastan, 1993).

Câncer da pele

Diversos estudos têm sido realizados avaliando os efeitos das radiações não ionizantes para saúde humana, em especial à radiação UV. Dentre os efeitos benéficos podemos ressaltar a produção de vitamina D. Já considerando os efeitos maléficos para a saúde, a radiação UV é considerada um dos fatores predominantes para o desenvolvimento do câncer da pele (Noonan et al., 2012; Swalwell et al., 2012; Wang et al., 2014). Além da radiação UV, a exposição a diversos fatores ambientais e a predisposição genética são considerados fatores de risco para o desenvolvimento desta doença (Jhappan et al., 2003).

Como abordado anteriormente, a pele apresenta um importante papel na proteção do corpo com relação a estressores externos, sendo formada pela derme localizada logo abaixo da epiderme, e por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, folículos pilosos e glândulas sudoríparas (Juzeniene et al., 2011). Ademais, a pele é composta de uma variedade de células, sendo três tipos principais: os queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans. Os queratinócitos, presentes em maior número, são responsáveis por formar uma barreira mecânica; as células de Langerhans participam da defesa imune e inflamatória, enquanto os melanócitos formam uma barreira bioquímica (Nordlund, 2007).

Os melanócitos são caracterizados pela capacidade de produzir melanina, um pigmento que fornece coloração à pele e proteção dos danos causados pela radiação UV. A melanina sintetizada pelos melanócitos permanece no interior de organelas denominadas melanossomas, sendo transferidas para os queratinócitos adjacentes (Juzeniene et al., 2011). Contudo, como dito anteriormente, apesar de exercer uma função importante, a síntese de melanina torna os melanócitos sensíveis a ERO, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical superóxido (O_2^-) (Meierjohann, 2014).

Os processos de desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de câncer têm sido explicados pela influência de fatores externos e mecanismos internos, estudados pela oncogênese de cada tipo tumoral. No que se refere ao melanoma, a transformação de melanócitos normais em células cancerígenas pode ocorrer pela ativação de vias estimuladoras de crescimento, e inativação de vias apoptóticas e supressoras tumorais (Polsky & Cordon-Cardo, 2003); pelos genes RAS e RAC1 (Hodis et al., 2012; Molognoni et al., 2013) e pelo gene BRAF, que controla vias de sinalização de proliferação e diferenciação celular (Sharma et al., 2012).

A classificação do câncer da pele do tipo melanoma está de acordo com a sua localização e estágio de progressão. O melanoma in situ permanece na epiderme, apresentando padrão de crescimento radial. No entanto, o melanoma invasivo, considerado o tipo de câncer da pele mais agressivo é caracterizado por uma fase de crescimento vertical, desempenhando um alto potencial de metástase (Elder, 1987), devido a sua agressividade e resistência a terapias (Miller & Mihm, 2006).

A capacidade metastática de uma célula é caracterizada pela mudança na adesão entre as células e a matriz celular, migração, e invasão através da matriz e através da circulação sanguínea (Lee et al., 2006). A utilização de linhagens celulares com

diferentes capacidades invasivas é uma ferramenta propícia para auxiliar na evolução dos estudos sobre o câncer da pele.

Dentre estas linhagens estudadas, a linhagem denominada B16F0 apresenta excessiva produção de melanina, possibilitando elucidar processos como melanogênese e mecanismos regulatórios da proliferação celular (Pinon et al., 2011). Já a linhagem B16F0, devido ao seu potencial metastático, tem sido amplamente estudada em pesquisas sobre o câncer da pele (Carvalho et al., 2013).

Já para estudo do desenvolvimento do melanoma, desenvolveu-se uma linhagem de melanóticos denominada melan-a, originada da pele de ratos embrionários chamados C57BL. Esta linhagem apresenta singularidades de melanócitos normais, por ser diplóide e não tumorigênica podendo ser utilizada para estudos comparativos *in vitro* e *in vivo* com sub-linhagens de melanoma (Bennet et al., 1987).

Radiação Infravermelha (RIV)

Por muitos anos, pesquisas foram desenvolvidas para esclarecer o impacto da radiação UV sobre a saúde humana, devido alguns efeitos como: queimaduras solares, reações fototóxicas e fotoalérgicas, fotoenvelhecimento e câncer da pele. Posteriormente foi observado, dentre as demais radiações solares, que a RIV também poderia causar efeitos biológicos sobre a pele humana (Jantschitsch et al., 2009).

No espectro eletromagnético, para vários autores, a RIV abrange os comprimentos de onda de 760 nm a 1 mm (Fig.2) sendo subdividida em três regiões: RIV-A (IV perto, 760-1400nm), RIV-B (IV médio, 1400-3000nm), e RIV-C (IV longo 3000nm-1mm) (Schroeder et al., 2008; Cho et al., 2009).

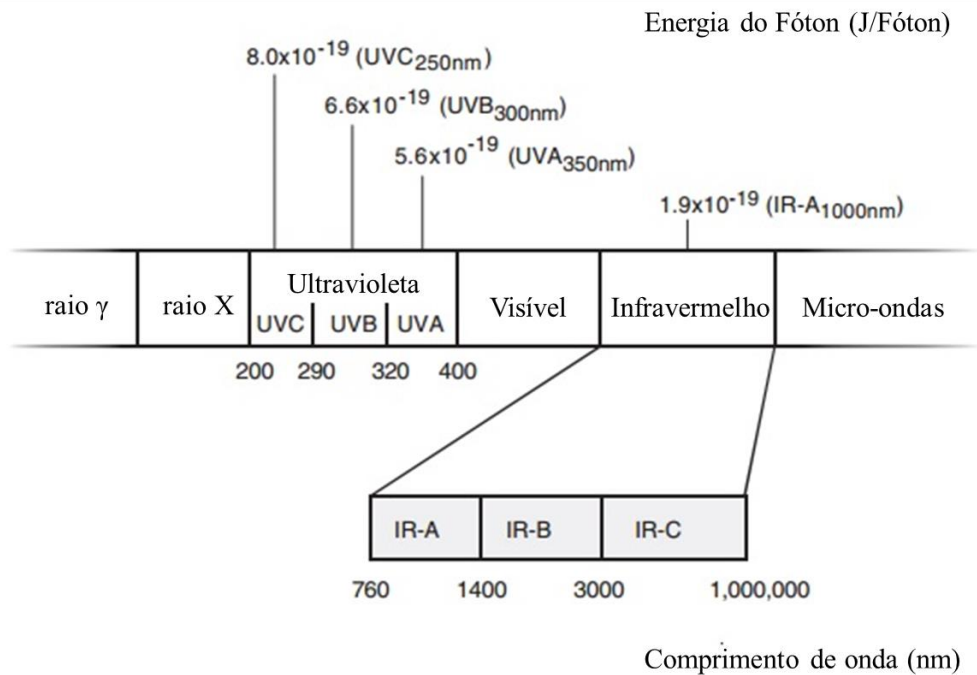


Fig. 2 Espectro eletromagnético classificado em diferentes regiões espectrais, como raios-X, RUV, luz visível e RIV.

Adaptado de Schieke e colaboradores, 2003

Os raios infravermelhos ao penetrarem na pele atingem tecidos subcutâneos dependendo do comprimento de onda (Fig. 3). A RIV-A penetra nas camadas da epiderme e derme atingindo tecidos subcutâneos sem aumentar significativamente a temperatura da pele. Já RIV-B e RIV-C são absorvidas principalmente na camada da epiderme, aumentando significativamente a temperatura da pele resultando na sensação térmica (Schieke et al., 2003).

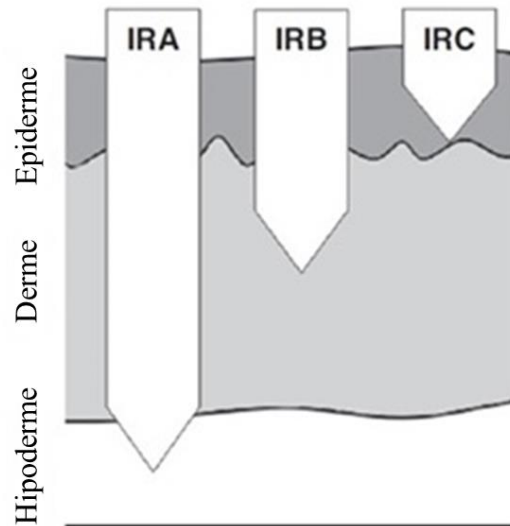


Fig. 3 Absorção da RIV na pele de acordo com o comprimento de onda

Adaptado de Schroeder & Krutmann, 2011

A pele humana é constantemente exposta à RIV emitida pela luz solar natural, da qual corresponde 54% da energia irradiada, enquanto a radiação UV corresponde a apenas 7% (Kochevar et al., 2008). Alguns efeitos biológicos podem ser observados na pele humana após exposição a esta radiação, os quais podem estar associados a mecanismos moleculares (Schieke et al., 2003) como na modulação de equilíbrio dos genes Bcl2/Bax, inibindo apoptose; ativação de genes como o p53 (Schroeder et al., 2008); estímulo na síntese de colágeno, elastina e fator de crescimento TGF- β 1, auxiliando na cicatrização de feridas (Toyokawa et al., 2003) ou na redução do fotoenvelhecimento (Lee et al., 2006).

Estudos iniciais mostram os efeitos da RIV no tratamento de tecidos lesionados, como no estímulo da cicatrização de feridas (Danno et al., 2001), redução de hiperqueratose, deslocamento da epiderme, vacuolização e degeneração da epiderme em na pele de ratos após exposição à RIV-A e interação com a radiação UVB (Gonzalez et

al., 2015), assim como, na eficiência no tratamento de pacientes com artrite reumatoide (Yokoyama & Oku, 1999).

Em mamíferos, há três moléculas fotoreceptoras capazes de absorver a luz na faixa da RIV curta: hemoglobina, mioglobina e citocromo c oxidase (Wong-Riley et al., 2005). A absorção desta radiação pela citocromo c oxidase induz o aumento da transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, estimulando o metabolismo energético pela produção de energia. Este processo final resulta na geração de radicais livres, os quais desencadeiam uma cascata de eventos moleculares secundários que ajudam na reparação de danos gerados nas células e tecidos (Chung et al., 2012).

Segundo Continenza e colaboradores (1993), o efeito genoprotetor da RIV às células é dependente do número de vezes que as células são pré-expostas a esta radiação, não sendo influenciado pelo tempo de exposição ou intensidade da radiação, sem uma relação dose-dependente. Em células animais, a interação entre duas radiações pode resultar em um efeito sinérgico, em que a pré-exposição a um determinado comprimento de onda pode amenizar ou intensificar os efeitos de um segundo comprimento de onda. Em Lage e colaboradores (2000), a pré-exposição com lâmpada térmica de RIV na dose 162 J/cm^2 em temperaturas controladas, induziu um aumento na sobrevivência de células de *Escherichia coli* posteriormente expostas à radiação UV, possivelmente por indução de choque térmico. O mesmo foi observado quando pré-irradiado com a dose 18 J/cm^2 de luz visível, sugerindo que a resistência celular ocorreu devido a receptores celulares específicos desta radiação.

Em contrapartida, a exposição da RIV-A com lâmpadas térmicas pode apresentar efeitos diversos. Em experimento com variação de temperatura, células de fibroblasto in vitro não apresentaram danos quando expostas de 37° a 40°C , porém um

grande número de células apoptóticas foi observado após exposição à temperatura de 42° a 45°C de RIV-A (Knels et al., 2012).

O efeito protetor da RIV também pode ser observado em experimentos in vivo com lâmpadas atérmicas. Em modelos de ratos induzidos ao Parkinson, a exposição à lâmpada LED (diodos emissores de luz) de RIV-A possibilitou um efeito neuroprotetor por estimular a atividade do citocromo c oxidase, aumentar a síntese de ATP, reduzir o número de células em apoptose e reduzir os níveis de ERO e ERN (Liang et al., 2008). Para Johnstone e colaboradores (2014) o efeito neuroprotetor da RIV-A LED também pode ocorrer por estímulo direto de células danificadas ou por estímulo indireto de mediadores circulantes, os quais induzem a transdução de efeitos protetores para o cérebro.

