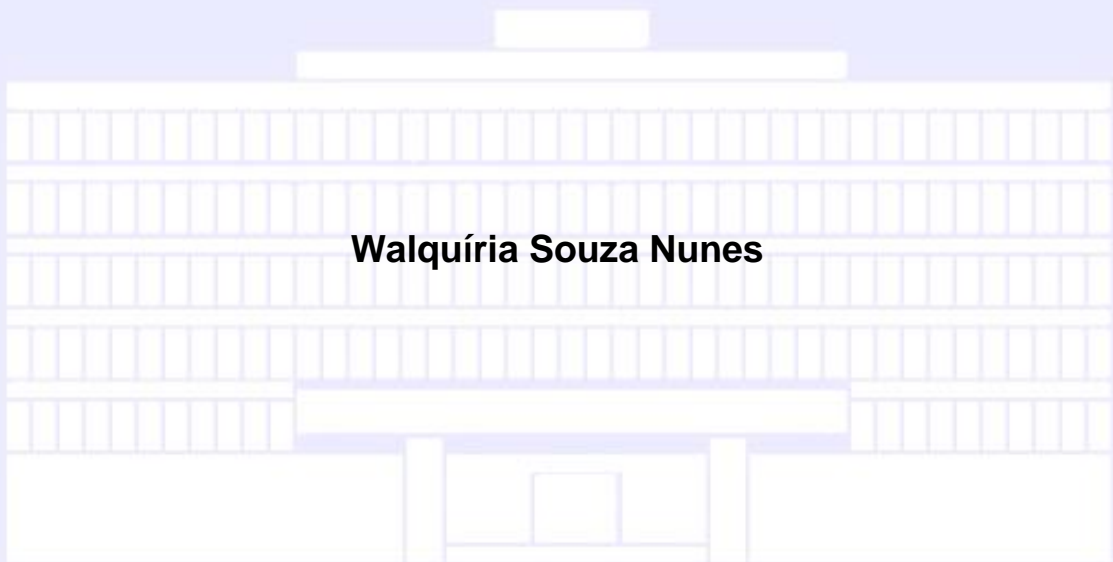


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**



Walquíria Souza Nunes

**Análise da Sinalização Purinérgica em
Células Epidermais Humanas após
Exposição à Radiação Ultravioleta**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2021

WALQUÍRIA SOUZA NUNES

Análise da Sinalização Purinérgica em Células Epidermais Humanas após Exposição à Radiação Ultravioleta

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de mestre

Orientadora: Dra. Márcia Rosângela Wink

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Santin Bertoni

Porto Alegre

2021

Catálogo na Publicação

Nunes, Walquíria Souza

Análise da Sinalização Purinérgica em Células Epidermais Humanas após Exposição à Radiação Ultravioleta / Walquíria Souza Nunes. -- 2021.

82 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2021.

Orientador(a): Profa. Dra. Márcia Rosângela Wink ;
coorientador(a): Dra. Ana Paula Santin Bertoni.

1. Sinalização purinérgica. 2. Radiação ultravioleta.
3. Células epidermais humanas. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Os resultados apresentados nessa dissertação foram realizados no Laboratório de Biologia Celular que é coordenado pela prof. Dra. Márcia Wink. O laboratório é situado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), no 6º andar do prédio 3. As irradiações foram realizadas pelo equipamento Bio-Sun que se encontra na Unidade de Bioanalítica, laboratório multiusuário situado no 6º andar do prédio 3 da UFCSPA.

Este trabalho foi financiado por: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer de todo o coração à professora Dra. Márcia Wink por ter me aceito em seu laboratório e por ter me dado todas as ferramentas necessárias para a elaboração do meu mestrado. Agradeço por todo o seu carinho, sua paciência e seu incentivo durante esse período. Tenho total certeza de que essa experiência foi ímpar em minha vida, pois pude aprender muito e evoluir como profissional e como indivíduo.

Quero agradecer de maneira muito especial à Dra. Ana Paula Santin, minha co-orientadora. Com toda a certeza, o seu auxílio foi indispensável para que eu concluísse o meu mestrado. Obrigada pela ajuda no planejamento e na realização dos experimentos, pelo auxílio na estatística e pela correção da parte da escrita. Além de ser uma excelente co-orientadora, a Dra. Ana é um grande exemplo de colega e de pesquisadora. Sou muito grata por todo o seu apoio e suporte durante esse período.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, pois eles fizeram a caminhada ser prazerosa e recompensadora. Agradeço às doutorandas Liliana Naasani, Giselle Moraes, Dominique Rubenich, Samlai Vedovatto e Thaís Casagrande por toda a ajuda e conselhos ao longo deste período. Às pós-doutorandas Isabele Iser e Raquel Beckenkamp pelos esclarecimentos de dúvidas e fornecimento de ideias de experimentos. Às mestrandas Estefany Ghisio e Laura Pozzobon pelo apoio, pelas risadas e por, muitas vezes, terem dividido o desespero do mestrado comigo. Por fim, gostaria de agradecer ao aluno de iniciação científica Rafael Brasil, pela ajuda na parte operacional dos experimentos científicos. Agradeço de modo geral a todos os colegas do Laboratório de Biologia Celular por terem me proporcionado um ambiente propício ao aprendizado.

Gostaria de agradecer algumas pessoas que auxiliaram em pontos-chave do meu mestrado. À Keli Cristine Reiter, a técnica responsável pela Unidade de Bioanalítica, local onde o irradiador – equipamento relevante utilizado em meu mestrado – se encontrava. Sou grata pela sua hospitalidade e gentileza. Agradeço também ao prof. Dr. Marcelo Schwarcke pela ajuda na certificação da qualidade e calibração do equipamento de irradiação. Ademais, sou grata ao prof. Dr. Guido Lenz

e a prof. Dra. Dinara Moura por terem aceito compor a minha Comissão de Acompanhamento e por todos os esclarecimentos e auxílio fornecido.

Gostaria fortemente de agradecer aos meus pais. Sempre recebi apoio para continuar os meus estudos e progredir em minha vida profissional. Como meus pais não atuam na área da saúde, muitas vezes eles não entendiam exatamente o que eu estava estudando. Entretanto, sempre me apoiaram e me forneceram todos os subsídios necessários para que eu pudesse permanecer na faculdade e, posteriormente, concluir o meu mestrado. Para mim isso é, sem a menor dúvida, uma grande prova de amor. Sou muito grata por todo o incentivo e por entenderem que muitas vezes eu não poderia estar presente nos eventos de família.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer com todo amor e carinho ao meu “namorado” Angelo Engelke. Durante o período do mestrado nós fomos morar juntos e essa tem sido uma experiência incrível para mim. Obrigada por me entender, me apoiar incondicionalmente, por me esperar para me levar para casa quando fiquei até tarde no laboratório, por compreender que eu precisava trabalhar nos finais de semana, por ficar feliz quando eu chegava animada em casa falando sobre os experimentos e por escolher dividir sua vida comigo.

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1. RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	15
1.1 Radiação Solar	15
1.2 Radiação Ultravioleta	17
1.3 Estudos com Irradiação	18
2. PELE HUMANA	21
2.1 Epiderme	22
2.2 Derme	25
2.3 Efeitos da Exposição Cutânea à Radiação Ultravioleta	26
3. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA	28
3.1 Purinoreceptores	29
3.2 Ecto-enzimas	30
JUSTIFICATIVA	33
OBJETIVOS	34
1. Objetivo Geral	34
2. Objetivos Específicos	34
CAPÍTULO 1: PURINERGIC SIGNALING IN HUMAN EPIDERMAL CELLS AFTER EXPOSURE TO ULTRAVIOLET RADIATION: A SYSTEMATIC REVIEW AND IN SILICO INVESTIGATION	35
CAPÍTULO 2: CHARACTERIZATION OF ECTONUCLEOTIDASES ACTIVITY IN HACAT AFTER ULTRAVIOLET RADIATION EXPOSURE	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	67
CURRICULO LATTES	78

LISTA DE ABREVIATURAS

α-MSH	Hormônio estimulante de α -melanócitos, do inglês " <i>α-melanocyte stimulating hormone</i> "
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina di-fosfato
AMP	Adenosina mono-fosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
ATPe	ATP extracelular
CL	Célula de Langherans
DPC	Dímero de pirimidina de ciclobutano
MEC	Matriz extracelular
MED	Dose mínima de eritema, do inglês " <i>minimal erythema dose</i> "
NHEF	Fibroblasto primário epidérmico humano normal, do inglês " <i>normal human epidermal primary fibroblast</i> "
NHEK	Queratinócito primário epidérmico humano normal, do inglês " <i>normal human epidermal primary keratinocyte</i> "
NHEM	Melanócito primário epidérmico humano normal, do inglês " <i>normal human epidermal primary melanocyte</i> "
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês " <i>reactive oxygen species</i> "
RUV	Radiação ultravioleta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês " <i>tumor necrosis factor-alpha</i> "

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura Interna do Sol.	Página 15
Figura 2	Espectro Categorizado pelo Intervalo de Comprimento de Ondas Emitido pela Radiação Solar.	Página 16
Figura 3	Espectro Categorizado pelo Intervalo de Comprimento de Ondas da Radiação Ultravioleta.	Página 17
Figura 4	Foto do Equipamento Bio-Sun.	Página 20
Figura 5	<i>Display</i> do painel de configurações.	Página 20
Figura 6	Imagem Esquemática do Sistema Tegumentar Humano.	Página 21
Figura 7	Imagem Esquemática da Epiderme.	Página 22
Figura 8	Imagem Esquemática dos Componentes da Ultraestrutura do Desmossomo.	Página 24
Figura 9	Queratinócito e Melanócito Humano.	Página 25
Figura 10	Imagem Esquemática da Derme.	Página 26
Figura 11	Vias de ativação de células epidermais após exposição à RUV.	Página 27
Figura 12	Esquema Geral dos Componentes da Sinalização Purinérgica.	Página 28
Figura 13	Locais de Clivagem das Ectoenzimas.	Página 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais Terminologias Utilizadas para a Quantificação da Radiação Óptica.	Página 17
Tabela 2	Experimentos e Informações Experimentais.	Página 18

RESUMO

A exposição cutânea à radiação ultravioleta (RUV) é um efeito ambiental inerente à vida humana. Já foi observado, em estudos *in vitro*, que essa exposição induz a liberação de ATP de células epidermais, principalmente em queratinócitos. O ATP é fundamental para a célula, pois fornece a energia livre de que essas células necessitam para realizar suas atividades. Entretanto, sua presença no espaço extracelular possibilita seu desempenho como molécula de sinalização intercelular. Essa comunicação ocorre através de nucleotídeos e nucleosídeos, dos receptores (divididos em família P1 e P2), bem como das ectonucleotidases que atuam hidrolisando os ligantes, regulando assim a sua disponibilidade. Todos esses componentes formam a sinalização purinérgica, sendo esse sistema envolvido em vários processos patofisiológicos cutâneos. Assim, nosso objetivo foi avaliar se a exposição à radiação ultravioleta é capaz de modular componentes da sinalização purinérgica. Para isso, foi realizada uma revisão sistemática e uma análise *in silico* para verificação da modulação de purinoreceptores e ectoenzimas após a exposição à RUV. Ademais, foi realizado experimentos de bancada com o intuito de avaliar a atividade enzimática em células Hacat após exposição à UVA e UVB. Os resultados oriundos da revisão sistemática apontam que o ATP é rapidamente liberado de células epidermais, queratinócitos e melanócitos, após a exposição a RUV (1-10 minutos); essa molécula age como um mediador pró-inflamatório induzindo a liberação de IL-1 β , IL-6 e COX-2 de queratinócitos e, somado ao caráter inflamatório, o ATP possui um papel na melanogênese e esse processo parece ser dependente do receptor P2X7. As análises *in silico* não indicam modulação em nenhum elemento da sinalização purinérgica (purinoreceptores ou ectonucleotidases) em melanócitos após a exposição única à RUV nas condições investigadas. Por outro lado, queratinócitos irradiados apresentam um aumento na expressão gênica de P2X4, P2Y11 e P2Y13, e diminuição na expressão de P2Y2. Além disso, as análises *in silico* indicam aumento nos níveis dos genes *ENPP1* e *ENTPD4*, além de sugerir diminuição nos níveis de *ENTPD6*. A partir dos resultados experimentais, não foi observado modulação no gene *NT5E*, que codifica CD73, após única exposição à radiação ultravioleta em queratinócitos. Queratinócitos imortalizados expostos à 3 e 6J/cm² não apresentam modulação na expressão de NT5E quando comparados ao grupo controle. Esses resultados sugerem o envolvimento da sinalização purinérgica na sinalização parácrina entre o melanócito e o queratinócito após à radiação ultravioleta. Uma melhor compreensão dessa modulação poderá contribuir para um entendimento mais profundo de diversas alterações cutâneas, bem como auxiliar na compreensão de processos fisiológicos, como a pigmentação. Esse conhecimento poderá ser utilizado tanto para uma melhor condução de tratamentos dermatológicos, quanto para elaboração de produtos na indústria farmacêutica voltados para a área estética.