Respostas semelhantes podem ser observadas na espécie de planária *Dugesia tigrina*. Após exposição à RIV-A LED, foi observado um aumento na atividade mitótica de células-tronco, o que estimula a proliferação celular e possibilita uma rápida regeneração de tecidos danificados (Wu & Persinger, 2011).

Ainda, em experimentos in vitro realizados com fibroblastos epiteliais humanos, a pré-exposição à RIV com controle de temperatura, resultou na proteção dos efeitos citotóxicos causados pelas radiações UVA e UVB (Menezes et al., 1998), não sendo resultante da divisão celular, da inibição da peroxidação lipídica ou da síntese de novas proteínas. Para Frank e colaboradores (2006) este efeito pode estar associado à inibição parcial da ativação das caspases 3 e 9, tornando as células resistentes à apoptose. O mesmo pode ser observado por Jantschitsch e colaboradores (2009), em que a pré-exposição à RIV em queratinócitos de murino estimulou proteínas anti-apoptóticas como FLIPL, BCL-XL e pró-apoptóticas como BAX, reduzindo os danos no DNA e a taxa de apoptose.

Lâmpadas LED

A principal fonte da RIV é o sol, porém fontes artificiais são desenvolvidas e utilizadas para fins terapêuticos, como por exemplo, a terapia fotodinâmica (Schroeder et al., 2008).

A luz artificial foi desenvolvida, principalmente, para iluminação de ambientes internos, sendo transmitida por lâmpadas incandescentes, fluorescentes e LEDs (Song et al., 2012). Os LEDs são dispositivos semicondutores que permitem a passagem da corrente elétrica em apenas um sentido, sendo essa polarização direta resultante da emissão de luz (Pinto, 2008).

As lâmpadas LED, assim como os raios laser, são utilizadas em pacientes para o tratamento de feridas, porém as lâmpadas LED não resultam em prejuízos térmicos pela ausência da produção de calor, sendo seus efeitos bem tolerados por tecidos biológicos (Wong-Riley et al., 2005).

Os efeitos das lâmpadas LED em organismos vivos ocorrem devido à absorção dos fótons por cromóforos ou fotorreceptores moleculares, como porfirinas, flavinas, ou ainda por outras formas de absorção de luz como a mitocôndria e a membrana celular. Porém, os efeitos biológicos dependem de parâmetros da irradiação, tais como comprimento de onda, dose, intensidade (densidade de potência ou irradiância), tempo de irradiação (tempo do tratamento), modo pulsado ou contínuo de onda e padrões de pulsação (Barolet, 2008).

Dentre as radiações não ionizantes, os comprimentos de onda vermelho e infravermelho curto (RIV-A) penetram mais facilmente nos tecidos (Agrawal et al., 2014), o que pode ser observado pela capacidade da transdução de sinal de lâmpadas LED em aumentar a proliferação e migração celular (particularmente em fibroblastos), níveis de citocinas (interleucinas, fator- α de necrose tumoral), fatores de crescimento e

mediadores inflamatórios, e aumento de proteínas antiapoptóticas (Hamblin & Demidova, 2006).

Assim, ampliar os estudos sobre RIV em conjunto com as potencialidades das lâmpadas atérmicas, LED, possibilitaria novos conhecimentos sobre diferentes processos celulares em resposta a esta exposição, bem como compreender as diferentes respostas de um organismo na ausência do calor, uma vez que não há uma distinção clara entre os efeitos da radiação ou do calor emitido pela lâmpada.

Dessa forma, considerando os efeitos benéficos da RIV em modelos biológicos *in vivo* e *in vitro* e os efeitos das radiações UV para os organismos, torna-se evidente a necessidade de estudos que ampliem o conhecimento sobre os efeitos da RIV, assim como o uso das lâmpadas LED em organismos, como, por exemplo, na linhagem celular melan-a.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar o possível papel protetor da RIV contra danos causados pela radiação UV em melanócitos não tumorais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a proliferação da linhagem melanocítica não tumoral (melan-a) exposta a diferentes doses à radiação UVA, UVB ou RIV.
- ✓ Avaliar a proliferação da linhagem melanocítica não tumoral (melan-a) exposta a radiação UVA e UVB, com exposição prévia à RIV.
- ✓ Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio na linhagem celular melan-a, exposta a radiação UVB com e sem exposição prévia à RIV.
- ✓ Avaliar a resposta do sistema de defesa antioxidante na linhagem celular melan-a, exposta a radiação UVB com e sem exposição prévia à RIV.
- ✓ Avaliar a produção de lipídeos peroxidados na linhagem celular melan-a, exposta a radiação UVB com e sem exposição prévia à RIV.
- ✓ Avaliar a produção de danos de DNA na linhagem celular melan-a, exposta a radiação UVB com e sem exposição prévia à RIV.

ARTIGO

Protective Effect of Infrared-A Radiation Against Damages Induced by UVB Radiation in Melan-a Cell Line

Artigo a ser submetido à *Photochemistry and Photobiology*

**Protective Effect of Infrared-A Radiation Against Damages Induced by UVB
Radiation in Melan-a Cell Line**

Aline Portantiolo Lettnin^{1,2}, Mariana Teixeira Santos Figueiredo Salgado ¹, Camila
Gonzalez Cruz³, Flavio Manoel Rodrigues da Silva Júnior ^{1,4}, Ana Paula de Souza
Votto^{1,2}, Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira*¹, Gilma Santos Trindade^{1,2}

¹ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande,
Brazil.

² Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada,
Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil.

³ Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande,
Brazil.

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio
Grande, Rio Grande, Brazil .

*Corresponding author email: dazafil@gmail (Daza de M. V. B. Filgueira)

ABSTRACT

In this study were availed effects on cell viability, DNA damage, lipid peroxidation, reactive oxygen species production and antioxidant capacity. These analyzes were observed after exposure to infrared-A (IR-A), ultraviolet radiation A (UVA), ultraviolet radiation B (UVB) and interaction IR-A with UVA (IR-A+UVA) or UVB (IR-A+UVB) in no tumoral murine melanocytic cell line, melan-a. The aim of this work was evaluate the protective effect of IR-A using non-thermal LED lamp against proliferation or cytotoxic effects of UVA or UVB. Results showed significant effects after IR-A exposure alone, excepted by dose 0.8 J/cm^2 in cell proliferation and viability. In UVA exposure was observed increased cell proliferation with dose 1.2 J/cm^2 , however, this effect was maintained in interaction IR-A+UVA. In UVB exposure was observed inhibition proliferation with dose 0.015 J/cm^2 and IR-A+UVB interaction showed a recovery in cell proliferation, decreased DNA damage and lipid peroxides content. DNA damage were protected in 0 and 24 hours after irradiation, and lipid peroxidation was protected in all times. Possibly protection was not relation with oxidative stress, due imbalance between ROS production and antioxidative capacity 24 and 48 hours after exposure. Thus, IR-A athermic in melan-a protected from damage induced by UVB 24 hours after exposure.

Keywords: Radiation interaction, Photoprotection, Cell viability, Skin photooxidative stress, Lipid peroxidation, DNA damage, Antioxidative potential.

INTRODUCTION

The ultraviolet radiation (UV) (200-400nm), visible light (400-760nm) and infrared radiation (IR) (760-1mm) are some electromagnetic radiations that arrive at earth surface (1,2). IR is comprised by wavelengths from 760 to 1 mm, and can be divided into three sub-regions, such as: IR-A (760–1400 nm), IR-B (1400–3000 nm), and IR-C (3000–1 mm) (2,3,4,5).

Human skin is exposed constantly to natural sunlight which IR represents 54%, while UV only consist for 7% (6). Besides, IR-A dose that reaches the earth can be influenced by the same factors that also influence UV. For example, ozone layer, sun position, latitude, altitude, cloud cover and surface reflections (2,7). IR reaches subcutaneous skin tissues depending on wavelength. IR-A exceeds the epidermal and dermal layers, and can reach the subcutaneous tissue without increasing the skin temperature significantly. While IR-B and IR-C affect the upper skin layers increasing the skin temperature significantly, resulting in thermal sensation (3,6).

IR-A induces photobiomodulation's mechanism by activation of mitochondrial respiratory chain components (8) such as cytochrome c oxidase (9). Other biological effects can be observed after IR exposure as balanced modulation of gene Bcl2/Bax, inhibiting apoptosis and activating genes such as p53 (2); stimulus in the synthesis of collagen, elastin and growth factor TGF- β 1, support wound healing (10) and reducing skin photoaging (11). Also IR exposure stimulates cell proliferation, rapid regeneration of damaged tissue (12), induces anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins that prevent DNA damage and apoptosis rate (13).

The sun is the main IR source, but artificial sources were developed and used for therapy purposes as photodynamic therapy (2). LED lamps are used in wound treatments without thermal effects generation. Consequently, their effects are well

tolerated in biological tissues (9). LED lamps show beneficial effects after exposure; for instance, cytokine levels modulation, growth factors, inflammatory mediators and increased cell proliferation and migration (14). However, effects can be influenced by irradiation parameters, such as wavelength, dose, intensity, irradiation time, pulse pattern, pulsed or continuous wave mode (15).

UV biological effects can change according to the wavelength; thus they were divided into UVA (320-400nm), UVB (280-320nm) and UVC (200-290nm) (16,17,18,19). UVC is barred by the ozone layer in the stratosphere (7), and as UVB, it is directly absorbed by DNA (20). UVB exposure induces photoproducts formation as pyrimidine (6-4) pyrimidine in DNA molecule (21). Moreover, UVB produces reactive oxygen species (ROS), which are responsible for oxidative damage in DNA, RNA, proteins and lipids (22). UVA target biological membranes, but can also indirectly generate DNA damage by ROS (23,24).

When exposed to UV, skin cells activate different signaling pathways as defense systems. ROS production is a main molecular response mechanism in radiation exposure (25). The imbalance in ROS production activates the antioxidant defense system (26). When high levels of ROS intracellular exceed the antioxidant capacity, result in oxidative stress (27).

Studies about interaction between UV, IR and carcinogenesis are not recent. Research is based in the effects caused during prolonged exposure to natural sunlight and/or IR exposure (13). Nevertheless, in natural environment, IR and visible light wavelengths prevail in the morning while UV radiation predominant around noon (28). Thus, the aim of this work is to evaluate the short-wavelength IR-A protective effects by exposure with non-thermal LED lamps against the cytotoxic effects of UVA and UVB, from pre-exposure to IR-A and subsequently UVA or UVB exposure.

MATERIALS AND METHODS

Cells and culture condition

The melan-a is a normal murine melanocyte cell line. It was obtained from the Laboratório de Oncologia Experimental - Instituto do Câncer de São Paulo – ICESP. Cells were grown in DMEM medium (Gibco, USA), supplemented with sodium bicarbonate (2.0 g/L) (Vetec), L-glutamine (0.3 g/L) (Vetec), HEPES (3 g/L) (Acros), 10% fetal bovine serum (Gibco, Brazil) and 1% antibiotic and antimycotic (penicillin [100 U/mL], streptomycin [100 µg/mL] and amphotericin B [0.25 µg/mL] (Gibco, USA) in disposable plastic plates at 37°C. To maintain cell growth was added 200nM of growth factor Phorbol Myristate Acetate (PMA, Sigma-Aldrich, USA).

UVA, UVB and Infrared Lamps

Cell line was irradiated with UVA, UVB or IR-A (athermic wavelength) lamps and by combination of different wavelengths. The UVA lamp (VL 115L: 115V, 30 W Vilber Lourmat, France) has a spectrum range from 320 to 380 nm with peak intensity at 365 nm and irradiance measured was 233µw/cm² of UVA, with 1.2µw/cm² of UVB contamination, without UVC contamination. The UVB lamp (VL 115L: 115V, 30 W Vilber Lourmat, France) has spectrum range from 280 to 320 nm with peak intensity at 312 nm and irradiance measured was 79.3µw/cm² of UVB, with 22.6µw/cm² of UVA, without UVC contamination. The IR-A lamp (760-1400nm, 100-240V, 50/60 Hz 30W DPL Therapy System Infrared LEDs USA) has peak intensity at 880 nm and irradiance was 820µw/cm², without UVA, UVB or UVC contamination. Intensity of all irradiations was measured immediately before cell irradiation using a radiometer/photometer (model IL 1400A, International Light, MA).