Palavras-Chave: radiação ultravioleta, UVA, UVB, queratinócito, melanócito, sinalização purinérgica, ATP, pele, epiderme.

ABSTRACT

Skin exposure to ultraviolet radiation (UVR) is an environmental effect of human live. Already been shown, in vitro studies, UVR exposure induces release ATP from epidermal cells, especially keratinocytes. ATP is critical to the cell as it provides the free energy these cells need to carry out their activities. However, its presence in extracellular space enables role as an intercellular signaling molecule. This communication occurs through of nucleotides and nucleosides, receptors (classified in P1 and P2 families) as well as ectonucleotidases that act by hydrolyzing the ligands, regulating their availability. All of these players composed purinergic signaling, and this system is involved in various cutaneous pathophysiological processes. Thus, our objective was to evaluate whether exposure to ultraviolet radiation is able to modulate components of purinergic signaling. For this, a systematic review and an in silico analysis was carried out to verify the modulation of purinoreceptors and ectoenzymes after exposure to UVR. Furthermore, experiments were carried out in order to evaluate the enzymatic activity in Hacat cells after exposure to UVA and UVB. Results from systematic review indicate that ATP is rapidly released from epidermal cells, keratinocytes and melanocytes, after UVR exposure (1-10 minutes); this molecule acts as a pro-inflammatory mediator and induce release of IL-1 β , IL-6 and COX-2 from keratinocytes. In addition to the inflammatory character, ATP has a role in melanogenesis and this process appears to be dependent on P2X7 receptor. Beyond to this receptor, presence of other purinoreceptors in human melanocytes was identified (P2X2, P2X4, P2Y1 and P2Y11). However, in silico analyzes do not indicate modulation in any element of purinergic signaling (purinoreceptors or ectonucleotidases) in melanocytes after only exposure to UVR. On the other hand, irradiated keratinocytes showed increase in P2X4, P2Y11 and P2Y13 gene expression and a decrease in P2Y2 expression. In silico analyzes indicated an increase in the levels of the *ENPP1* and *ENTPD4* genes, in addition to suggest decrease in the *ENTPD6* levels. There is no evidence of modulation in the *NT5E* gene, which encodes CD73, in keratinocytes after only exposure to UVR. Hacat exposed to 3 and 6J/cm² did not modulated expression of NT5E when compared with control group. These results suggest purinergic signaling is modulated by exposure to ultraviolet radiation. A better understanding of this modulation can contribute to a deeper understanding of several skin changes, as well as contribute with the knowledge about physiological processes, such as pigmentation. This knowledge can be used for a better conduction of dermatological treatments and for the elaboration of products in the pharmaceutical industry aimed at the aesthetic area.

Keywords: Ultraviolet radiation, UVA, UVB, keratinocyte, melanocyte, purinergic signaling, ATP, skin, epidermal.

APRESENTAÇÃO

Caro leitor,

Todos os resultados oriundos dessa dissertação serão apresentados sob a forma de artigos científicos. O capítulo 1 é intitulado “*Purinergic Signaling in Human Epidermal Cells after Exposure to Ultraviolet Radiation: a Systematic Review and In Silico Investigation*” e refere-se aos resultados oriundos de revisão sistemática e de investigação *in silico*. Já o capítulo 2, intitulado “*Characterization of Ectonucleotidases Activity in Hacat after Ultraviolet Radiation Exposure*”, refere-se resultados preliminares obtidos de experimentos de bancada.

As seções “materiais e métodos”, “resultados” e “discussão” referente a cada estudo encontram-se descritas no próprio artigo. A seção “referências” ao final dessa dissertação contém as fontes das citações descritas ao longo da dissertação. Os artigos elaborados nos capítulos 1 e 2 estão estruturados de acordo com as normas da revista *British Journal of Dermatology* cujo fator de impacto é 7,0 (2019). As normas exigidas pela revista estão presentes no link abaixo:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652133/homepage/forauthors.html>

Obrigada pela atenção. Desejo que você tenha uma ótima leitura!

Com carinho,

Wal

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

1.1 Radiação Solar

O Sol é a estrela que está no centro geométrico e gravitacional do nosso sistema solar e sua radiação é a principal fonte de energia que influencia o clima e a atmosfera da Terra¹. A distância entre o nosso planeta e o Sol é de aproximadamente 150 milhões de quilômetros, o que torna a Terra um local ideal para a existência e para a manutenção da vida humana². O Sol, assim como qualquer estrela, possui um corpo gasoso e é composto principalmente por hidrogênio e hélio³. Sua estrutura pode ser dividida em região externa (atmosfera solar) e interna (interior solar). As estruturas internas são categorizadas de acordo com cada processo (**Figura 1**).

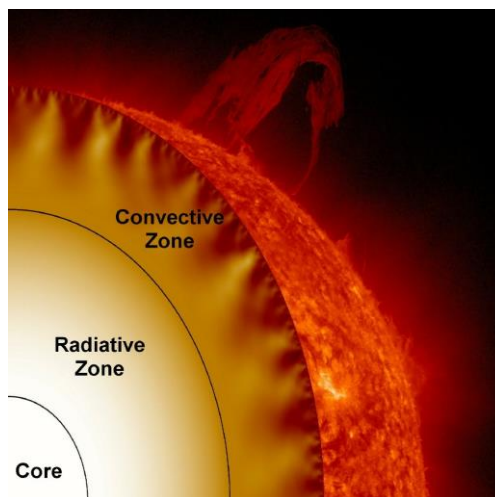


Figura 1 - Estrutura Interna do Sol. Podemos perceber que a estrutura mais interna é o núcleo ("core"), seguido da zona radiativa e por fim, zona convectiva. (Fonte: <https://solarscience.msfc.nasa.gov/>. Visualizado em 24/07/2020)

A energia é gerada no núcleo e é difundida para fora, pela radiação, através da zona radiativa e por fluxos de fluido convectivo através da zona convectiva. O núcleo apresenta uma condição de altíssima temperatura e pressão, fazendo com que nessa região, o gás se encontre no estado ionizado - o plasma. É nesse local em que ocorrem as reações de fusão nuclear, em que há o consumo de hidrogênio e a geração do hélio. A maior parte da energia gerada dessas reações é utilizada para manter as condições de temperatura e de pressão internas, mas uma fração é emitida

pela superfície solar através de fótons, atingindo outros corpos espaciais³. Os fótons se propagam como ondas eletromagnéticas, o que torna a radiação solar um espectro contínuo, podendo ser dividido de acordo com o conteúdo energético e com o intervalo de comprimento de onda (**Figura 2**).

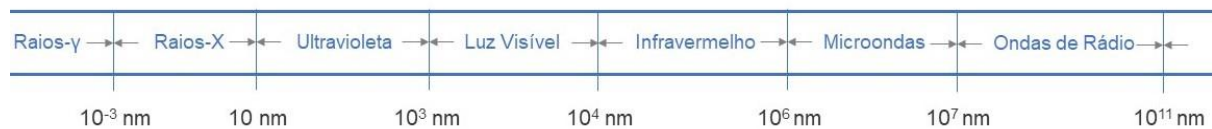


Figura 2 - Espectro Categorizado pelo Intervalo de Comprimento de Ondas Emitido pela Radiação Solar (Fonte: Adaptado de ISO 21348 - 2004)

A partir de comparações entre medições via satélite do topo da atmosfera e avaliações em inúmeros pontos terrestres em diferentes regiões geográficas, podemos comprovar que nem toda a radiação emitida pelo sol atinge a superfície da Terra⁴⁻⁷. Apesar de haver alterações dependentes de parâmetros astronômicos e atmosféricos como ângulo zenital solar, humidade e espessura da camada de ozônio, podemos considerar que cerca de 30% da energia solar é refletida e o restante é absorvido pela camada atmosférica ou pela superfície do nosso planeta^{8,9}. Essa fração que é absorvida é indispensável para a existência da vida na Terra, uma vez que a radiação solar é a principal fonte de energia, luz e temperatura que mantem o nosso planeta em condições ideais para a existência humana. Ademais, a radiação solar tem um papel relevante na manutenção dos níveis de oxigênio, devido a sua participação fundamental no processo de fotossíntese. Entretanto, a excessiva e crônica exposição à radiação solar acarreta prejuízos cutâneos, como envelhecimento extrínseco^{10,11}, processos inflamatórios¹², alterações pigmentares¹³ e de ciclo celular¹⁴, além de ser o principal fator ambiental relacionado com o desencadeamento de cânceres de pele¹⁵. Sob esse contexto, a radiação ultravioleta (RUV) possui um papel ímpar por ser a faixa da radiação solar com menor comprimento de onda e por consequência maior energia, que atinge a superfície terrestre.

1.2 Radiação Ultravioleta

Podemos classificar a radiação ultravioleta como não-ionizante e subdividi-la em três bandas considerando suas propriedades físicas, atividade biológica e capacidade de penetração cutânea: UVC (100 – 280nm), UVB (280 – 315nm) e UVA (315 – 400nm)¹⁶ (**Figura 3**). O ozônio atmosférico bloqueia uma grande fração da radiação ultravioleta, a UVC é absorvida quase totalmente por essa camada e a radiação ultravioleta que atinge a superfície terrestre é composta por UVA (90-95%) e UVB (5-10%)^{15,17}.

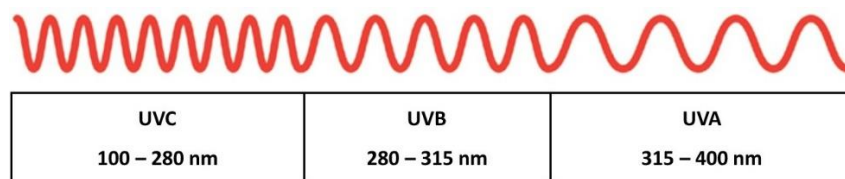


Figura 3 - Espectro Categorizado pelo Intervalo de Comprimento de Ondas da Radiação Ultravioleta
(Fonte: Adaptado de Mancebo S. & Wang S., 2014)

Há uma correlação inversamente proporcional entre o comprimento de onda e a frequência. O comprimento de onda é a distância entre dois pontos repetidos e sucessivos de uma onda, é representado pela letra grega λ e expresso em nanômetros de acordo com o Sistema Internacional de Medidas. Já a frequência se refere à quantidade de oscilações de uma onda em determinado tempo (dado em segundos), é representada pela letra grega “ ν ” (ni) e expressa em *hertz*. Ao interagir com tecidos biológicos, os fótons liberam sua energia. Esse processo é explicado pela Lei de Planck, onde $E = h \nu$. A letra “ E ” se refere a energia emitida pelo fóton, a letra “ h ” é a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J.s) e a letra “ f ” é a frequência. Podemos observar que quanto menor o comprimento de onda, maior será a frequência e, por consequência, maior será a energia associada ao fóton. Sendo assim, podemos concluir que apesar da radiação ultravioleta que atinge a superfície terrestre ser primordialmente composta de UVA, UVB apresenta maior energia e possui um papel altamente relevante nas alterações cutâneas oriundas da exposição solar. Os danos celulares desencadeados por essa exposição serão discutidos no tópico “2.3 Efeitos da Exposição Cutânea à Radiação Ultravioleta”.

1.3 Estudos com Irradiação

Os sistemas radiométricos e fotométricos são utilizados para caracterizar fontes de luz. A radiometria pode ser aplicada em todas as fontes ópticas (incluindo a radiação solar e ultravioleta), enquanto a fotometria é aplicada para descrever apenas fontes de luz visível. Sendo assim, para uma correta quantificação dos efeitos fotobiológicos oriundos da exposição à RUV é necessária a utilização do sistema radiométrico. Essa caracterização inclui a utilização de um radiômetro para verificação da acurácia do equipamento, bem como o entendimento das principais unidades de medida fornecidas pelos aparelhos (**Tabela 1**). Algumas dessas unidades foram definidas em 1954 no Primeiro Congresso Internacional de Fotobiologia.

Termo	Unidade SI	Informações Adicionais
Comprimento de Onda	nm	Distância entre dois pontos repetidos e sucessivos da onda. Símbolo: λ
Potência	W	Watt (W). É uma unidade de potência e refere-se a energia emitida por um determinado tempo. $W = J \times t$ (segundos)
Energia	J	Joule (J). Refere-se a energia total contida em um campo ou a energia total entregue a um determinado receptor. $J = W \times t$
Exposição	J/m ²	Energia fornecida a uma determinada área. Também pode ser chamado de “fluência”, “dose de exposição” ou “dose”. Além da expressão no padrão internacional, pode ser utilizado J/cm ² ou mJ/cm ² .
Irradiância	W/m ²	Fluxo de radiação que atinge uma determinada área. Também pode ser chamado de “razão da fluência”, “razão de dose” ou “intensidade”. Além da expressão no padrão internacional, pode ser utilizado W/cm ² ou mW/cm ² .

Tabela 1 – Principais Terminologias Utilizadas para a Quantificação da Radiação Óptica (Fonte: Adaptado de IARC, 1992)

Existem vários equipamentos que possibilitam o estudo *in vitro* dos efeitos da exposição à radiação solar em células e tecidos biológicos. O tipo de radiação utilizada, bem como a dose e a quantidade de exposições variam de acordo com o objetivo de cada experimento (**Tabela 2**). Ademais, existem outras unidades de

medida para a definição da dose aplicada para a exposição cutânea, como a “dose mínima de eritema”, do inglês “*minimal erythema dose*” abreviada comumente como MED. Essa unidade é definida como a menor dose capaz de induzir eritema visível na pele após 8-24h da exposição¹⁸. Essa medida varia com a sensibilidade cutânea de cada indivíduo e com a percepção da vermelhidão mínima de cada observador. Sob esse contexto, podemos notar que há certas divergências experimentais em estudos com exposição cutânea à radiação solar que podem gerar estímulos biológicos diferentes ocasionando possíveis resultados discrepantes e de difícil comparação.

Autor / Ano	Objetivo do Experimento	Informação da Radiação				Equipamento
		Tipo	Emissão (nm)	Dose (mJ/cm ²)	Representação em MED	
Lee E.J. <i>et al.</i> / 2019	Avaliação da fototoxicidade e liberação de ATP em NHEK e NHEM	UVB	312	10 - 200	-	Spectronics Corp, Westbury, NY (USA)
Henn J.G. <i>et al.</i> / 2018	Avaliação da possível fototoxicidade do verbascosídeo em linhagem de fibroblasto de murino	UVA	365	5.000	-	Bio-Sun System, Vilber-Lourmat (Germany)
Ferrucio B. <i>et al.</i> / 2017	Caracterização de dano da radiação solar associada ao carbaril em NHEM	SSR*	280 – 1000	375	-	Sciencetech Inc., Ontario (Canada)
Kawano A. <i>et al.</i> / 2015	Avaliação da fototoxicidade e liberação de IL-6 em HaCat	UVA	360	2.500 – 10.000	-	Sankyo Denki, Tokyo (Japan)
Choi W. <i>et al.</i> / 2010	Avaliação de diferentes mecanismos de pigmentação após exposição de diferentes comprimentos de RUV	ssUVR**	290 e 320	-	5x 0,4 e 0,5	Oriel Instruments, Stratford (USA)

Tabela 2 - Equipamentos e Informações Experimentais. **Legenda:** **NHEK:** do inglês “*Normal Human Epidermal Keratinocyte*”; **NHEM:** do inglês “*Normal Human Epidermal Melanocyte*”; **HaCat:** queratinócito epidermal humano imortalizado; **ssUVR:** do inglês “*Solar Simulated Ultraviolet Radiation*”; **Os grupos foram divididos em UVA, UVB ou UVA+UVB e todos receberam 5 exposições. **SSR:** do inglês “*Solar Simulated Radiation*”; *O equipamento de simulação de radiação solar inclui ondas eletromagnéticas no comprimento de UVB, UVA, luz visível e infravermelho.

De forma geral, cada equipamento é composto de uma parte externa que protege o operador da irradiação, uma região onde será colocado o material biológico que será exposto e um painel de configuração. A Unidade de Bioanalítica da

UFCSPA, situada no sexto andar do prédio 3, é equipada com o irradiador Bio-Sun (**Figura 4 e 5**). O equipamento Bio-Sun é um sistema de irradiação projetado para atuar nos comprimentos de onda de 312 e 365 nm, ambos estão dentro da faixa de ultravioleta, sendo o 312 nm correspondente ao UVB e o 365 nm ao UVA. A exposição pode ser realizada com ambas as irradiações ou separadamente. É possível aplicar a irradiação em microplacas de cultivo celular ou placas de petri, bem como configurar a dose (J/cm^2) que se deseja utilizar.



Figura 4 – Foto do Equipamento Bio-Sun. **(A)** Cabo de energia que deve ser colocado na tomada de 220V. **(B)** Painel de configuração do equipamento. **(C)** Bandeja onde deve ser colocada a microplaca de cultivo celular ou placa de petri. **(D)** Botão liga/desliga.

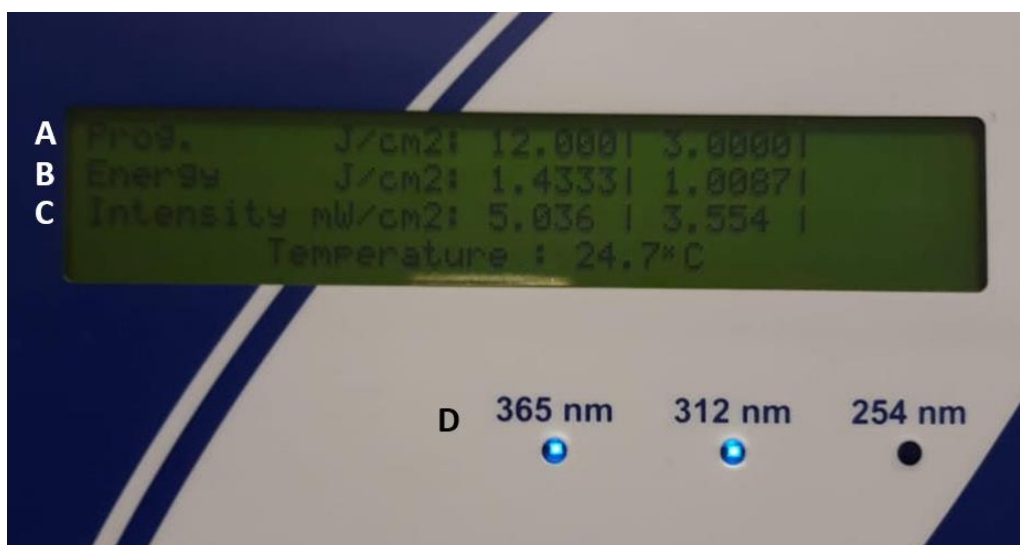


Figura 5 – *Display* do painel de configurações. **(A)** Programação da dose que será irradiada (J/cm^2). **(B)** Informação, em tempo real, da dose irradiada pelo equipamento (J/cm^2). **(C)** Informação da irradiância (mW/cm^2). **(D)** Informação dos comprimentos de ondas selecionados.

2. PELE HUMANA

O sistema tegumentar é composto pela pele e seus anexos (**Figura 6**). A pele é o maior órgão do corpo humano, sua espessura varia de 1,5 a 4mm e pode atingir até 25.000 cm². Por se tratar de um sistema epitelial, sua principal função é delimitar as estruturas. O que mais diferencia o tecido epitelial cutâneo dos demais é o fato de estar constantemente exposto às intempéries ambientais, como a radiação solar¹⁹.

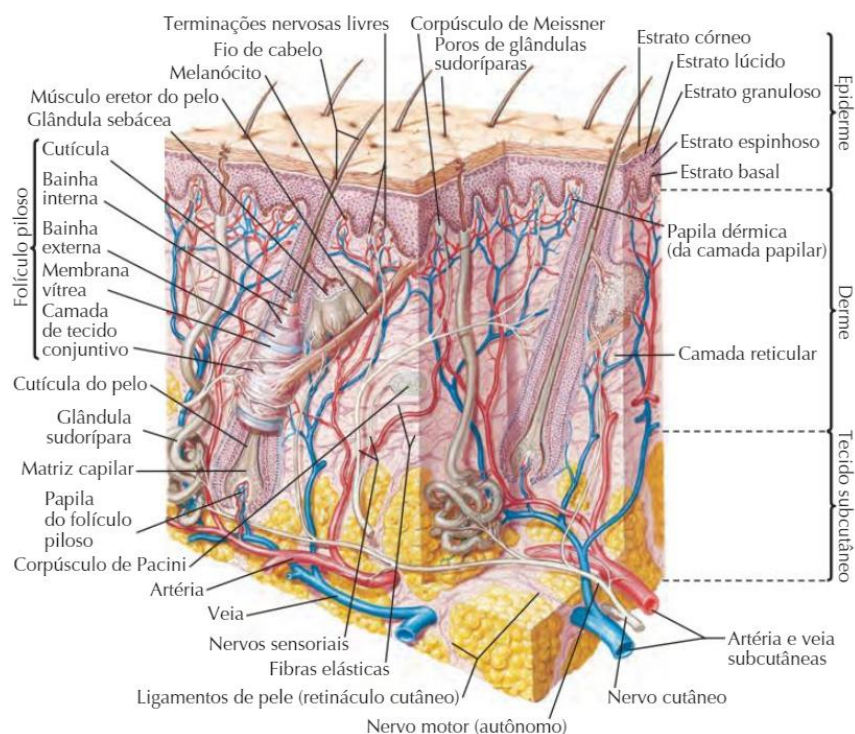


Figura 6 – Imagem Representativa do Sistema Tegumentar Humano. (Fonte: Anderson B.E., 2014)

A pele apresenta uma organização complexa com vários tipos celulares que possibilita diversas funções, tais como absorção e secreção substâncias, controle da temperatura corporal, síntese de vitamina D e respostas imunes aos efeitos estressores^{20,21}. Ademais, proporciona atribuições estéticas e sensoriais relevantes para a vida humana, pois influenciam as relações interpessoais e a saúde psicossocial individual.