Exposure of cells with UVA, UVB or IR-A

Cells were incubated at 37°C for 24h into 96-well culture plates for adherence. Upon reaching log phase, medium was removed. Plates were washed twice with PBS and suspended again in PBS for radiation exposure. Cells (2×10^5 cells/mL) were exposed in the following doses of irradiation: control (no irradiation); UVA doses 0.2 J/cm² (15 min); 0.4 J/cm² (30 min); 0.8 J/cm² (60 min); 1.2 J/cm² (90 min) and 1.6 J/cm² (120 min) by MTT assay; UVA doses 0.8J/cm² (60 min); 1.2J/cm² (90 min); 1.6J/cm² (120 min); 2.0J/cm² (150 min) and 2.4J/cm² (180min) by trypan blue exclusion assay); UVB doses 0.005J/cm² (30 sec); 0.01J/cm² (1 min); 0.015J/cm² (1 min 30sec); 0.03J/cm² (3 min) and 0.05J/cm² (5 min) and IR-A dose 0.8 J/cm² (15 min); 1.6 J/cm² (30 min); 2.5 J/cm² (45 min); 3.3 J/cm² (60 min) and 4.2J/cm² (75 min). After exposure, cells receive fresh culture and were maintained at 37°C until 72 hours.

Exposure of cells with interaction between IR-A and UVA or UVB

After the treatments described, the doses to analyze IR-A+UVA or IR-A+UVB were chosen with based in cell proliferation. For interaction with IR-A, the dose 1.2 J/cm² of UVA was chosen because in this dose were observed peaks of cell proliferation. The dose 0.015 J/cm² of UVB was chosen because it was the highest dose to provoke inhibition cell proliferation, but without causing cytotoxic effect. Finally, the dose of IR-A was 0.8 J/cm² that remaining similar to control in all times analyzed.

IR-A+UVA in melan-a cells was performed following the treatments: control (no irradiation); IR-A (cells were exposed to 0.8 J/cm² of IR-A); UVA (cells were exposed to 1.2 J/cm² of UVA), and IR-A+UVA (cells were irradiated with 0.8 J/cm² of IR-A and immediately after irradiated with 1.2 J/cm² of UVA).

IR-A+UVB was performed following the treatments: control (no irradiation); IR-A (cells were exposed to 0.8 J/cm² of IR-A); UVB (cells were exposed to 0.015 J/cm² of UVB), and IR-A+UVB (cells were irradiated with 0.8 J/cm² of IR-A and immediately after irradiated with 0.015 J/cm² of UVB).

Cell Viability

MTT assay

After cells were prepared, viable cells were measured by MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium - Sigma-Aldrich, USA) immediately (0h), 24 h, 48 h and 72 h after exposure with UVA, UVB, or IR-A. The assay was performed by adding 20 µL of the MTT solution (5 mg/mL) to each well, and plates were incubated for 3h at 37°C. During the incubation, the active enzymes of the viable cells transformed the yellow MTT into purple formazan crystals. After the incubation period, medium was removed and formazan crystals were dissolved in 200 µL of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, USA). Absorbance values were determined at 490 nm on a multiwell plate reader (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-TEK).

Trypan blue assay

Number of viable cells and cell viability were assessed by trypan blue (Gibco, USA) exclusion assay, immediately (0 h), 24 h, 48 h and 72h after UVA, UVB or IR-A exposure and after interaction treatments (IR-A+UVA or IR-A+UVB). After exposure, wells were washed two times with PBS, suspended with 50 µL of trypan blue and 50 µL of PBS. Cells were incubated for 10 minutes at room temperature. Plates were washed with PBS again and each well was photographed in 200X magnification. Analysis was

performed from areas captures in an epifluorescence microscope Olympus IX81 and cells were counted using ImageJ software.

Oxidative effects and DNA damage

Oxidative effects and DNA damage were measured in melan-a cells (2×10^5 cells/mL) immediately (0 h), 24 h and 48 h after exposure with IR-A (0.8 J/cm^2), UVB (0.015 J/cm^2), IR-A+UVB ($0.8+0.015 \text{ J/cm}^2$) and without radiation (control).

Capacity of induce DNA Damage

DNA damage was evaluated by the alkaline single cell electrophoresis (comet) assay, performed as described by Singh and co-workers (1988) (29) and Steinert and co-workers (1998) (30), with some modifications. After trypsinization, an aliquot of $30 \mu\text{L}$ of cell suspension of each sample was mixed with $120 \mu\text{L}$ of 1% low melting point agarose and added to fully frozen slides with a layer of 1.5% normal melting point agarose.

After layer solidification, cells on the slides were lysed with lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, and 10% dimethyl sulfoxide, pH 10) overnight at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Subsequently, all slides were placed in the electrophoresis solution (10M NaOH and 200 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at 30 V and 300 mA. Slides were neutralized with 0.4 M Tris buffer (pH 7.5), stained with $20 \mu\text{L}$ of SyBR Safe (1:10.000; Molecular Probes) and analyzed using a fluorescence microscope (Olympus BX51) connected to an Olympus DF72 camera.

Analyses were done with four samples per group (with replica, two slides per sample) and a total of 50 nucleoid were randomly selected and photographed on each

slide. The nucleoids were analyzed by Image J software and DNA damage was represented by tail moment.

Determination of lipid oxidative damage

The lipid peroxidation (LPO) was determined according to Hermes-Lima and co-workers (1995) (31), with modifications by Monserrat and co-workers (2003) (32). The method is based on the oxidation of Fe(II) by LPO (FOX reactive substances) at acidic pH in presence of the Fe(III)-complexing dye, xylenol orange (Sigma-Aldrich, USA). After irradiation, cells were washed with PBS (two times) and frozen at -80°C until use. In the analyze, samples were homogenized (10% wt/vol) in metanol 100% cold (4°C) and homogenate was centrifuged at 1000 g, for 10 min at 4°C. Following, the supernatant was used for LPO determinations (550 nm). Cumene hydroperoxide (CHP, Sigma-Aldrich, USA) was employed as standard.

Assessment of the intracellular level of reactive oxygen species (ROS)

For measurement of cytosolic ROS level, after exposure IR-A, UVB, IR-A+UVB, cells were incubated for 30 min at 37 °C with the fluorogenic compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA, Sigma, Germany) at a final concentration of 40uM. The fluorescence was analyzed during 90 min at 37° using a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer), with an excitation and emission wavelength of 485 and 520 nm, respectively. ROS levels were expressed in terms of fluorescence area, and were obtained by integrating the fluorescence units (FU) over the measurement time (90 min) and expressed as FU/min.

Response of the antioxidant defense system (ACAP)

The response of the antioxidant defense system was verified by antioxidant capacity against peroxyl radicals. Melan-a cells after exposure IR-A, UVB, IR-A+UVB, were washed with PBS (two times) and the pellet was frozen at -80°C until use. After, cells were resuspended in PBS and homogenized in ice. The homogenized was centrifuged (10.000 x g) at 4°C during 20 minutes. Aliquots of 15 µl of each sample (three replicates) were placed into a plate with 120 µl of buffer (Hepes, KCl, MgCl₂ and water), 10 µl of water or ABAP (2,2'-azobis (2 methylpropionatemidine) dihydrochloride) (Sigma-Aldrich, USA) and were added 20 µl of H₂DCF-DA. The fluorescence intensity was determined during 60 min at 37°C, using a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer), with an excitation and emission wavelength of 485 and 520 nm, respectively. Antioxidant capacity were expressed in terms of fluorescence area, after fitting fluorescence data to a second order polynomial and integrating between 0 and 60 min in order to obtain its area, being the inverse of the area difference in fluorescence with and without ABAP (33).

Statistical analysis

In all analyses, each independent experiment was repeated three times (n=3) with the minimum of triplicate samples. Data are expressed as mean ± standard error and analyzed with ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Analysis assumptions (normality and variance homogeneity) were previously verified. The significance level (α) was fixed in 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

The purpose of the current study was to analyze how melan-a cells answer to UVA, UVB and IR-A radiations and the capacity of IR-A to protect from cytotoxicity damage caused by UV. For this, were evaluating parameters as cell proliferation, cell viability, DNA damage, lipid peroxidation and oxidative stress. UVA, UVB (34) and IR-A (35) doses chosen for this study are environmental doses.

As already mentioned UVA, UVB and IR-A are able to alter cell viability in different cellular cultures (9,36,37,38,39). However, studies about IR-A effects in cells and tissues are significantly lower than those involving UV. IR-A exposure provide improving cellular metabolic processes and stimulate cellular repair mechanisms (8,40,41,42). Already UV exposure can affect proliferation and survival of epidermal and dermal cells, changing cutaneous functions (43).

In this study, UVA, UVB or IR-A exposure alone showed effects in dose and time dependent manner by MTT assay (Fig. 1). Data showed that in exposure to UVA (Fig.1 A and Table 1) occurred a viable cells decrease immediately after irradiation in the doses 1.2 and 1.6 J/cm². However, in 24 hours it was observed viable cells increased in the 1.2 J/cm² dose in relation to control group. No differences were observed with doses 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 and 1.6 J/cm² when compared with control group in 48 h and 72 h after exposure.

In the cells exposed to UVB (Fig. 1 B, Table 1) was observed that doses 0.015, 0.03 and 0.05 J/cm² not increased in relation to control group into time analyzed. Furthermore, this effect also occurred to 0.005 and 0.01 J/cm² in 48 hours after exposure.

In IR-A exposure, was observed decreased in the number of viable cells immediately after exposure with doses 0.8 and 3.3 J/cm² compared to control. The dose 0.8 J/cm² remained significantly different to control in 24 and 48 hours. Decreased in the number of viable cells was observed too in 48 hours with dose 2.5 J/cm² and 72 hours with doses 1.6 and 2.5 J/cm².

>Figure1<

The results obtained to IR-A and UVA motivated alterations of some parameters used. IR-A results induced to use method that had not mitochondria as cellular target and UVA results motivated to utilized larger doses. The method chosen was trypan blue assay.

For cells exposed to UVA (Fig. 2 A, Table 1) was observed cytotoxicity immediately after exposure in the doses 2.0 J/cm² and 2.4 J/cm². Then, after 24 hours was observed significant changes in cell proliferation. As a result, this change represented cytotoxic effect in all doses except to 0.8 J/cm². After 48 hours, this effect remained except to 0.8 and 1.2 J/cm². In 72 hours after exposure, the dose 1.2 J/cm² was able to induced increase cell proliferation and the dose 2.4 J/cm² provoked cell proliferation inhibition. Others authors corroborate with this result of increase cellular proliferation. Han and co-workers (2011) (44) found in JB6 Cl41 mouse epidermal cell proliferation increase after UVA exposure with the dose 0.3 J/cm² in times 0 h, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h. The same group, in 2008 (45), observed that ErbB2 expression (epidermal growth factor receptors) is enhanced by low-energy UVA. This irradiation was with doses between 0.3 – 3 J/cm² in keratinocytes considered an important way for the malignant transformation of keratinocytes.

When exposed to UVB (Fig. 2 B and Table 1), cells showed an inhibition in cell proliferation in the doses 0.01, 0.015, 0.03 and 0.05 J/cm² in 24 hours. After 48 hours of

exposure, this effect remained in the doses 0.01 and 0.015 J/cm², while the highest doses (0.03 and 0.05 J/cm²) resulted in cytotoxic effect. This response pattern was maintained at 72 hours post exposure and the lower dose also induced inhibition in cell proliferation (Fig. 2 B1, Fig. 2 B2 and Table 1). When the cells were exposure to UVB was possible to demonstrate, from 24 h, proliferation inhibition in the lower doses and cytotoxicity in the highest doses. Results are agreement with Frank and co-workers (2006) (28) that observed decrease in the number of viable cells in osteosarcoma cells after UVB exposure with the doses 0.015, 0.030 and 0.045 J/cm². In this context, Menezes and co-workers (1998) (37) also reported that UVB exposure in the dose 0.05 J/cm² decrease the number of viable cells in human dermal fibroblast.

So for this study, the effects observed induced to choice of changes cell viability tests, wherein analysis by trypan blue assay clarified results obtained by MTT assay (Table 1). Furthermore, whereas the IR-A preferential cellular target is the mitochondria (9,46), and the MTT assay directly assessed mitochondrial function, it is appropriate to discuss the results obtained by trypan blue assay.

>Table 1<

Finally, the results showed that IR-A alone in the dose 0.8 J/cm² remained similar to control at all times observed (Fig. 2 C1, Fig. 2 C2 and Table 1). Result was decisive for the choice of dose 0.8 J/cm² IR-A for all subsequent tests, because no change cell viability. Immediately after exposure was observed a change in cell proliferation from the dose 1.6 J/cm² and cytotoxic effect by dose 3.3 J/cm². However, in 24 hours cell proliferation inhibition was observed to all doses except to 0.8 J/cm² that was similar to control and to 4.2 J/cm² that showed cytotoxic effect. Inhibition in cell proliferation remained after 48 and 72 hours, except 2.5 and 3.3 J/cm² in 48 hours and 2.5 and 4.2 J/cm² in 72 hours it showed cytotoxic effect. These data disagree with

Piazena and co-workers (2014) (47), studying a skin model ex vivo which used high doses as 171 J/cm² (15 minutes) and 684 J/cm² (30 minutes) (based on the data provided by the authors: IR radiator termic equipped with filter; irradiance: 19x10⁻⁴μw/cm²; temperature: 27°- 45°C), and was not observed significant effects on cell viability after IR-A exposure.

>Figure 2<

IR protective effects against UV cytotoxic effects are already being studied (13,28,37,38,48). In this study, UVB was possible to find protective effect in the interaction with IR-A in 24 hours. Likewise, at times 48 h and 72 h were observed that the cytotoxic effect of UVB remained in the interaction (IR-A+UVB) (Fig. 3 B1 and 3 B2). The results of study with UVB (0.015 J/cm², in 24 h) agree with that obtained by Lage and co-workers (2000) (38) that demonstrated that the pre exposure to IR (lamp termic equipped with a jacketed watch glass with constant cold water) induced increase in survival of *Escherichia coli* cells subsequently exposed to UV. The same protective effect was observed for Menezes and co-workers (1998) (37) in fibroblasts cells utilizing an IR termic lamp, and subsequently exposing to UVA or UVB.

Besides, the present study showed that IR-A protective effect is temporary, since effect was lost 48 and 72 hours after exposure. Therefore, for maintaining the protection is suggested the need re-exposure. This suggestion corroborates with Continenza and co-workers (1993) (49) which demonstrated that the genoprotector effect of IR is relative to the number of times cells were pre exposed to this radiation.

Moreover, when the melan-a cells were irradiated with IR-A, and posteriorly irradiated with UVA, the protective effect was not observed by not reduce cell proliferation (Fig. 3 A1 and 3 A2). For this reason, it will be discussed below to better

understand the cellular processes which culminated in the protective effect of IR-A in the cellular viability alterations produced by UVB.

>Figure 3<

Interaction IR-A+UVB protect melan-a cells from DNA damage caused by UVB? It is important to remember that UVB has the DNA as preferential cellular target, and knowing the genoprotector capacity of IR radiation (13,28). The results obtained from the comet assay (Fig. 4) demonstrated that the interaction was able to induce protective for the times immediately (0h) (Fig. 4 A) and 24 hours (Fig. 4 B). However, in 48 hours this protection effect was not demonstrated. In this case the interaction was not enough for protection (Fig. 4 C). Results corroborated with Menezes and co-workers (1998) (37) that showed that the protection induced by IR can be observed immediately after IR irradiation, reaching 24 hours later. However, this effect is decreased, disappearing until 72 hours after exposure. Also Frank and co-workers (2006) (28), utilizing epidermal cells pre exposed to IR, showed decreased thymine dimers when compared to cells only exposed to UVB.

>Figure 4<

In analyzed to production of lipid peroxidation (LPO), dose of UVB utilized increased lipid peroxidation production significantly, and this effect was annulled by IR-A pre exposure in all times analyzed (Fig. 5). Few studies have reported effects of IR in lipid peroxidation. Chludzińska and co-workers (2005) (50) realized this analyze, however did not observed change in the lipid peroxidation level after IR-A exposure in the dose 0.6 J/cm^2 (15 minutes) (termic lamp with 700- to 2000-nm filter; irradiance: $69 \mu\text{w/cm}^2$). The results of this study corroborated with those authors, and showed yet that in 48 h the lipid peroxidation was lower than control.

In relation to UVB, Ramachandran and Prasad (2008) (51) observed significantly increased levels of lipid hydroperoxides after UVB irradiation in lymphocytes (dose 0.02 J/cm²). Similar result was showed by Terra and co-workers (2012) (52), that increased in lipid peroxidation was observed immediately and 24 hours after UVB irradiation with the dose 2.99 J/cm² in Swiss mice. The results of this study corroborated with those obtained by the author above.

>Figure 5<

Know to that preferential target UVB radiation is DNA, and in this work, we can showed that IR cells protected from damage induced by UVB. Besides, membrane lipids too were affected by UVB radiation, and again, IR protected the cells. Thus, how would relation between ROS production and ACAP? As presiously mentioned, oxidative stress is also capable to induce DNA damage; furthermore, is well known that UV is able to stimulate reactive oxygen species production in cells (22,26,53). However, when it comes to ROS production by IR, some authors suggest that the formation of free radicals in skin after IR exposure happen due to thermal factors (3,47,54). The present study utilized an IR-A athermic source, agrees with these authors, that IR-A exposure alone did not produced ROS in all times analyzed (Fig. 6).

In this study, immediately (0h) after exposure to UVB radiation, IR-A and interaction IR-A+UVB there was not observed alterations in ROS generation and antioxidant capacity compared to control (Fig. 6 A1 and 6 A2). After 24 hours of exposure to IR-A+UVB, melan-a cell line showed an increase in ROS generation; also, a decreasing in the antioxidant capacity compared to control featuring an oxidative stress. Cells exposed only to UVB showed a decrease in the antioxidant capacity, but did not demonstrated a ROS generation significantly increase in relation to control group (Fig. 6 B1 and 6 B2). Finally, in 48 hours was observed higher levels of ROS

generation after exposure to UVB radiation and IR-A+UVB, but was not showed significant difference in activity of ACAP compared to control (Fig. 6 C1 and 6 C). This assay demonstrated that IR-A pre exposure was no able to inhibit ROS production in cells exposed to UVB. By contrast, on 24 h, ROS production was significantly higher in the interaction between radiations. This fact can justify the loss of protective effect in cell viability in 48 and 72 h after exposure.

>Figure 6<

ACAP results were emphasized with increased ROS levels and showed an oxidative stress situation. Wherein the ROS increase is accompanied by a decrease in the antioxidant defense system. In 48 h, ROS production still remains significantly high in UVB and IR-A+UVB treatments, although the antioxidant defense system is being restored.

Analyzing the results of lipid peroxidation, and comparing with ROS production and ACAP; it is possible to suggest that the interaction was able to protect cells from lipid peroxidation. However, is possible oxidative damage produced by others oxygen or nitrogen reactive species.

In conclusion, the present study indicates that IR-A reduces cytotoxic effects induced by UVB. This protective effect may be mediated by reduced lipid peroxidation levels and DNA damage in cell viability. However, we believe that to maintain the protective effect of IR-A it is required re-exposure to this radiation. Finally, it is important to emphasize that the protective effects were produced through energy emitted by the wavelength, discarding the heat influence.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank CAPES by the promotion of studentship.

REFERENCES

1. Lee, L-A. and S. Roques (2002) Biological Actions of Infrared Radiation. Sensing, Signaling and Cell Adaptation. Edited by Storey KB and Storey JM, *Elsevier Science B.V.*
2. Schroeder, P., J. Haendeler and J. Krutmann (2008) The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Exper. Gerontol.* **43**, 629–632.
3. Schieke, S. M., P. Schroeder and J. Krutmann (2003) Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **19**, 228–234.
4. Kim, H. H., M. J. Lee, S. R. Lee, K. H. Kim, K. H. Cho and H. C. Eun (2005) Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech. Ageing. Dev.* **126**(11), 1170–1177.
5. Cho, S., M. H. Shin, Y. K. Kim, J-E. Seo, Y. M. Lee, C-H. Park and J. H. Chung (2009) Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *J. Invest. Dermatol. Symposium Proceedings* **14**, 15–19; doi:10.1038/jidsymp.2009.
6. Kochevar, I. E., C. R. Taylor and J. Krutmann (2008) Fundamentals of cutaneous photobiology and photoimmunology. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz S, Gilchrest B, Paller AS, Lefell DJ (Eds.), *Fitapatrik's Dermatology in General Medicine*, seventh ed. McGraw-Hill, New York.
7. Narayanan, D. L., R. N. Saladi and J. L. Fox (2010) Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* **49**, 978–986.
8. Karu, T. (1999) Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells (review). *J. Photochem. Photobiol. B* **49**, 1–17.

9. Wong-Riley, M. T. T., H. L. Liang, J. T. Eells, B. Chance, M. M. Henry, E. Buchmann, M. Kane and H. T. Whelan (2005) Photobiomodulation Directly Benefits Primary Neurons Functionally Inactivated by Toxins. *The J. Biol. Chem.* **280**(6), 4761–4771.
10. Toyokawa, H., Y. Matsui, J. Uhara, H. Tsuchiya, S. Teshima, H. Nakanishi, A-H. Kwon, Y. Azuma, T. Nagaoka, T. Ogaw and Y. Kamiyama (2003) Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exp. Biol. Med.* **228**, 724-729.
11. Lee JH, Roh MR and Lee KH, 2006. Effects of Infrared Radiation on Skin Photo-Aging and Pigmentation. *Yonsei Medical Journal* 47(4): 485 – 490.
12. Wu, H-P. P. and M. A. Persinger (2011) Increased mobility and stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* induced by 880 nm light emitting diode. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **102**, 156-160.
13. Jantschitsch, C., S. Majewski, A. Maeda, T. Schwarz and A. Schwarz (2009) Infrared radiation confers resistance to UV-induced apoptosis via reduction of DNA damage and upregulation of antiapoptotic proteins. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1271–1279.
14. Hamblin, M. R. and T. N. Demidova (2006) Mechanisms for Low-Light Therapy, in Barolet D. (2008) *Semin. Cutan. Med. Surg.* **27**, 227-238.
15. Barolet, D. (2008) Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **27**, 227-238.
16. Diffey, B. L. (2002) What is the Light. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **18**, 68-74.
17. Pfeifer, G. P., Y. Young-Hyun and A. Besaratinia (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res.* **571**, 19–31.

18. Kanavy, H. E. and M. R. Gerstenblith (2011) Ultraviolet Radiation and Melanoma. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **30**, 222-228.
19. Cadet, J., S. Mouret, J-L. Ravanat and T. Douki (2012) Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactions. *Photochem. Photobiol.* **88**, 1048–1065.
20. Godar, D.E., D. P. Thomas, A. S. Miller and W. Lee W (1993) Long-wavelength UVA radiation induces oxidative stress, cytoskeletal damage and hemolysis. *Photochem. Photobiol.* **57**, 1018-1026.
21. Swalwell, H., J. Latimer, R. M. Haywood and M. A. Birch-Machin (2012) Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radic Biol. Med.* **52**, 626–634.
22. Perluigi, M., F. D. Domenico, C. Blarzino, C. Foppoli, C. Cini, A. Giorgi, C. Grillo, F. De Marcos, D. A. Butterfield, M. E. Schininà and R. Coccia (2010) Effects of UVB-induced oxidative stress on protein expression and specific protein oxidation in normal human epithelial keratinocytes: a proteomic approach. *Proteome. Science.* **8**, 13.
23. Darr, D. and I. Fridovich (1994) Free radicals in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* **102**, 671-675.
24. Kozma, B. and M. J. Eide (2014) Photocarcinogenesis an epidemiologic perspective on Ultraviolet Light and Skin Cancer. *Dermatol. Clin.* **32**, 301–313.
25. Fischer, G. J., S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta and J. J. Voorhees (2002) Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch. Dermatol.* **138**, 1462-1470.