A pele humana é organizada em duas principais camadas - epiderme e derme - que apresentam componentes epiteliais, mesenquimais, glandulares e neurovasculares. Sob a pele há o tecido subcutâneo, também denominado

hipoderme. Esse tecido é responsável pela regulação da temperatura e atua como depósito energético.

2.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa, possui um epitélio estratificado apresentando células justapostas e ausência de matriz extracelular (**Figura 7**). Essa camada possui aberturas para os poros dos folículos pilosebáceos e das glândulas que se encontram derme, mas são consideradas apêndices da epiderme. Não apresenta rede vascular, sendo mantida pela permeação de nutrientes oriundos do plexo vascular superficial da derme papilar. A epiderme é principalmente constituída de queratinócitos, mas também apresenta melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel²².

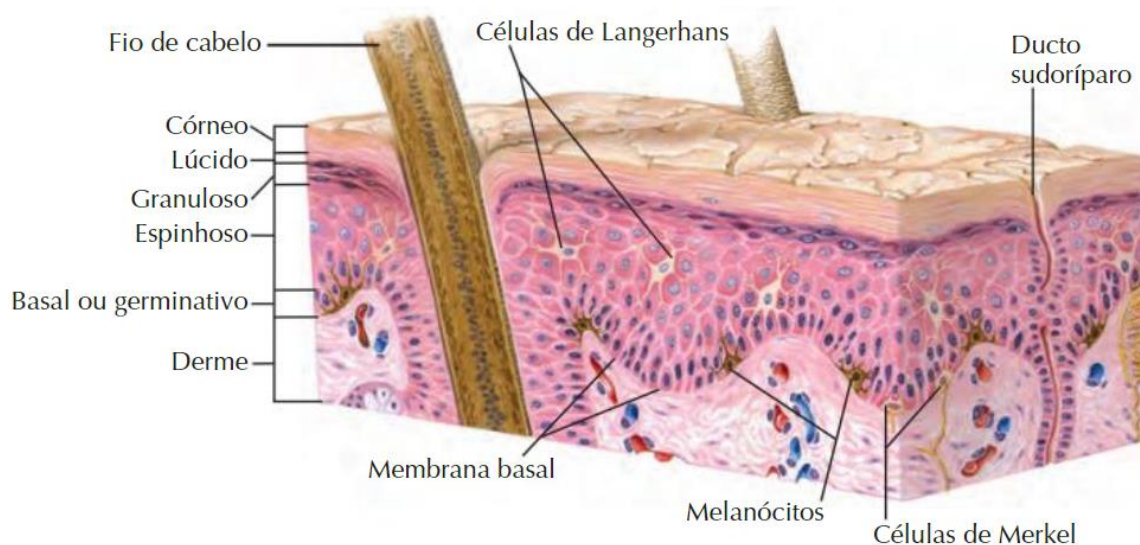


Figura 7 – Imagem Esquemática da Epiderme. (Fonte: Anderson B.E., 2014)

QUERATINÓCITO

O queratinócito possui relevância ímpar na manutenção da arquitetura e da integridade do tecido tegumentar. Apresenta papel fundamental na coesão a partir das estruturas de adesão celular que, conseqüentemente, contribuem para a capacidade de proteção da pele²³. A camada basal de queratinócitos está intimamente ligada à membrana basal devido aos hemidesmossomos que ancoram os filamentos de actina à matriz extracelular. Essas estruturas de fixação são

mediadas por integrinas que se diferem devido ao seu componente proteico. Os hemidesmossomos do tipo I são encontrados em epitélio estratificados, como a epiderme²⁴. Alterações em qualquer uma das proteínas hemidesmossomais podem desencadear desordens cutâneas, como a epidermólise bolhosa²⁵. Ademais, recentemente foi descoberto que os hemidesmossomos possuem relevância na migração dos queratinócitos humanos uma vez que possuem um padrão de agrupamento ordenado durante esse processo²⁶, indicando que essa estrutura pode ter importância em diversos eventos como regeneração tecidual e envelhecimento cutâneo²³. A adesão intercelular entre os queratinócitos é realizada pelos desmossomos. Essas estruturas ancoram as membranas plasmáticas de duas células adjacentes ao seu citoesqueleto de filamento intermediário²⁷. Sua estrutura se resume em duas placas de inserção intracelular, a membrana plasmática do queratinócito e a desmogleína, proteína transmembrana (**Figura 8**). Há uma linha média densa de elétrons bem na região central de cada desmogleína que se torna uma placa homogênea densa de elétrons quando o queratinócito se diferencia do estrato granuloso para o estrato córneo. Ademais, a membrana plasmática é transformada em um envelope lipídico, a placa externa é incorporada ao envelope celular cornificado e a placa interna é embutida em filamentos de queratina densamente compactados. Esses desmossomos modificados encontrados em queratinócitos do estrato córneo, também chamados de corneócitos, são denominados corneodesmossomos.

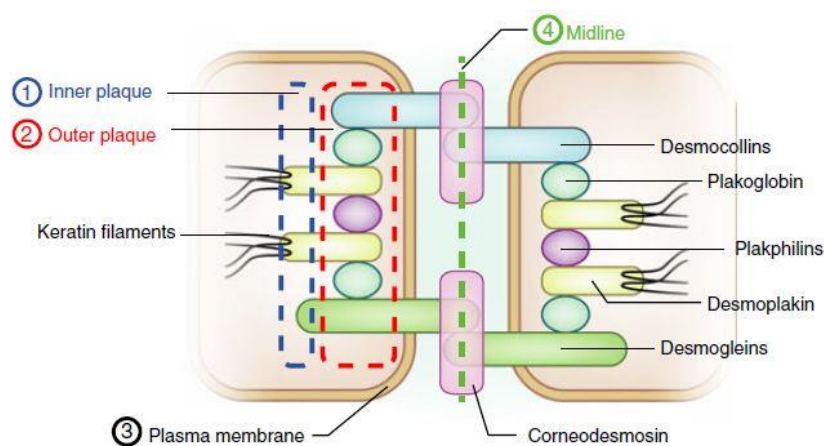


Figura 8 – Imagem Esquemática dos Componentes da Ultraestrutura do Desmossomo.

(Fonte: Ishida-Yamamoto, 2018)

Além dos desmossomos e junções de adesão, o queratinócito também apresenta participação na capacidade de barreira protetora da pele devido a formação da camada de queratina, pois ao mesmo tempo que evita a entrada de substâncias estranhas ao organismo, ela impede a perda de água e eletrólitos. A formação dessa camada, evento denominado cornificação ou queratinização, exige que o queratinócito esteja em constante processo de diferenciação e proliferação celular²⁸⁻³⁰. Essa dinâmica de morte celular programada se inicia no estrato basal, também chamada de germinativo, e é finalizada no estrato córneo. A epiderme pode ser dividida em cinco camadas de acordo com as alterações morfológicas do queratinócito: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido (encontrado apenas em peles glabras e espessas) e estrato córneo. É possível observar que durante o processo de maturação dos queratinócitos há significativas alterações citológicas, como a perda da atividade mitótica, a síntese de novas organelas e proteínas, bem como remodelagem da morfologia individual celular fazendo com que as células fiquem mais achatadas e compactadas.

MELANÓCITO

O melanócito é derivado da crista neural e é responsável pela síntese de melanina que confere coloração à pele e aos pelos além de fornecer proteção à radiação ultravioleta^{18,31}. Esse tipo celular apresenta uma morfologia bem diferente do queratinócito. Enquanto os melanócitos apresentam um formato dendrítico e são menores (**Figura 9A**), os queratinócitos possuem um formato geralmente mais cuboide ou hexagonal (**Figura 9B**). Os melanócitos ficam situados próximos ao estrato basal (**Figura 9C**) e formam unidades epidérmico-melânicas associados aos queratinócitos próximos, numa proporção de 1 melanócito para 30-40 queratinócitos³² (**Figura 9D**). É digno de nota que a pigmentação humana é primordialmente resultado da atividade melanogênica, onde indivíduos com a pele mais escura apresentam melanócitos que produzem maiores quantidades de melanina sendo essa do subtipo eumelanina. A quantidade total de melanócitos e de melanossomos (organelas onde ocorre a síntese e armazenamento de melanina) é relativamente constante nos diferentes fototipos humanos^{31,32}.