26. Birch-Machin, M. A. and H. Swalwell (2010) How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis* **25**(2), 101–107.
27. Hermes-Lima, M. and T. Zenteno-Savín (2002) Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part. C* **133**, 537–556.
28. Frank, S., S. Menezes, C. Lebreton-De Coster, M. Oster, L. Dubertret and B. Coulomb (2006) Infrared radiation induces the p53 signaling pathway: role in infrared prevention of ultraviolet B toxicity. *Exp. Dermatol.* **15**, 130-137.
29. Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Scheider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* **237**, 3-4.
30. Steinert, S. A., R. Streib-Montee, J. M. Leather (1998) DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.* **399**, 65-85.
31. Hermes-Lima, M., W. G. Willmore and K. Storey (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xilenol orange complex formation. *Free. Radic. Biol. Med.* **19**, 271–280.
32. Monserrat, J. M., L. A. Geracitano, G. L. L. Pinho, T. M. Vinagre, M. Faleiros, J. C. Alciati and A. Bianchini (2003) Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xilenol orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **45**, 177–183.
33. Amado, L. L., M. L. Garcia, P. B. Ramos, R. F. Freitas, B. Zafalon, J. L. R. Ferreira, J. S. Yunes and J. M. Monserrat (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxyl radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total. Environ.* **407**, 2115-2123.

34. Gouveia, G. R. (2009) Penetração da radiação UV na coluna d'água do estuário da Lagoa dos Patos e seus efeitos sobre células e larvas de peixe. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.
35. Piazena, H. and H. Meffert (2004) Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei Infrarot-Bestrahlung der Haut und die Extrapolation der Daten von in vitro-Messungen auf die Bedingungen in vivo - Erfordernisse und Fehler [Dosis related effects during infrared irradiation of the skin and the extrapolation of the data from in vitro measurements to in vivo conditions - requirements and errors]. Lecture presented at the symposium entitled "Water-filtered infrared-A (wIRA) in dermatology" of the Dr. med. h.c. Erwin Braun Foundation in Liestal/Basel, Switzerland, November 20, apud Gebbers, N., Hirt-Burri, N., Scaletta, C., Hoffman, G. and L. A. Applegate (2007). Water-filtered Infrared-A radiation (wIRA) is not implicated in cellular degeneration of human skin. *Ger Med Sci* 5, Doc8.
36. Huang, X.X, F. Bernerd and G. M. Halliday (2009). Ultraviolet A within sunlight induces mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin. *Am J Pathol* 174: 1534–1543.
37. Menezes, S., B. Coulomb, C. Lebreton and L. Dubertret (1998) Non-coherent near infra-red radiation protects normal human dermal fibroblasts from the solar ultraviolet toxicity. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 629–633.
38. Lage, C., P. C. N. Teixeira and A. C. Leitão (2000) Non-coherent visible and infrared radiation increase survival to UV (254 nm) *Escherichia coli* K12. *C. J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **54**, 155–161.
39. Knels, L., M. Valtink, J. DelaV. Marin, G. Steiner, C. Roehlecke, A. Krueger and R. H. W. Funk (2012) Effects of Temperature and Water-Filtered Infrared-A

- Alone or in Combination on Healthy and Glyoxal-Stressed Fibroblast Cultures.
Oxid. Med. Cell. Longev. ID 274953 doi:10.1155/2012/274953.
40. Danno K, Mori N, Toda K-i, Kobayashi T, Utani A, 2001. Near-infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17: 261-265.
41. Hoffmann, G. (2007) Principles and working mechanisms of water-filtered infrared-A (wIRA) in relation to wound healing (review), vol. 2, GMS Krankenhaushyg Interdiszip, Doc54.
42. Karu, T. (2010) Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life* **62**, 607–610. DOI: 10.1002/iub.359.
43. Kadekaro, A. L., R. J. Kavanagh, K. Wakamatsu, S. Ito, M. A. Pipitone and Z. A. Abdel (2003) Cutaneous Photobiology. The melanocyte vs. the sun: Who will win the final round? *Pigment. Cell. Res.* **16**, 434-447.
44. Han, C. Y., T. T. Hien, S. C. Lin and K. W. Kang (2011) Role of Pin1 in UVA-induced cell proliferation and malignant transformation in epidermal cells. *Res. Commun.* **410**, 68-74.
45. Han, C. Y., S. C. Lim, H. S. Choi and K. W. Kang (2008) Induction of ErbB2 by ultraviolet A irradiation: potential role in malignant transformation of keratinocytes. *Cancer. Sci.* **99**(3), 502–509.
46. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR, 2012. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng* 40(2): 516–533. doi:10.1007/s10439-011-0454-7.
47. Piazena, H., W. Pittermann, W. Müller, K. Jung, D. K. Kelleher, T. Herling, P. Meffert, R. Uebelhack and M. Kietzmann (2014) Effects of water-filtered

- infrared-A and of heat on cell death, inflammation, antioxidative potential and of free radical formation in viable skin – first results. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **138**, 347–354.
48. Gonzalez, V. C., A. C. N. Beheregaray, B. M. Peres, E. S. V. Sallis, A. S. Varela Junior and G. S. Trindade (2015) Histopathological Analysis of UVB and IR Interaction in Rat Skin. *Photochem. Photobiol.* DOI: 10.1111/php.12435.
49. Continenza MA, Ricciardi G, Franchitto A, 1993. Effects of low power 904 nm radiation on rat fibroblasts explanted and *in vitro* cultured. *J Photochem Photobiol B: Biol* **19**, 231-234.
50. Chludzin´ska, L., E. Ananicz, A. Jarosawska and M. Komorowska (2005) Near-infrared radiation protects the red cell membrane against oxidation. *Blood. Cells. Mol. Dis.* **35**, 74-79.
51. Ramachandran, S. and N. R. Prasad (2008) Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chem. Biol. Interact.* **176**, 99–107.
52. Terra, V. A., F. P. Souza-Neto, R. C. Pereira, T. N. X. Silva, A. C. C. Costa, R. C. Luiz, R. Cecchini and A. L. Cecchini (2012) Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **109**, 34–41.
53. Peres, P. S., V. A. Terra, F. A. Guarnier, R. Cecchini and A. L. Cecchini (2011) Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **103**, 93–97.
54. Schroeder, P., C. Pohl, C. Calles, M. Marks, S. Wild and J. Krutmann (2007) Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 128–135.

Table 1 - Comparison of the cell proliferation assays: MTT and trypan blue

	UVA		UVB		IR	
	MTT	Trypan Blue	MTT	Trypan Blue	MTT	Trypan Blue
0 h	↓ viable cells number 1.2; 1.6 J/cm ²	Cytotoxic 2.0; 2.4 J/cm ²	All doses ≈ CTR	All doses ≈ CTR	All doses ≈ CTR	↑ proliferation 1.6; 2.5; 4.2 J/cm ² Cytotoxic 3.3 J/cm ²
24 h	↑ viable cells number 1.2 J/cm ²	All cytotoxic - 0.8 J/cm ²	↓ viable cells number 0.015; 0.03; 0.05 J/cm ²	∅ proliferation From to 0.01 J/cm ²	All doses ≈ CTR	∅ proliferation - 0.8 ≈ CTR Cytotoxic 4.2 J/cm ²
48 h	All doses ≈ CTR	All cytotoxic - 0.8 and 1.2 J/cm ²	↓ viable cells number 0.015; 0.03; 0.05 J/cm ²	∅ proliferation 0.01 and 0.015 J/cm ² Cytotoxic 0.03 and 0.05 J/cm ²	↑ viable cells number 2.5; 3.3; 4.2 J/cm ²	0.8 ≈ CTR Cytotoxic 2.5; 3.3; 4.2 J/cm ² ∅ proliferation 1.6 J/cm ²
72 h	All doses ≈ CTR	↑ cell proliferation 1.2 J/cm ² ∅ proliferation 2.4 J/cm ²	↑ viable cells number 0.005; 0.01; 0.015 J/cm ² ↓ viable cells number 0.03 ; 0.05 J/cm ²	∅ proliferation Until 0.015 J/cm ² Cytotoxic 0.03; 0.05 J/cm ²	↑ viable cells number 0.8; 1.6 J/cm ²	0.8 ≈ CTR Cytotoxic 1.6; 3.3 J/cm ² ∅ proliferation 2.5; 4.2 J/cm ²

↓ (decreases) ↑ (increases) ≈ (similar) ∅ (inhibition) CTR (Control group) -
(except)

Figure 1

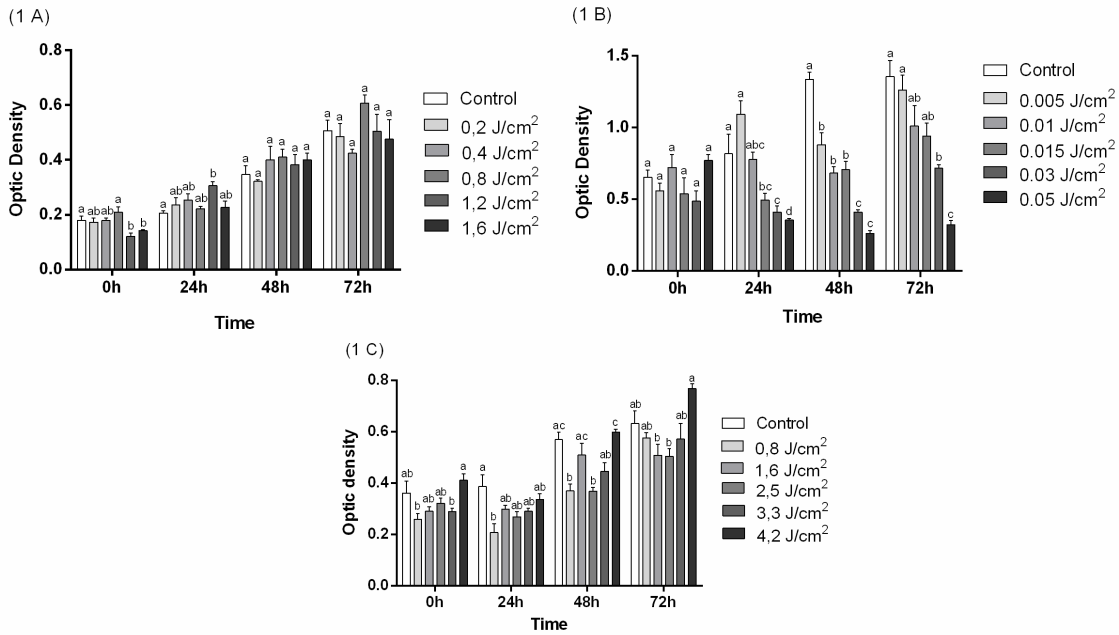


Figure1: **Melan-a cells proliferation measured by MTT assay.** Analyses in immediately (0 h), 24 h, 48 h and 72 h after exposure to 0.2 J/cm², 0.4 J/cm², 0.8 J/cm², 1.2 J/cm² and 1.6 J/cm² of UVA (1 A); 0.005 J/cm², 0.01 J/cm², 0.015 J/cm², 0.03 J/cm² and 0.05 J/cm² of UVB (1 B) and 0.8 J/cm², 1.6 J/cm², 2.5 J/cm², 3.3 J/cm² and 4.2 J/cm² of IR-A (1 C). Data are expressed as mean ± standard error. Similar letters indicate absence of significant difference (p>0.05) into each time.