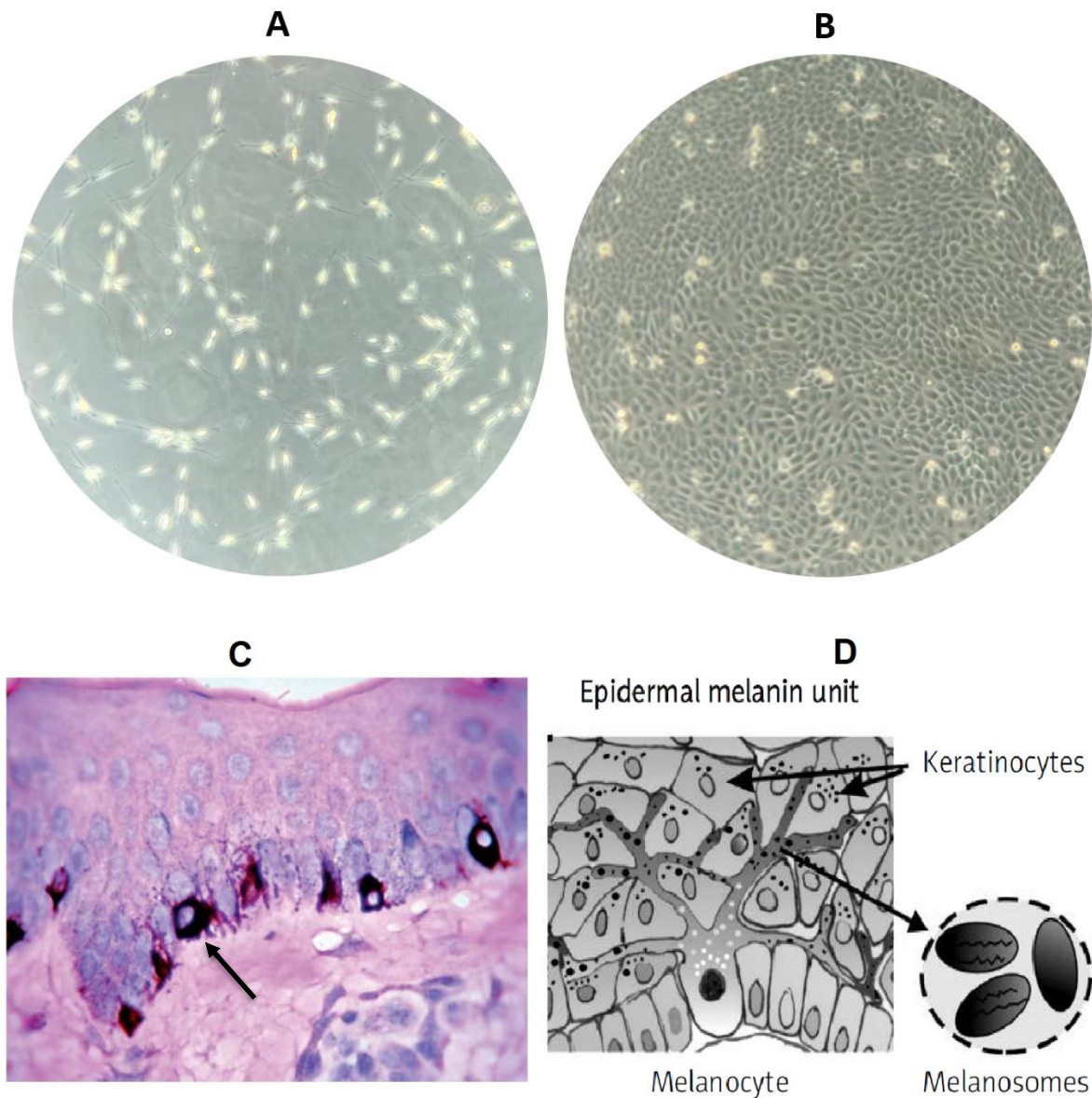


Figura 9 – Queratinócito e Melanócito Humano. Imagem de Microscopia Óptica de Cultura Celular Bidimensional de **(A)** Melanócitos e **(B)** Queratinócitos Humanos. Aumento de 200x (Fonte: Arquivo Pessoal – Laboratório de Biologia Celular). **(C)** Disposição do Melanócito na Epiderme – Coloração de Melan-A/Giemsa. Aumento de 1000x. Fonte: Miot, 2009. **(D)** Desenho Esquemático da Unidade Epidérmico-Melânica. Fonte: Adaptado de Miostawa, 2013.

2.2 Derme

A derme é uma camada situada abaixo da epiderme e em cima do tecido subcutâneo. Ela possui espessura variável de 0,5 a 3 mm e apresenta diversos componentes como vasos sanguíneos e nervos, além de diferentes tipos celulares

como fibroblastos e macrófagos. A derme contém uma grande quantidade de matriz extracelular (MEC), sendo composta por tecido conectivo constituído principalmente de elastina e de colágeno, o que confere elasticidade à pele. A MEC hospeda os tipos celulares que são distribuídos de maneira aleatória e as redes de fibras elásticas não possuem direção única. A derme pode ser subdividida em derme papilar e derme reticular³³. A derme papilar é justaposta à epiderme e essas duas camadas possuem interdigitações entre si favorecendo nutrição da epiderme (**Figura 10A**). A derme papilar apresenta um plexo sanguíneo superficial que é responsável pela termorregulação, sofrendo vasoconstrição quando a pele é exposta a temperaturas baixas e vasoconstrição, a temperaturas altas (**Figura 10B**)²². Além do plexo sanguíneo superficial ser mais delgado, a derme papilar apresenta as fibras de tecido conjuntivo mais finas e dispostas de maneira mais frouxa quando comparada a derme reticular³³.

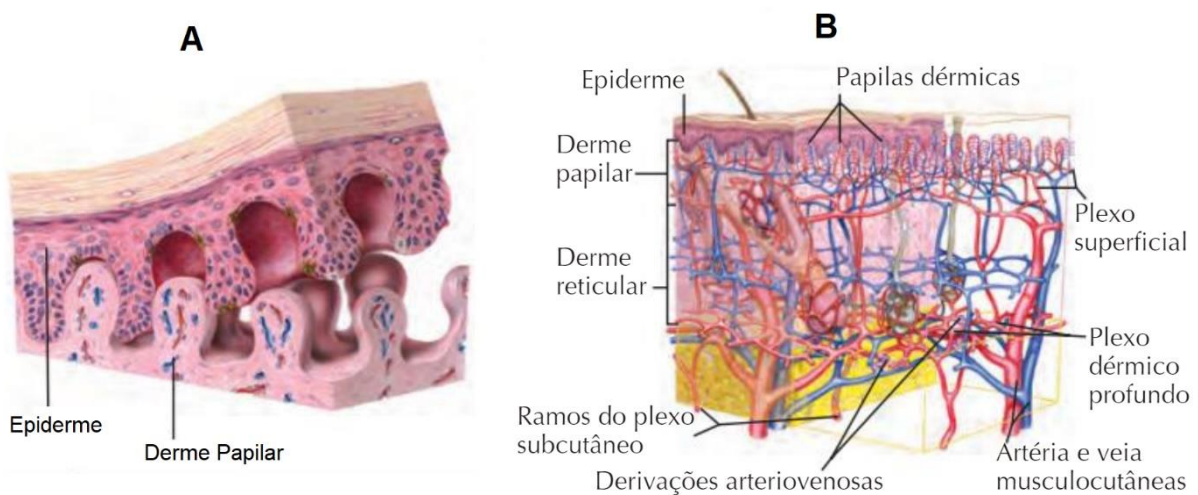


Figura 10 – Imagem Esquemática da Derme. **(A)** Interdigitações entre Epiderme e Derme Papilar. **(B)** Plexo Dérmico Superficial e Profundo (Fonte: Anderson B.E., 2014)

2.3 Efeitos da Exposição Cutânea à Radiação Ultravioleta

A exposição do tegumento à radiação solar é um efeito ambiental inerente à vida humana. Apesar da radiação solar ser imprescindível para a nossa existência, ela desencadeia inúmeros efeitos maléficos no tecido cutâneo. É digno de nota que a radiação ultravioleta foi o primeiro mutágeno ambiental descoberto. Os primeiros

trabalhos sobre o tema foram publicados na década de 30 e realizados em *Drosophila melanogaster* e milho³⁴⁻³⁷.

Algumas respostas a essa condição ambiental são agudas e ocorrem rapidamente, como liberação de adenosina trifosfato (ATP) e de outros mediadores pró-inflamatórios³⁸⁻⁴⁰. Entretanto, outros processos são decorrentes da exposição crônica e podem levar anos para o seu desencadeamento, como envelhecimento extrínseco^{10,11} e cânceres de pele^{15,41}. Após a exposição à RUV, uma série de mecanismos de resposta ao dano desencadeiam diversas cascatas de transdução para regular várias vias, incluindo reparo de danos no DNA, controle do ciclo celular e apoptose (**Figura 11**).

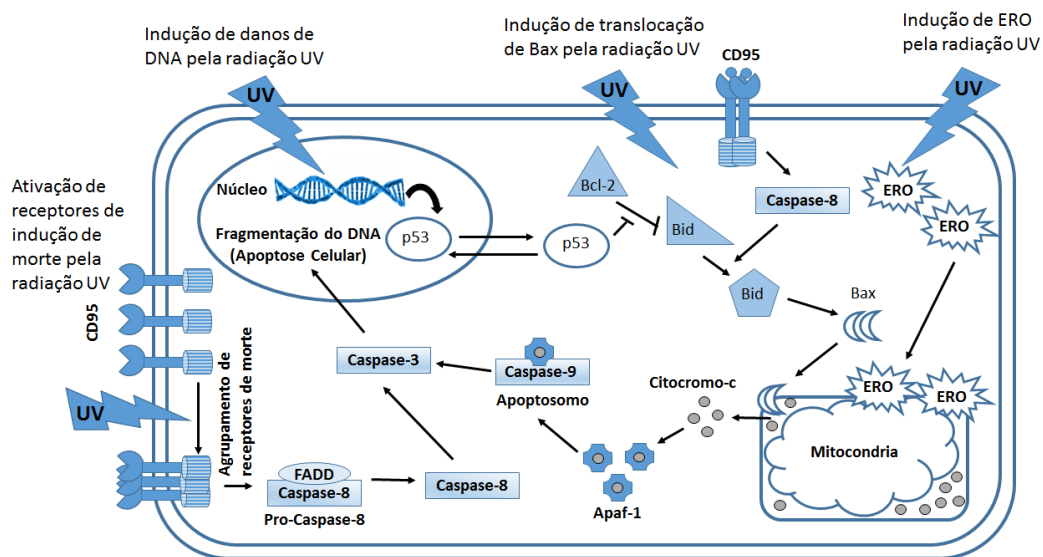


Figura 11 – Vias de ativação de células epidermais após exposição à RUV (Fonte: Lee et al., 2013)

Como mencionado no capítulo anterior, a radiação ultravioleta que atinge a superfície terrestre é composta por UVA (90-95%) e UVB (5-10%)^{15,17}. Apesar do efeito maléfico sinérgico, cada subtipo apresenta suas particularidades. Embora menos abundante, a radiação UVB é considerada mais carcinogênica do que UVA, induzindo a formação de dímeros de pirimidina de ciclobutano (DPCs) e 6,4-fotoprodutos (6-4PP)⁴². As lesões de DPC são as mais difíceis de serem reparadas e, entre elas, os dímeros formados entre as citosinas adjacentes (C-C) ou entre a timina e a citosina (T-C) são consideradas as mais mutagênicas⁴³. A radiação UVA é um importante indutor de estresse oxidativo em células epidérmicas. É digno de nota que os melanócitos são células de proliferação lenta que persistem por um longo

tempo na epiderme e, portanto, estão expostas a altos níveis cumulativos de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas por RUV. Interessantemente, o papel exercido pelas ROS na melanogênese já foi estudado na literatura⁴⁴.

Ademais, o queratinócito tem se mostrado uma célula-chave na sinalização parácrina epidermal pós dano. Há estudos abordando sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios como interleucinas 6 e 10 e fator de necrose tumoral (TNF- α) pelos queratinócitos após a exposição à RUV^{45,46}. Além da já conhecida sinalização entre o queratinócito e o melanócito pelo hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH) induzindo a melanogênese, uma recente pesquisa indicou que o ATP extracelular possa exercer um papel semelhante³⁸.

3. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Foi em 1929 que tivemos o primeiro relato de ação fisiológica extracelular de compostos de adenosina⁴⁷. O nucleotídeo ATP foi proposto como transmissor não-adrenérgico e não-colinérgico, sendo o termo “purinérgico” introduzido por Geoffrey Burnstock em 1972⁴⁸. A sinalização purinérgica atua tanto em funções celulares normais como em condições patológicas e possui um papel relevante em vários processos celulares cutâneos^{49,50}. Além dos compostos de adenosina, a sinalização purinérgica abrange as ecto-enzimas que promovem de degradação dessas moléculas em meio extracelular, bem como receptores específicos, agrupados nas famílias P1 e P2 (**Figura 12**).

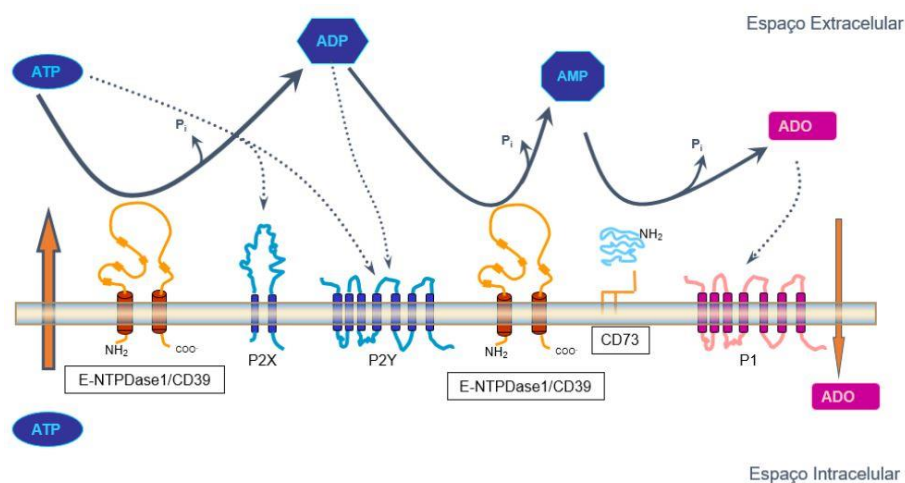


Figura 12 – Esquema Geral dos Componentes da Sinalização Purinérgica. Neste esquema é possível visualizar a liberação do ATP para o meio extracelular e sua degradação pela ectoenzimas. Figura gentilmente cedida por Sevigny e colaboradores.