Figure 2

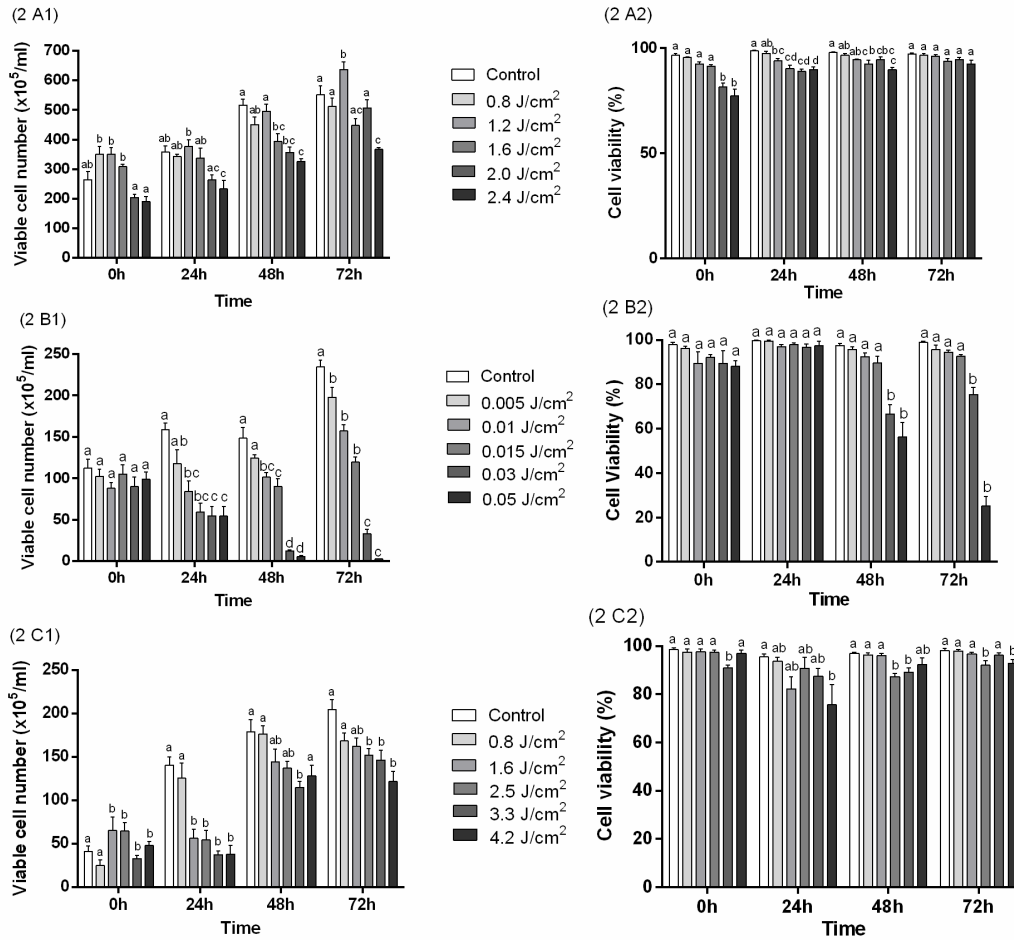


Figure 2: **Viable cell number and viability (%) of melan-a cells assessed by trypan blue exclusion assay.** Analyses in immediately (0h), 24h, 48h and 72h after irradiation with 0.8 J/cm², 1.2 J/cm², 1.6 J/cm², 2.0 J/cm² and 2.4 J/cm² doses of UVA (2 A1 and A2), 0.005 J/cm², 0.1 J/cm², 0.15 J/cm², 0.03 J/cm² and 0.05 J/cm² of UVB (2 B1 and B2) and 0.8 J/cm², 1.6 J/cm², 2.5 J/cm², 3.3 J/cm² and 4.2 J/cm² of IR-A (2 C1 and C2). Viable cell number (A1, B1 and C1) and viability (%) (A2, B2 and C2) after UVA, UVB and IR-A exposures, respectively. Data are expressed as mean ± standard error. Similar letters indicate absence of significant difference (p>0.05) into each time.

Figure 3

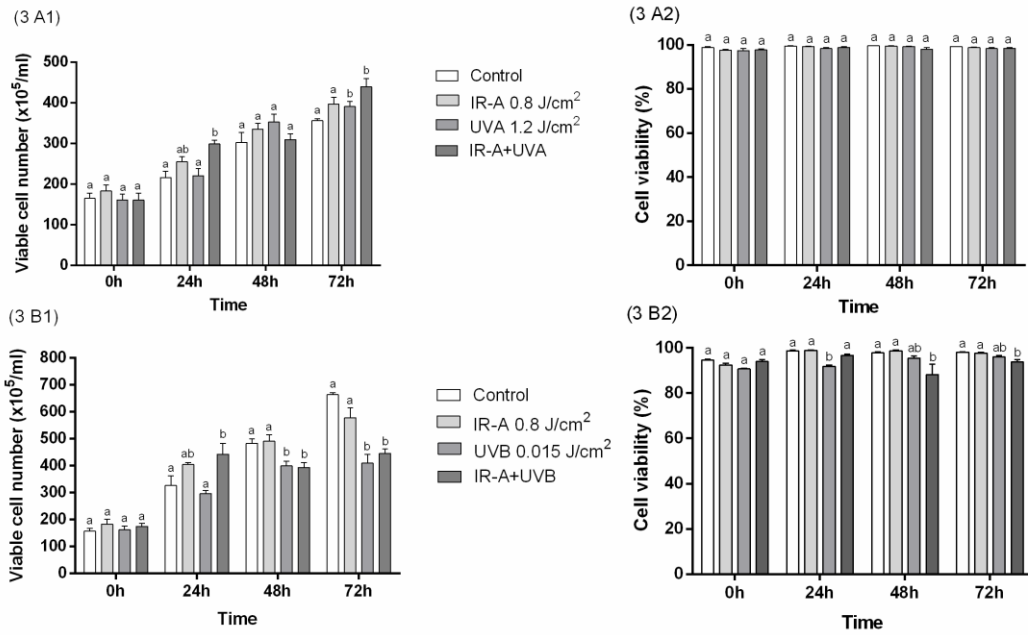


Figure 3: **Viable cell number** (3 A1) and **viability (%)** (3 A2) after exposure 1.2 J/cm² of UVA, 0.08 J/cm² of IR-A and interaction IR-A+UVA. Viable cell number (3 B1) and viability (%) (3 B2) after exposure 0.015 J/cm² of UVB, 0.08 J/cm² of IR-A, interaction IR-A+UVB and no irradiation (control). Melan-a cells were assessed by trypan blue exclusion test immediately (0h), 24h, 48h and 72h. Similar letters indicate absence of significant difference (p>0.05) into each time.

Figure 4

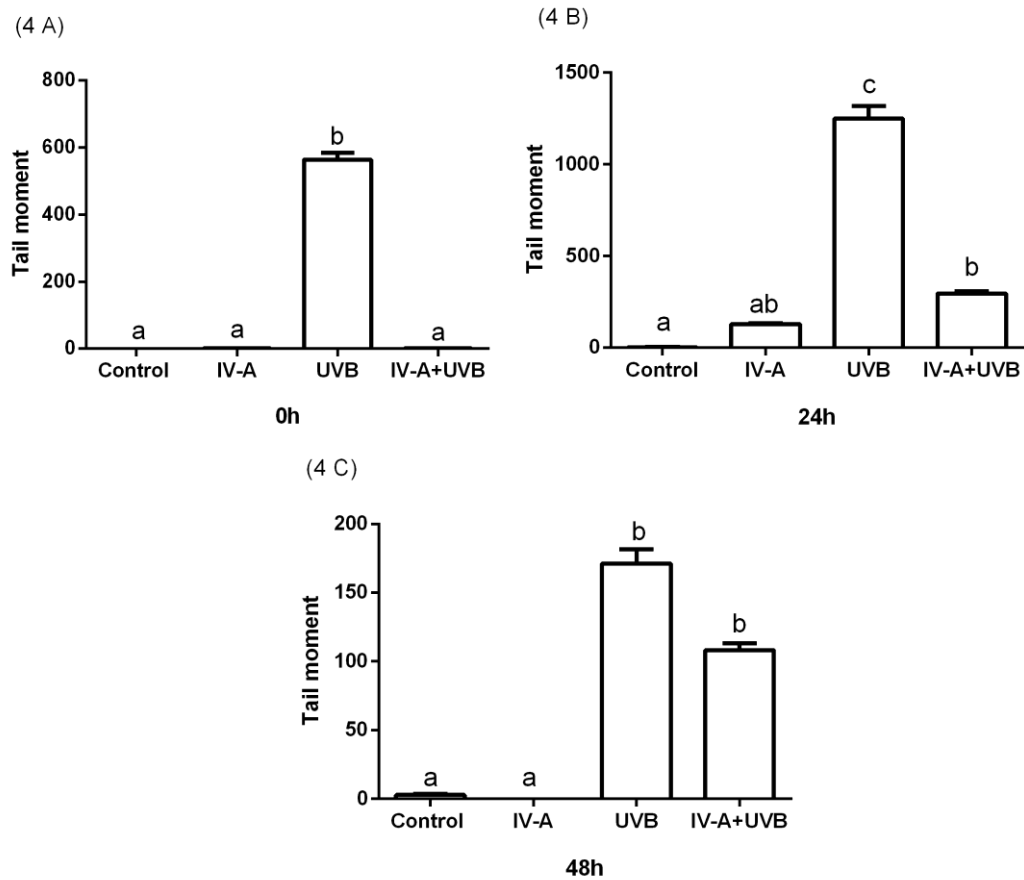


Figure 4: **DNA damage by expressed by tail moment.** Analyses in 0 hours (A1, A2), 24 hours (B1, B2) and 48 hours (C1, C2) after exposed to 0.08 J/cm^2 (15 min) of IR-A, 0.015 J/cm^2 (1 min 30 sec) of UVB radiation, interaction between 0.08 J/cm^2 of IR-A plus 0.015 J/cm^2 of UVB radiation (IR-A+UVB) and no irradiation (control). Data are expressed as mean \pm standard error. Similar letters indicate absence of significant difference ($p > 0.05$) into each time.

Figure 5

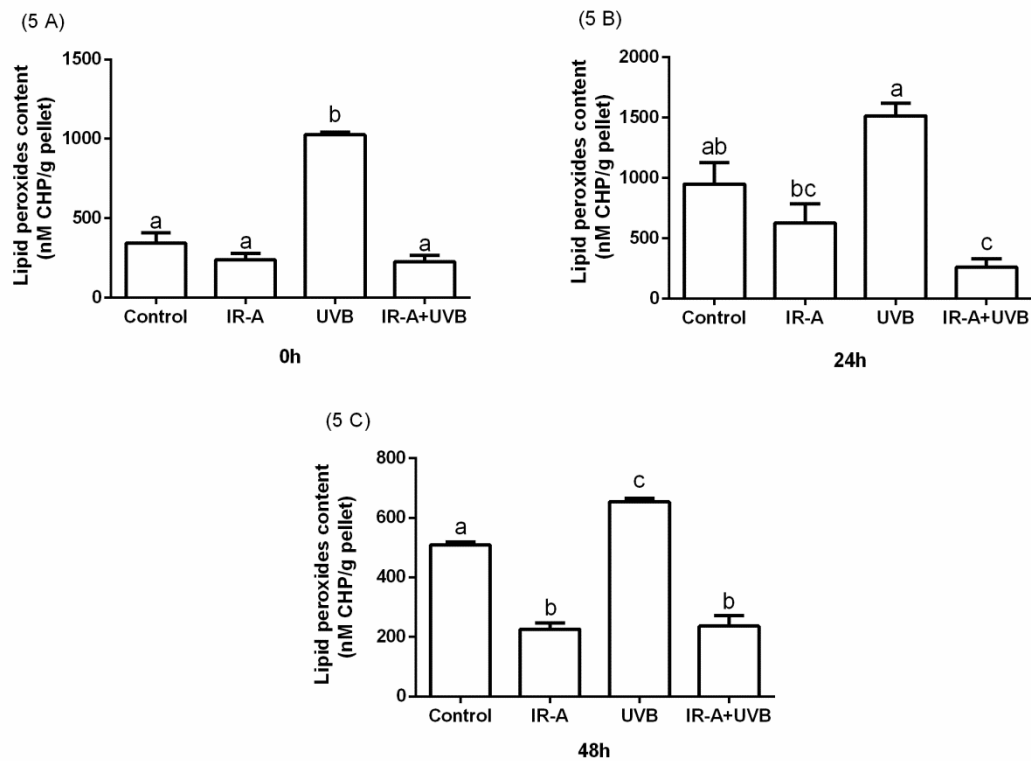


Figure 5: **Lipid peroxidation.** Analyses was measured in 0 hours (A), 24 hours (B) and 48 hours (C), after exposed to 0.08 J/cm^2 of IR-A, 0.015 J/cm^2 of UVB radiation, interaction between 0.08 J/cm^2 of IR-A plus 0.015 J/cm^2 of UVB radiation (IR-A+UVB) and no irradiation (control). Similar letters indicate absence of significant difference ($p > 0.05$) into each time.