3.1 Purinoreceptores

Os receptores do sistema purinérgico, também chamados de purinoreceptores, podem ser classificados em duas grandes famílias: P1 e P2⁵¹. Os receptores da família P1 são caracterizados em quatro subtipos: A1, A2_A, A2_B e A3. Todos os receptores P1 são seletivos para adenosina, são acoplados à proteína G e modulam a atividade da adenilato ciclase de forma inibitória (A1, A3) ou excitatória (A2_A, A2_B). Já se foi observado a presença de RNA mensageiro (RNAm) do receptor A2_B em estudo *in vitro* utilizando melanócitos humanos epidermais primários (NHEM, do inglês *normal human epidermal melanocyte*), fibroblastos humanos epidermais primários (NHEF, do inglês *normal human epidermal fibroblast*) e queratinócitos humanos epidermais primários (NHEK, do inglês *normal human epidermal keratinocyte*)⁵². Ademais, já foi observado a expressão de RNAm do receptor A2_A em NHEK⁵³.

A família de receptores P2 pode ser subdividida em P2X e P2Y. Os receptores P2X são receptores de canais iônicos controlados por ligante, sendo sete subunidades já conhecidas (P2X1-7), enquanto que os receptores P2Y são receptores acoplados à proteína G, sendo oito subtipos já conhecidos (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11-14)⁵⁴. Em NHEM já foi observado a expressão de RNAm dos receptores P2X2, P2X4, P2X7, P2Y1 e P2Y11³⁸. Em queratinócitos já foi observado a modulação da expressão de purinoreceptores dependendo do tipo de estrato epidermal em que o queratinócito se encontra^{55,56}. Em HaCat, uma linhagem de queratinócito humano, já foi identificado a expressão gênica de P2X4, P2X5, P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14⁵⁷⁻⁵⁹.

3.2 Ecto-enzimas

Através dos purinoreceptores, os nucleotídeos desencadeiam uma amplitude de respostas fisiológicas. Entretanto, essa sinalização necessita de um fino controle. Para isto, existe um grupo de enzimas envolvidas na administração da disponibilidade dos ligantes nos purinoreceptores⁶⁰. O papel das ecto-enzimas é fundamental, pois elas são relevantes na orquestra da transmissão do sinal purinérgico, possibilitando a prevenção da dessensibilização do receptor, o término da ativação do receptor por hidrólise do ligante ou a ativação do receptor pelos produtos de hidrólise gerados⁶¹.

Os quatro grupos principais de ecto-nucleotidasas incluem as ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ecto-5'-nucleotidase (em/CD73), ecto-nucleotídeo pirofosfatase / fosfodiesterases (E-NPPs) e fosfatases alcalinas (APs) (**Figura 13**). As E-NTPDases são específicas de nucleotídeo e hidrolisam trifosfatos e difosfatos de nucleosídeo tendo os monofosfatos de nucleosídeo como produto final da hidrólise. De acordo com o conhecimento atual, elas representam as principais enzimas de hidrólise de nucleotídeos envolvidas na sinalização purinérgica, mas não hidrolisam polifosfatos de dinucleosídeos, ADP ribose, NAD⁺ ou AMP. Da mesma forma, a enzima em/CD73 é a principal enzima produtora de adenosina extracelular a partir do AMP. Os outros dois grupos de enzimas atuam como ecto-nucleotidasas, mas também hidrolisam outros substratos. As E-NPPs hidrolisam trifosfatos e difosfatos de nucleosídeos, polifosfatos de dinucleosídeos, ribose ADP, NAD⁺ e uma variedade de substratos artificiais, mas não AMP. Dados publicados pelo grupo demonstraram que a linhagem HaCat possui atividade de hidrólise para o p-nitrofenol 5`-timidinamonofostato (p-Nph-5'-TMP), substrato artificial das E-NPPs, e apresenta RNAm para as isoformas E NPP1, E-NPP2 e E-NPP3 (citar PMID: 24697693). As fosfatases alcalinas finalmente hidrolisam os nucleosídeos tri-, di- e monofosfatos, pirofosfato e uma grande variedade de monoésteres adicionais de ácido fosfórico.

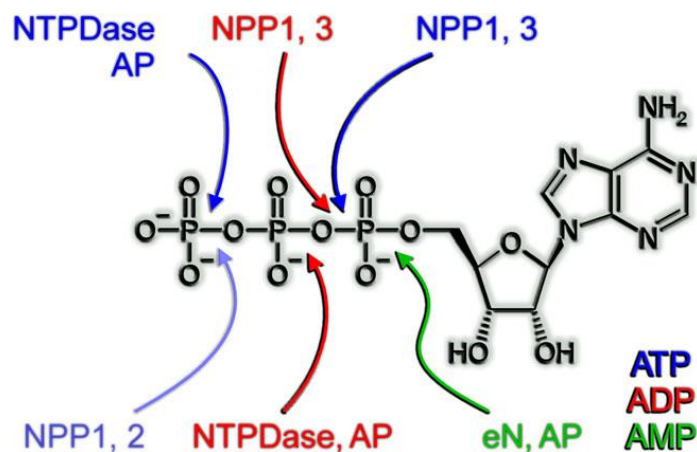


Figura 13 – Locais de Clivagem das Ectoenzimas. As enzimas em azul clivam ATP; em vermelho, ADP; e em verde, AMP (Fonte: Zimmermann et al., 2012).

Já foi descrito que a exposição cutânea à agentes agressores, como radiação ultravioleta, causa a liberação de ATP de células epidermais, especialmente de queratinócitos^{38–40,62,63}. Esse ATP extracelular pode ser uma via de sinalização parácrina ou autócrina ainda pouco compreendida. Interessantemente, Chia-Lin Ho e colaboradores (2013) observaram que HaCat, em condições basais, apresentam expressão gênica de E-NTPDase2 e E-NTPDase3 e valores muito baixos ou ausentes para as enzimas E-NTPDase1 e E-NTPDase8. Ademais, foi visto que apenas a utilização de RNA de interferência para a NTPDase2 diminui significativamente a hidrólise de ATP. Esses resultados indicam que a atividade da NTPDase2 em queratinócitos pode modular a concentração de ATP no microambiente⁵⁷. Essa modulação se torna relevante, pois o eATP induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios pelos queratinócitos^{39,63} que podem resultar em uma resposta imune cutânea exacerbada⁶⁴. Em HaCats, foi demonstrado pelo nosso grupo que estas células possuem similar capacidade de hidrolisar ATP e ADP e uma maior capacidade de degradar AMP⁶⁵. Por fim, é digno de nota que células dendríticas epidermais, Células de Langerhans, podem ser identificadas a partir da presença de ATPases⁶⁶. Georgiou e colaboradores (2005) observaram a expressão da CD39 (E-NTPDase1) em Células de Langerhans humanas, mas não em NHEK. Em Célula de Langerhans de camundongo CD39^{-/-}, não foi visto atividade ecto-NTPDase. A exposição à produtos químicos irritantes causaram inflamação exacerbada da pele em camundongos CD39^{-/-}. Em contra partida, a hipersensibilidade de contato alérgica

mediada por células T foi severamente atenuada em camundongos CD39 ^{-/-}⁶⁷. Esses resultados indicam que a deficiência de CD39 causa efeitos opostos na dermatite de contato irritante versus alérgica. Esses achados mostram a relevância de mais estudos para um melhor entendimento do papel da sinalização purinérgica em efeitos cutâneos.

JUSTIFICATIVA

Já foi observado que a exposição à agentes agressores, como a radiação ultravioleta, acarreta na liberação de ATP de células epidermais, principalmente de queratinócitos. Esse ATP extracelular (ATPe) pode atuar diretamente em purinoreceptores da família P2 ou ser hidrolisado por ecto-enzimas. A modulação do ATPe no microambiente epidermal é fundamental para que não tenhamos uma resposta imune exacerbada, o que poderia desencadear alterações cutâneas, como a dermatite de contato irritante, a dermatite alérgica e rosácea. Ademais, recentemente um estudo *in vitro* mostrou que o ATPe também pode atuar como uma molécula de sinalização parácrina entre o queratinócito e o melanócito induzindo a síntese de melanina em NHEM. Esse conhecimento poderia ser aplicado para uma melhor compreensão de alterações pigmentares, como o vitiligo e o melasma. Apesar de se conhecer a relevância da sinalização purinérgica em vários processos patofisiológicos, pouco se sabe da sua modulação em células epidermais humanas após exposição à radiação ultravioleta (RUV). A compreensão das alterações da sinalização purinérgica após a exposição à RUV poderia contribuir com um melhor entendimento de diversas alterações cutâneas, bem como auxiliar na compreensão de processos fisiológicos, como a pigmentação epidermal. Esse conhecimento pode ser utilizado tanto para uma melhor condução de tratamentos dermatológicos, quanto para elaboração de novos produtos na indústria farmacêutica.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar a modulação da sinalização purinérgica após a exposição à radiação ultravioleta em cultura de células epidermais humanas.

2. Objetivos Específicos

- 1) Revisar sistematicamente os principais achados na literatura relacionados às alterações na sinalização purinérgica em células epidermais humanas, após exposição à radiação ultravioleta, incluindo as ecto-enzimas e purinoreceptores (capítulo 1);
- 2) Realizar investigação *in silico* sobre as ecto-enzimas e purinoreceptores em células epidermais humanas após exposição à RUV (capítulo 1);
- 3) Caracterizar a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) após exposição à UVA e UVB (capítulo 2);
- 4) Caracterizar a expressão gênica das enzimas E-NTPDases 1, E-NTPDases 2 e em/CD73 em queratinócitos humanos imortalizados após exposição à UVA e UVB (capítulo 2).

CAPÍTULO 1: PURINERGIC SIGNALING IN HUMAN EPIDERMAL CELLS AFTER EXPOSURE TO ULTRAVIOLET RADIATION: A SYSTEMATIC REVIEW AND IN SILICO INVESTIGATION

* Manuscrito em Preparação para a Revista *British Journal of Dermatology*, Fator de Impacto 7,0 (2019)

ABSTRACT

Background

Several studies have shown that the exposure of skin cells to ultraviolet radiation (UVR) induces adenosine 5'-triphosphate (ATP) release. Although purinergic signaling has been implicated with several functions in skin, little is known about modulations in purinergic signaling after UVR exposure.

Objective

The aim of this study was to perform a systematic review on relation between UVR and purinergic signaling and in silico analyses to evaluate how UVR exposure can affect the purinergic signaling and also whether these changes may contribute development or worsening of the cutaneous disorder.