Figure 6

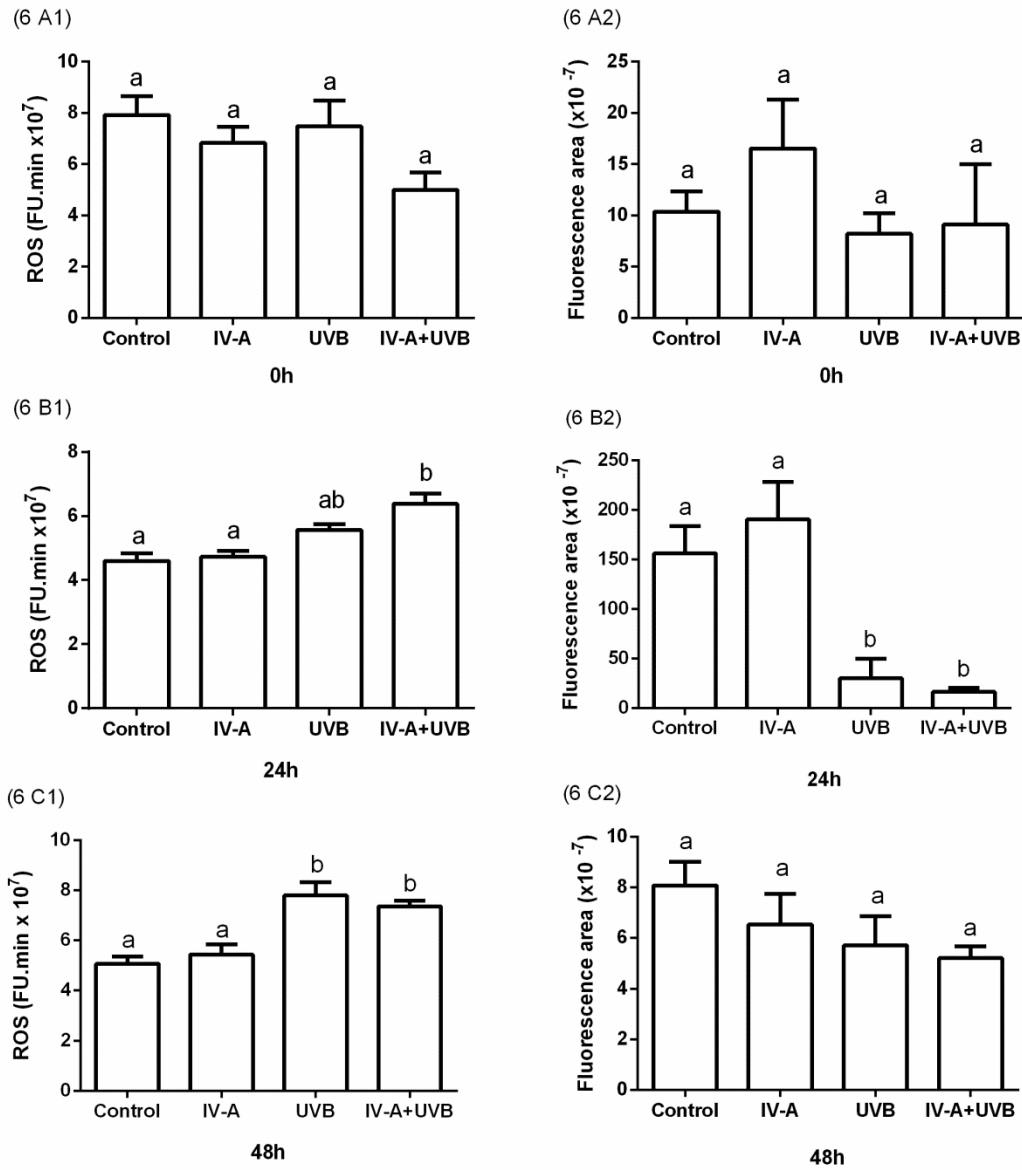


Figure 6: **ROS production (FU.min) and antioxidant capacity (fluorescence area) in melan-a cell line.** Analyses in 0 hours (A1, A2), 24 hours (B1, B2) and 48 hours (C1, C2), after exposed to 0.08 J/cm² of IR-A, 0.015 J/cm² of UVB radiation and interaction between 0.08 J/cm² of IR-A plus 0.015 J/cm² of UVB radiation (IR-A+UVB) and no irradiation (control). Data are expressed as mean \pm standard error. Similar letters indicate absence of significant difference ($p > 0.05$) into each time.

DISCUSSÃO GERAL

Os efeitos da RIV vêm sendo estudados em diferentes modelos biológicos, tanto in vivo como in vitro (Menezes et al., 1998; Liang et al., 2008; Jantschitsch et al., 2009; Wu & Persinger, 2011; Gonzalez et al., 2015). Neste sentido, este estudo buscou avaliar o efeito protetor da RIV-A nos danos citotóxicos induzidos pela radiação UV em uma linhagem celular melanocítica não tumoral, melan-a. Para este objetivo, células da linhagem celular melan-a foram pré-expostas a diferentes doses RIV-A e posteriormente expostas a diferentes doses de UVA ou UVB. As doses escolhidas foram baseadas em curvas de crescimento para as três faixas de radiação e são doses ambientais (Gouveia, 2009; Piazena et al., 2004), o que ressalta a importância deste estudo.

Os principais resultados obtidos revelaram que as radiações UVA, UVB e RIV-A provocaram alterações na viabilidade celular, de forma dose e tempo dependentes. Para análise destes efeitos, foram utilizados os ensaios MTT e azul de trypan. Contudo, os dados mostraram maior sensibilidade de resposta na linhagem melan-a ao ensaio do azul de trypan, comparado ao ensaio de MTT. Além disso, como a RIV tem como um de seus alvos celulares a mitocôndria, mesma molécula analisada no ensaio de MTT, as respostas da RIV podem ter sido mascaradas por este método.

Os resultados de viabilidade celular mostraram que a radiação UVA, não alterou o número de células viáveis pelo teste MTT, exceto na dose $1,2 \text{ J/cm}^2$ em 24 horas. Os resultados observados pelo teste MTT estimularam o uso de doses maiores para análises com teste azul de trypan para esta radiação. Dessa forma, pelo teste azul de trypan, foi observado efeito citotóxico a partir da dose $1,6 \text{ J/cm}^2$ em 24 e 48 horas após exposição. Contudo, a dose $1,2 \text{ J/cm}^2$ estimulou proliferação celular 72 horas após exposição. Este

resultado corrobora com Han e colaboradores (2008 e 2011), os quais observaram aumento no número de queratinócitos viáveis após exposição a radiação UVA

Em exposição a radiação UVB, foi observado a partir de 24 horas, inibição de proliferação celular nas menores doses (0,01 e 0,015 J/cm²) e citotoxicidade nas maiores doses (0,03 e 0,005 J/cm²), sendo estes resultados semelhantes aos observados por outros autores em diferentes modelos de estudo (Menezes et al., 1998; Frank et al., 2006). Entretanto, em exposição à RIV, foi observada inibição de proliferação e citotoxicidade a partir de 24 horas, exceto na dose de 0,8 J/cm². Esta dose não estimulou ou inibiu proliferação celular, permanecendo com viabilidade celular igual ao controle em todos os tempos analisados. Dessa forma, a dose 0,8 J/cm² de RIV foi escolhida para interação com as radiações UVA e UVB, buscando avaliar o efeito protetor dessa radiação.

Para interação com a RIV, foi escolhida a dose 1,2 J/cm² de UVA por induzir proliferação celular e para a radiação UVB a dose de 0,015 J/cm², que provocou inibição de proliferação celular. A escolha das doses objetivou verificar a capacidade da RIV em proteger as células em situações de estresses diferenciadas, em indução de proliferação celular e inibição de proliferação celular.

Na interação entre RIV-A e UVA, o efeito protetor não foi observado, uma vez que o estímulo a proliferação celular se manteve mesmo quando as células foram pré-expostas a RIV. Contudo, o efeito protetor da RIV-A foi observado na interação com a radiação UVB, 24 horas após a exposição. Alguns estudos já demonstraram o efeito benéfico da pré-exposição à RIV-A em células de *Escherichia coli* (Lage et al., 2000), células de fibroblastos (Menezes et al., 1998) e queratinócitos (Jantschitsch et al., 2009). Entretanto, no presente estudo, este efeito não foi observado nos demais tempos analisados, sugerindo a necessidade de reexposição para manutenção do efeito protetor.

A partir das análises de viabilidade, foi observado efeito protetor na interação RIV e UVB. Desta forma, as análises de dano de DNA, peroxidação lipídica e estresse oxidativo foram avaliados apenas nas células expostas a esta interação.

Com base nos resultados, a radiação UVB induziu danos no DNA em todos os tempos analisados, estimulou peroxidação lipídica em 0 e 48h e produção de ERO em 24 e 48 horas após a exposição. Contudo, a interação RIV+UVB diminuiu os danos no DNA e o conteúdo de lipídeos peroxidados induzidos pela exposição à UVB. Esta proteção conferida pela pré-exposição à RIV-A pode estar relacionada com a viabilidade celular observada neste estudo. Chludzińska e colaboradores (2005) não observaram alteração no conteúdo de lipídeos peroxidados após exposição à RIV-A. Assim como, a RIV-A foi capaz de reduzir os danos no DNA induzidos pela radiação UVB, conforme observado por alguns autores (Jantschitsch et al., 2009; Frank et al., 2006). Por outro lado, a pré-exposição à RIV-A não foi capaz de diminuir os danos induzidos por UVB na produção de ERO, assim como não foi capaz de estimular o sistema de defesa antioxidante, resultando em uma situação de estresse oxidativo 24 horas após a exposição.

Sendo assim, este estudo tem como perspectivas avaliar a expressão proteica da proteína P53, devido a sua participação na sinalização do reparo dos danos no DNA e apoptose. Além disso, avaliar a atividade da enzima tirosinase envolvida no metabolismo do pigmento melanina, processo o qual gera ERO no meio intracelular. Assim como, verificar a atividade de enzimas específicas do sistema de defesa antioxidantes que podem estar envolvidas no processo de reparo celular após exposição à UVB, bem como avaliar a capacidade de manutenção do efeito protetor da RIV-A na viabilidade celular, a partir de reexposições a esta radiação.

Em conclusão, a RIV-A foi capaz de reduzir os efeitos citotóxicos induzidos pela radiação UVB. Estes efeitos podem ser resultantes da redução dos níveis de lipídeos peroxidados e dos danos no DNA. Além disso, é importante ressaltar que os resultados demonstrados neste estudo são de responsabilidade desta faixa de radiação e não do calor produzido por ela, uma vez que para os ensaios foi utilizada uma lâmpada LED de RIV.

Referências

- Agrawal T, Gupta GK, Rai V, Carroll JD, Hamblin MR, 2014. Pre-conditioning low-level laser (light) therapy: light before the storm. *Dose-Response* 12: 619–649. ISSN: 1559-3258 DOI: 10.2203.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S, 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* ID 360438 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>.
- Barolet D, 2008. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 27: 227-238.
- Baron ED MD, Suggs AK MD, 2014. Introduction to photobiology. *Dermatol Clin* <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2014.03.002>.
- Bennet DC, Cooper PJ, Hart IR, 1987. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumor promoter for growth. *Int J Cancer* 39: 414-418.
- Birch-Machin MA, Swalwell H, 2010. How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis* 25(2): 101–107.
- Cadet J, Mouret S, Ravanat J-L, Douki T, 2012. Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactions. *Photochem Photobiol* 88: 1048–1065.
- Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D’Almeida V, Correa M, Jasiulionis MG, 2007. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia* 9: 1111–1121.

- Carvalho AA, Da Costa PM, Souza LGDaS, Lemos TL, Alves APNN, Pessoa C, De Moraes MO, 2013. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. *Life Sciences* 93: 201-207.
- Chludzin´ska L, Ananicz E, Jarosawska A, Komorowska M, 2005. Near-infrared radiation protects the red cell membrane against oxidation. *Blood Cells Mol Dis* 35: 74-79.
- Cho S, Shin MH, Kim YK, Seo J-E, Lee YM, Park C-H, Chung JH, 2009. Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings* 14: 15–19; doi:10.1038/jidsymp.2009.7
- Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR, 2012. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng* 40(2): 516–533. doi:10.1007/s10439-011-0454-7.
- Continenza MA, Ricciardi G, Franchitto A, 1993. Effects of low power 904 nm radiation on rat fibroblasts explanted and *in vitro* cultured. *J Photochem Photobiol B: BioL* 19: 231-234.
- Darr D, Fridovich I, 1994. Free-radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 102(5): 671-675.
- Danno K, Mori N, Toda K-i, Kobayashi T, Utani A, 2001. Near-infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17: 261-265.
- Diffey BL, 2002. What is the Light. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18: 68-74.
- Elder DE, 1987. Pathobiology of Malignant Melanoma. Karger, Basel: New York.
- Fischer GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ, 2002. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch Dermatol* 138: 1462-1470.

- Frank S, Menezes S, Lebreton-De Coster C, Oster M, Dubertret L, Coulomb B, 2006. Infrared radiation induces the p53 signaling pathway: role in infrared prevention of ultraviolet B toxicity. *Exp Dermatol* 15: 130–137.
- Gonzalez VC, Beheregaray ACN, Peres BM, Eliza S. V. Sallis ESV, Junior Varela A and Trindade GS, 2015. Histopathological Analysis of UVB and IR Interaction in Rat Skin. *Photochem Photobiol*. DOI: 10.1111/php.12435
- Gottesman MM, Pastan I, 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62: 385-427.
- Gouveia GR, 2009. Penetração da radiação UV na coluna d'água do estuário da Lagoa dos Patos e seus efeitos sobre células e larvas de peixe. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.
- Hamblin MR, Demidova TN, 2006. Mechanisms for Low-Light Therapy, in Barolet D, 2008. *Semin Cutan Med Surg* 27: 227-238.
- Han CY, Hien TT, Lin SC, Kang KW, 2011. Role of Pin1 in UVA-induced cell proliferation and malignant transformation in epidermal cells. *Res Commun* 410: 68-74.
- Han CY, Lim SC, Choi HS, Kang KW, 2008. Induction of ErbB2 by ultraviolet A irradiation: potential role in malignant transformation of keratinocytes. *Cancer Sci* 99(3): 502–509.
- Hermes-Lima M & Zenteno-Savín T, 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol Part C* 133: 537–556.
- Hermes-Lima M, 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation* edited by Kenneth B. Storey. ISBN 0-471-41090-X.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat J-P., Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, DiCara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stemke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DSB, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L, 2012. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell*. 150(2): 251–263.

<http://www.healthyfellow.com/220/skin-aging-and-ellagic-acid/> Acesso em 21/01/15
(Figura 1. Efeitos da radiação UV na pele).

Huang XX, Bernerd F, Halliday GM, 2009. Ultraviolet A within sunlight induces mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin. *Am J Pathol* 174: 1534–1543.

Jantschitsch C, Majewski S, Maeda A, Schwarz T, Schwarz A, 2009. Infrared Radiation Confers Resistance to UV-Induced Apoptosis Via Reduction of DNA Damage and Upregulation of Antiapoptotic Proteins. *J Invest Dermatol* 129: 1271–1279.

Jenkins NC, Grossman D, 2013. Role of melanin in melanocyte dysregulation of reactive oxygen species. *Biomed. Res. Int.* ID 908797
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/908797>.

Jhappan C, Noonan FP, Merlino G, 2003. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22: 3099–112.

Johnstone DM et al., 2014. Indirect application of near infrared light induces neuroprotection in a mouse model of Parkinsonism – An abscopal neuroprotective effect. *Neuroscience*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.023>.

- Juzeniene A, Brekke P, Dahlback A, Andersson-Engels S, Reichrath J, Moan K, Holick MF, Grant WB, Moan J, 2011. Solar radiation and human health. *Rep. Prog. Phys.* 74: 066701 doi:10.1088/0034-4885/74/6/066701.
- Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel ZA, 2003. Cutaneous Photobiology. The melanocyte vs. the sun: Who will win the final round? *Pigment Cell Res.* 16: 434-447.
- Kanavy HE, Gerstenblith MR, 2011. Ultraviolet Radiation and Melanoma. *Photodermatology: Current Principles and Practice* 30 (4): 222–228.
- Kim HH, Lee MJ, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC, 2005. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech Ageing Dev* 126(11): 1170–1177.
- Knels L, Valtink M, Marin JDelaV, Steiner G, Roehlecke C, Krueger A, Funk RHW, 2012. Effects of Temperature and Water-Filtered Infrared-A Alone or in Combination on Healthy and Glyoxal-Stressed Fibroblast Cultures. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* ID 274953 doi:10.1155/2012/274953.
- Kochevar IE, Taylor CR, Krutmann J, 2008. Fundamentals of cutaneous photobiology and photoimmunology. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz S, Gilchrest B, Paller AS, Lefell DJ (Eds.), *Fitapatrik's Dermatology in General Medicine*, seventh ed. McGraw-Hill, New York.
- Kozma B, Eide MJ, 2014. Photocarcinogenesis an epidemiologic perspective on Ultraviolet Light and Skin Cancer. *Dermatol Clin* 32: 301–313.
- Lage C, Teixeira PCN, Leitão AC, 2000. Non-coherent visible and infrared radiation increase survival to UV (254 nm) *Escherichia coli* K12. *C. J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 54: 155–161.

- Lee JH, Roh MR and Lee KH, 2006. Effects of Infrared Radiation on Skin Photo-Aging and Pigmentation. *Yonsei Medical Journal* 47(4): 485 – 490.
- Lee L-A, Roques S, 2002. Biological Actions of Infrared Radiation. Sensing, Signaling and Cell Adaptation. Edited by Storey KB and Storey JM, *Elsevier Science B.V.*
- Liang HL, Whelan HT, Eells JT, Wong-Riley TT, 2008. Near-infrared light via light-emitting diode treatment is therapeutic against rotenone and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. *Neuroscience* 153: 963–974.
- Meierjohann S, 2014. Oxidative stress in melanocyte senescence and melanoma transformation. *European Journal of Cell Biology* 93: 36–41.
- Menezes S, Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L, 1998. Noncoherent near infrared radiation protects normal human dermal fibroblasts from solar ultraviolet toxicity. *J Invest Dermatol* 111: 629–633.
- Miller AJ, Mihm Jr, MC, 2006. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355: 51–65.
- Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA, 2009. Fisiopatologia do melasma. *An Bras Dermatol* 84(6): 623-635.
- Molognoni F, de Melo FHM, da Silva CT, Jasiulionis MG, 2013. Ras and Rac1, Frequently Mutated in Melanomas, Are Activated by Superoxide Anion, Modulate Dnmt1 Level and Are Causally Related to Melanocyte Malignant Transformation. *PLoS ONE* 8(12): e81937
- Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL, 2010. Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology* 49: 978–986.
- Noonan FP, Zaidi MR, Wolnicka-Glubisz A, Anver MR, Bahn J, Wielgus A, Jean Cadet J, Douki T, Mouret S, Tucker MA, Popratiloff A, Merlino G, De Fabo EC, 2012. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nature communications* 3:884 DOI: 10.1038/ncomms1893

- Nordlund JJ, 2007. The Melanocyte and the Epidermal Melanin Unit: An Expanded Concept. *Dermatol Clin* 25: 271–281.
- Norval M, Lucas R, Cullen AP, De Gruijl F, Longstreth J, Takizawa Y, Van der Leun JC, 2011. The human health effects of ozone depletion and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 10: 199–225.
- Oh J-H, Chung A-S, Steinbrenner H, Sies H, Brenneisen P, 2004. Thioredoxin secreted upon ultraviolet A irradiation modulates activities of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 218–226.
- Pamplona R & Constantini D, 2001. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R843–R863 doi:10.1152/ajpregu.00034.2011.
- Peres PS, Terra VA, Guarnier FA, Cecchini R, Cecchini AL, 2011. Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin. *J Photochem Photobiol B: Biology* 103: 93–97.
- Pfeifer GP, Young-Hyun Youl Y-H, Besaratinia A, 2005. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutation Research* 571: 19–31.
- Piazena H, Meffert H, 2004. Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei Infrarot- Bestrahlung der Haut und die Extrapolation der Daten von in vitro-Messungen auf die Bedingungen in vivo - Erfordernisse und Fehler [Dosis related effects during infrared irradiation of the skin and the extrapolation of the data from in vitro measurements to in vivo conditions - requirements and errors]. Lecture presented at the symposium entitled “Water-tered infrared-A (wIRA) in dermatology” of the Dr. med. h.c. Erwin Braun Foundation in Liestal/Basel, Switzerland, November 20, apud Gebbers, N., Hirt-Burri, N., Scaletta, C., Hoffman, G. and L. A. Applegate (2007). Water-

- Filtered Infrared-A radiation (wIRA) is not implicated in cellular degeneration of human skin. *Ger Med Sci* 5, Doc8.
- Pinon A, Limami Y, Micallef L, Cook-Moreau J, Liagre B, Delage, Duval RE, Simon A, 2011. A novel form of melanoma apoptosis resistance: Melanogenesis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delays ursolic acid-triggered cell death. *Exp. Cell Res.* 317: 1669-1676.
- Pinto RA, 2008. Projeto de Implementação de lâmpadas para iluminação de interiores empregando diodos emissores de luz (LEDS). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
- Pirev E, Calles C, Schroeder P, Sies H, Kröncke K-D, 2008. Ultraviolet-A irradiation but not ultraviolet-B or infrared-A irradiation leads to a disturbed zinc homeostasis in cells. *Free Rad Biol & Med* 45: 86–91.
- Polsky D, Cordon-Cardo C, 2003. Oncogenes in melanoma. *Oncogene* 22: 3087–3091
- Ravanat J-L, Douki T, Cadet J, 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B: Biology* 63: 88–102.
- Rouzaud F, Kadarko AL, Abdel-Malek ZA, Hearing VJ, 2005. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutation Research* 57: 133–152
- Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J, 2003. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19: 228–234.
- Schroeder P, Krutmann J, 2011. Infrared A radiation effects on the skin. *Piel Formacion Continuada em Dermatologia* 26(6): 259–262.
- Schroeder P, Haendeler J, Krutmann J 2008. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Exper Gerontol* 43: 629–632.

- Sharma A, Shah SR, Illum H, Dowell J, 2012. Vemurafenib: targeted inhibition of mutated BRAF for treatment of advanced melanoma and its potential in other malignancies. *Drugs* 72(17): 2207–22.
- Smit NP, van Nieuwpoort FA, Marrot L, Out C, Poorthuis B, van Pelt H, Meunier JR, Pavel S, 2008. Increased melanogenesis is a risk factor for oxidative DNA damage – study on cultured melanocytes and atypical nevus cells. *Photochem.Photobiol.* 84: 550–555.
- Song J, Gao T, Ye M, Bi H, Liu G, 2012. The photocytotoxicity of different lights on mammalian cells in interior lighting system. *J. Photochem Photobiol B: Biology* 117: 13–18.
- Swalwell H, Latimer J, Haywood RM, Birch-Machin MA, 2012. Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radical Biology & Medicine* 52: 626–634.
- Toyokawa H, Matsui Y, Uhara J, Tsuchiya H, Teshima S, Nakanishi H, Kwon A-H, Azuma Y, Nagaoka T, Ogawa T, Kamiyama Y, 2003. Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exp Biol Med* 228: 724–729.
- Turrens JF, 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(2): 335–344.
- Wang F, Ge T, Gao Q, Hu K, Yu J, Liu Y, 2014. The distribution of biologically effective UV spectral irradiances received on a manikin face that cause erythema and skin cancer. *J. Photochem. Photobiol B: Biology* 140: 205–214.

- Wong-Riley MTT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, Kane M, Whelan HT, 2005. Photobiomodulation Directly Benefits Primary Neurons Functionally Inactivated by Toxins. *The J Biol Chem* 280(6): 4761–4771.
- Wu H-PP & Persinger MA, 2011. Increased mobility and stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* induced by 880 nm light emitting diode. *J. Photochem Photobiol B: Biology* 102: 156-160.
- Yokoyama K and Oku T, 1999. Rheumatoid arthritis affected temporo-mandibular joint pain analgesia by linear polarized near infrared irradiation. Clinical Report. *Canadian Journal of Anesthesia*.