Methods

Systematic review of the published literature was realized using three electronic medical databases: PubMed, Scopus and Cochrane Library. Study selection and data extraction were performed according to PRISMA statement guidance that were carried out independently by two authors. In silico analysis was performed using Gene Expression Omnibus of database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Results

Extracellular ATP (eATP) induces IL-1 β , IL-6 and COX-2 release. In addition to the inflammatory character, eATP has a role in melanogenesis and this process appears to be P2RX7 dependent. Beyond to this receptor, presence of others purinoreceptors in human melanocytes was identified (P2X2, P2X4, P2Y1 and P2Y11). However, in silico analyzes do not indicate modulation in any element of purinergic signaling (purinoreceptors or ectonucleotidases) in melanocytes after exposure to UVR. On the other hand, irradiated keratinocytes showed increase in P2X4, P2Y11 and P2Y13 expression and a decrease in P2Y2. In silico analyzes indicated an increase in ENPP1 and ENTPD4 and decrease in ENTPD6. There is no evidence of modulation in the NT5E gene, which encodes CD73, in keratinocytes after exposure to UVR.

Conclusion

These results suggest purinergic signaling is modulated by exposure to ultraviolet radiation. A better understanding of this modulation can contribute to a deeper understanding of several skin changes, as well as contribute with the knowledge about physiological processes.

1. INTRODUCTION

Skin exposure to sun light is an environmental factor inherent to human life. Solar radiation is composed by a spectrum of electromagnetic radiation, including visible light, infrared and ultraviolet radiation (UVR). UVR can be segmented in three wavelength bands based on electro physical properties, biological activity and the extent to which they can penetrate in the skin: short-wavelength ultraviolet (UVC 100-280 nm), mid-wavelength ultraviolet (UVB 280-315 nm) and long-wavelength ultraviolet (UVA 315-400 nm)¹⁶. Atmospheric ozone reflects around 30% of UVR^{4,8,9}. The ultraviolet radiation on Earth surface is composed for a mixture of 90-95% of UVA and 5-10% of UVB^{17,68}. It is well known that UVA radiation induces indirect genotoxicity through reactive oxygen species (ROS) production and oxidative stress⁶⁹. On the other hand, UVB radiation induces mutagenesis through DNA damage^{70,71}. Despite differences, UVA and UVB have harmful synergistic effects in the skin and extensive exposure to UVR is able to induce skin impairment leading to extrinsic aging^{10,11,72}, inflammatory effects^{12,39,40,63,64,73}, skin pigmentation^{13,31,74,75}, and changes in cell cycle and signaling¹⁴. In addition, chronic exposure to UVR is the main etiological factor leading to skin cancers^{15,41,42,76}.

Several studies have shown that UVR exposure to human skin cells induces adenosine 5'-triphosphate (ATP) release^{38-40,63}. Besides being a well-known intracellular energy source, extracellular ATP (eATP) is an important signaling molecule that has been known since 1970s^{48,77}. eATP has been implicated in several roles in the maintenance of healthy as well as in the pathologies of skin^{49,78}. In the extracellular space, ATP is sequentially hydrolyzed for ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDases) generating ADP and AMP which is converted into adenosine by ecto-5'-nucleotidase (CD73; encoded by *NT5E* gene)⁶⁰. Extracellular nucleotides can be recognized by purinoreceptors of the P1 or P2 family⁵⁴. P1 receptors are selective for adenosine and there are four subtypes: A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors⁵¹. These receptors are encoded by *ADORA1*, *ADORA2A*, *ADORA2B*, *ADORA3* genes, respectively. Family of P2 receptors are classified into two subfamilies (ionotropic P2X or metabotropic P2Y) based on structure and function. So far, the P2Y family is composed by eight cloned distinct subtypes P2YR1-2, P2YR4, P2YR6, P2YR11-14. P2YR1-2, P2YR4, P2YR6 and P2YR11 subtypes are coupled to

G_q/G_{11} , leading to calcium release via phospholipase C/inositol-1,4,5-triphosphate activation. P2YR12-Y14 receptors are coupled to $G_{i/o}$ proteins and its stimulation inhibit the activation of adenylate cyclase, modulating the flow through ion channels^{79,80}. P2X receptors are ATP-gated ion channels for Na^+ , K^+ and Ca^{2+} . Seven P2X (P2XR1-7) receptors have been cloned and characterized pharmacologically⁵¹. In **Figure 1**, we summarize experimental data in literature of purinoreceptors and ectonucleotidases expressed in human epidermal cells^{38,39,52,53,55–58,62,81–84}. More information about these studies, included experimental data in human immortalized keratinocyte, is available in **Table 1**.

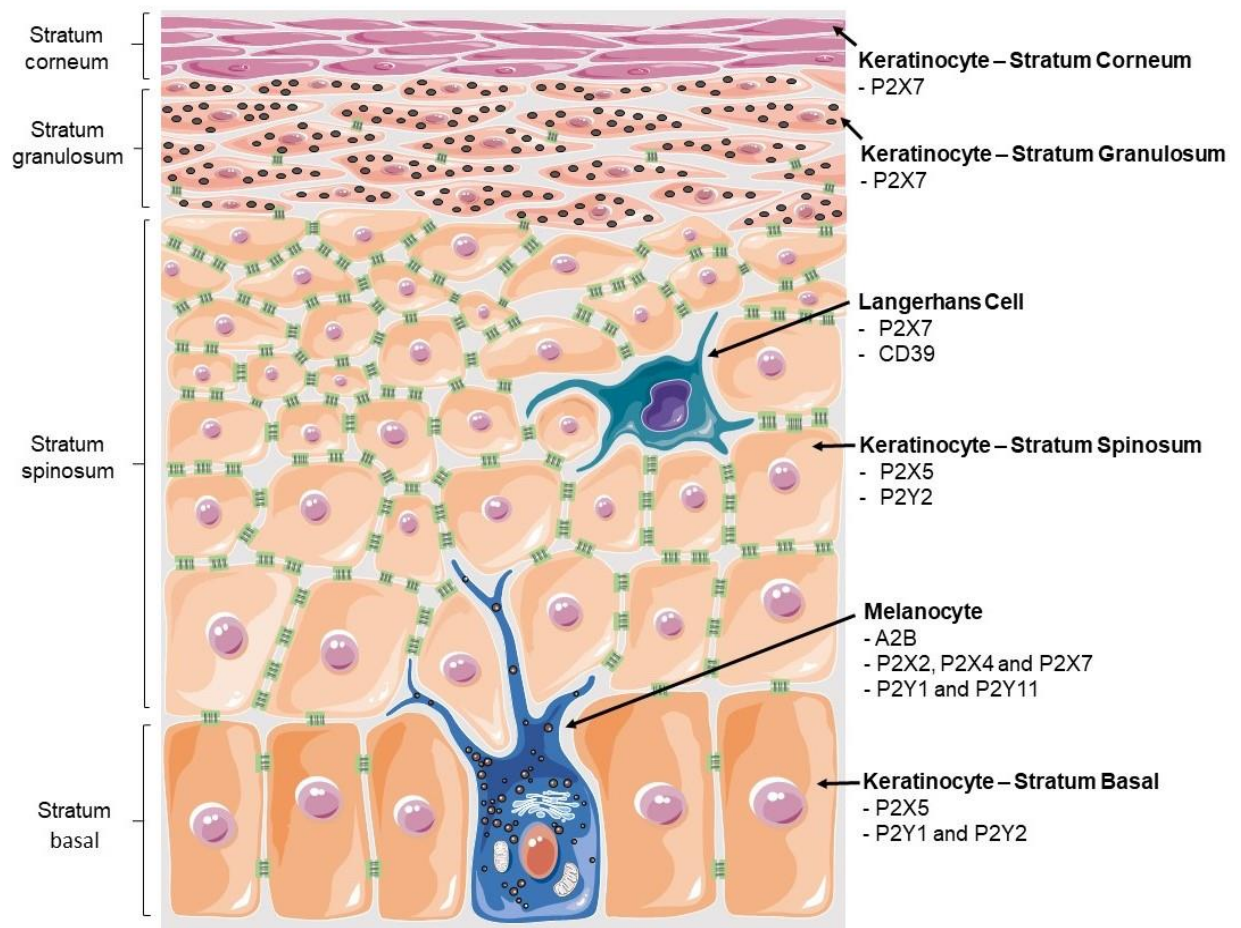


Figure 1 - Purinoreceptors and Ectonucleotidases Expressed by Human Epidermal Cells. Schematic representation of P1 and P2 purinoreceptors and ectonucleotidases expressed in human keratinocyte, melanocyte and Langerhans cells. This figure was drawn using the vector image bank of Servier Medical Art by Servier (<http://smart.servier.com/>). Licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

First Author / Year	Sample		Purinoreceptors			Ectonucleotidases	Experimental Technique
	Tissue Source	Cell Type / Tissue	P1	P2X	P2Y		
Lee E.J. / 2019	Human normal skin (foreskin)	NHEM	NA	P2X2, P2X4 and P2X7	P2Y1 and P2Y11	NA	RT-qPCR
				P2X7	P2Y11	NA	Confocal microscopy
Le Poole C. / 1999	Human normal skin (foreskin)	NHEM, NHEF and NHEK	A2B	NA	NA	NA	RT-qPCR and flow cytometry
Li Y.F. / 2018	Human normal skin (abdominal)	NHEK	A2A	NA	NA	NA	Western blot
Inoue K. / 2007	Four strains of NHEKs	NHEK	NA	P2X1, P2X4, P2X5, P2X6 and P2X7	P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y11, P2Y12 and P2Y13	NA	RT-qPCR
Greig A.V.H. / 2003	Human normal skin (abdominal, leg and breast)	NHEK	NA	P2X5 and P2X7	P2Y1 and P2Y2	NA	Immunohistochemistry
Dixon C.J. / 1999	Human normal skin (foreskin or neonatal rectoauricular)	NHEK	NA	NA	P2Y2	NA	RT-qPCR and in situ hybridization
Burrell H.E. / 2002	Human normal skin (foreskin or neonatal rectoauricular)	NHEK and HaCaT	NA	NA	P2Y1, P2Y2, P2Y4 and P2Y6	NA	RT-qPCR
Kawano A. / 2015	-	HaCaT	NA	P2X7	P2Y11 and P2Y13	NA	Western blot
Ishimaru M. / 2013	-	HaCat	NA	P2X4 and P2X5	P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y11 and P2Y12	NA	RT-qPCR
Ho C.H. / 2013	-	HaCat	NA	NA	P2Y1, P2Y2, P2Y6 and P2Y13	NTPDase2 and NTPDase3	RT-qPCR
Tsukimoto M. / 2010	-	HaCaT	NA	P2X5 and P2X7	P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12, P2Y13 and P2Y14	NA	RT-qPCR
Gönczi M. / 2007	-	HaCaT	NA	P2X1, P2X2 and P2X7	P2Y1	NA	Western blot and immunocytochemistry

Georgiou J.G. / 2005	Human normal skin (abdominal)	NHLC	NA	P2X7	NA	CD39	Flow cytometry
		NHEK	NA	P2X7	NA	NA	

Table 1 – Purinergic Receptor and Ectonucleotidases Expressed by Human Epidermal Cells. Summary of purinoreceptor and ectonucleotidases present in epidermal human cells. Abbreviations: HaCat: keratinocyte human immortalized; NA: not available; NHEF: Normal Human Epidermal Fibroblast; NHEK: Normal Human Epidermal Keratinocyte; NHEM: Normal Human Epidermal Melanocyte; NHLC: Normal Human Langerhans Cells.

Keratinocytes, besides provide a physical barrier with the keratin layer produced in cornification and to maintain the cohesion of the epidermis with the desmosomes and tight junctions, they have a fundamental role in the paracrine signaling⁸⁵. Cytokines and ATP keratinocyte-derived after UV exposure are critical to induce immune response^{39,40,63,64}. Moreover, there is indication that eATP induces melanogenesis in human skin and this process involves P2X7 receptor³⁸. Although purinergic signaling is implicated in several skin conditions, including proliferation or differentiation of keratinocytes, little is known about the profile of the purinergic signaling in skin cells after exposure of ultraviolet radiation. Therefore, the aim of this work is to perform a systematic review and an *in silico* analysis to describe how UVR affects purinergic signaling in epidermal cells and to understand whether these modulation may contribute to the development or worsening of the cutaneous disorder.

2. MATERIALS AND METHODS

SYSTEMATIC REVIEW

This systematic review was performed in accordance with the PRISMA guidelines⁸⁶. The Population, Intervention, Comparison, Outcomes and Study Design (PICOS) criteria, described in **Table 2**, were used to formulate the main question of this work: “is some player of signaling purinergic modulated after exposure to ultraviolet radiation in human skin cells?”.

Population	Skin human cells (keratinocyte, melanocyte and fibroblast)
Intervention	Exposure to ultraviolet radiation (UVA and/or UVB) in cell culture
Comparison	Purinergic signaling modulation
Outcomes	Modulation in cellular or molecular biology
Study Design	Systematic review

Table 2 – Population, Intervention, Comparison, Outcomes and Study Design (PICOS) Criteria.

SEARCH STRATEGY

Articles were collected from PubMed, Scopus and Cochrane library using the keywords (“simulated ultraviolet radiation” or solar-simulated or “solar simulator” or uva or uvb) and (melanocytes or keratinocytes or fibroblast or hacat) and (purinergic or atp or adenosine). The search included all articles available since the inception until March 1st, 2021. The language was restricted to Portuguese, English or Spanish because of the authors linguistic proficiency.

ELIGIBLE STUDIES

All articles were potentially available for inclusion. Studies were excluded if: (i) they weren't in the Portuguese, English or Spanish language; (ii) weren't original article; (iii) were retracted; (iv) didn't use human skin cells; (v) didn't use UVR or (vi) they didn't contain information about purinergic signaling.

STUDY SELECTION

Titles and abstracts of the papers selected were independently evaluated by two of the authors (W.S.N and A.P.S.B) using the exclusion criteria previously established. In cases of doubt due to not provide sufficient information data in the abstract or disagreement in the authors evaluation, papers were included. In the second phase of study selection, full-texts were independently evaluated using the exclusion criteria.

Disagreements were settled by discussion and consensus between authors. Additional papers were identified by cross-referencing (**Figure 2**).

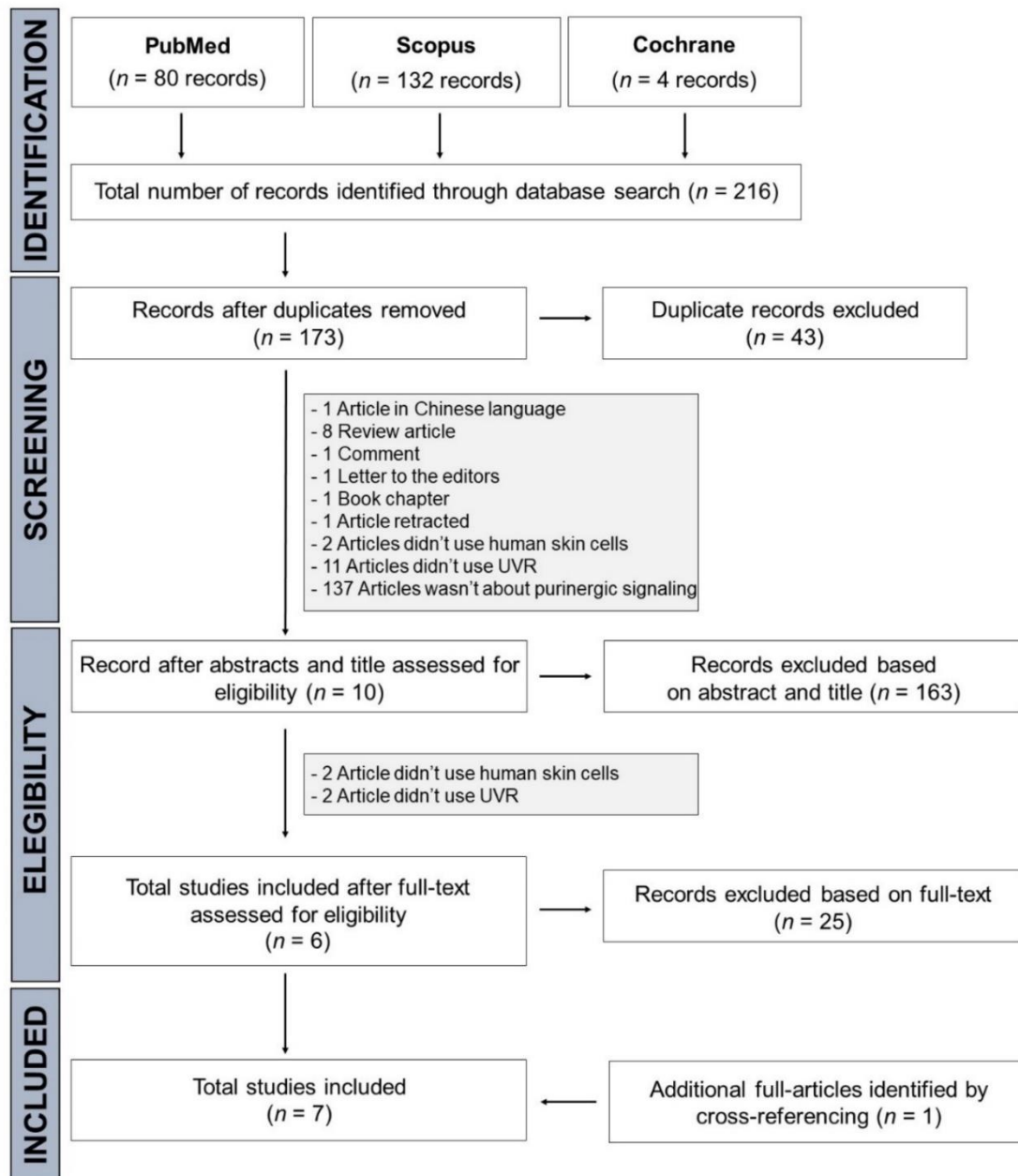


Figure 2 - PRISMA Flow Diagram

DATA ANALYSIS

Data extraction was performed as a descriptive analysis. Study quality was not rated because of differences in study designs. Due to the methodological heterogeneity and the low number of studies included no meta-analysis was performed.

IN SILICO ANALYSIS

In silico investigation was performed using public database for microarray expression profiles searched on Gene Expression Omnibus (GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The search includes in vitro studies using the key-words (UVA, UVB, UVA+UVB or ssUVR) and (melanocyte or keratinocyte). The search included all database available since the inception until March 1st, 2021.

ELIGIBLE DATASETS

Exclusion criteria of in silico analysis were similar to performed in the articles, all datasets were potentially available for inclusion and were excluded if: (i) didn't use UVR; (ii) small sample size for group; (iii) missing data for the irradiated group or (iv) in situ analysis (**Table 3**). After applying the eligibility criteria, data were extracted and summarized descriptively.

Accession	PMID	Sample	Type of irradiation	Exclusion Criteria
GSE1370	15691830	HaCat	Ionizing radiation	I
GSE4223	30083841	HaCat	UVB	II
GSE7060	22195030	HaCat	UVB	II
GSE14466	19580510	NHEK and NHEF	Ionizing radiation	I
GSE21429	20147966	In situ	Ionizing radiation	I
GSE23803	NA	3D tissue model	Ionizing radiation	I
GSE23901	NA	3D tissue model	Ionizing radiation	I
GSE27360	NA	NHEK	UVB	II
GSE29344	22594378	3D skin model	Ionizing radiation	I
GSE56754	25417821 and 25488118	In situ	UVA, UVB or UVA+UVB	IV
GSE65034	26121660	HaCat	UVB – 6 and 12 hours post UVB (20 J/m ²)	Included
GSE79579	27829164	NHEM	ssUVR (375mJ/cm ²)	Included
GSE93423	NA	NHEK	NA	II
GSE102676	29051608	HaCat	SSR, UVA or UVB	II
GSE103621	29761935	NHEK	UVR - 6 and 24 (0, 10, 20 and 150 kJ/m ²)	Included
GSE104870	30466060	NHEK	UVA (40 kJ/m ²)	Included
GSE143710	31909885	NHEK	UVA	III

Table 3 – Summary of Exclusion Criteria Employed to Datasets. Abbreviations: HaCat: keratinocyte human immortalized; NA: Not Available; NHEF: Normal Human Epidermal Fibroblast; NHEK: Normal Human Epidermal Keratinocyte; NHEM: Normal Human Epidermal Melanocyte. Description Exclusion Criteria: I: didn't use UVR; II: small sample size for group; III: missing data for the irradiated group; IV in situ analysis.

3. RESULTS

STUDY SELECTION

From libraries, 173 different records were collected since 1986 until 2021. Studies screened on basis of title and abstract were assessed for eligibility, 10 articles were selected for full-text review. Among them, 6 studies were included, as well as one other paper was obtained by cross-referencing⁸⁷, totaling 7 studies included.

MAIN RESULTS OF INDIVIDUAL STUDIES

Among the article analyzed, three studies performed in vitro analysis with human immortalized keratinocyte (HaCat)^{39,40,87}, two studies used keratinocyte primary and ex vivo organ-cultured skin^{38,64} and only one performed investigations in melanocytes³⁸. All studies used one single UVR exposure. Most studies used UVB, whereas just one used UVA radiation³⁹. None of them used combined radiation of UVA and UVB or simulated solar radiation. As expected, even at low intensity and single exposure, UVR altered cell morphology⁸⁷ and decreased the cell viability^{38,39,63,87}. Moreover, UVR exposure activated the p38 MAPK cascade⁴⁰ and stimulated the release of proinflammatory cytokines such as IL-1 β ⁶⁴, IL-6^{39,63} and COX-2⁴⁰.

ATP IS RELEASED FROM EPIDERMAL CELLS AFTER UVR EXPOSURE

Extracellular ATP has several signaling functions, including danger signals after injury^{88,89}. From the 7 studies selected, four of them performed the quantification of ATP released after UVR exposure^{38–40,63} (**Table 4**). Of these studies, just one³⁸ used normal human epidermal melanocyte (NHEM), others used normal human epidermal keratinocyte (NHEK)^{38,63} or keratinocyte immortalized (HaCat)^{39,40}.

As expected, UVR exposure increases intracellular ATP (iATP) and induces its release to the extracellular space. In basal conditions of NHEK, iATP is around 645nM, whereas eATP is around 160 nM. After 30 mJ/cm² UVB exposure, iATP is around 910 nM, whereas the eATP increased to around 250 nM⁶³. ATP release occurred even in

cases without cytotoxicity. There are several pathways that could explain this result. UVB (100 and 200 mJ/cm²) increases expression of vesicular nucleotide transporter (VNUT) that is an important molecule for ATP storage and exocytosis in NHEK and NHEM³⁸. On the other hand, anion transporter inhibitors (glibenclamide and gadolinium chloride) significantly blocked ATP release induced for UVB exposure at 100 mJ/cm²⁴⁰, without being affected by UVA exposure at 2,5 J/cm²³⁹. The release of ATP after induction by UVA was significantly blocked for a nonspecific gap junction inhibitor (CBX), P2X7 receptor antagonist (AZ11645373), PANX1 inhibitors (probenecid and trovafloxacin) and Cx43 inhibitors (flufenamic acid and LaCl₃)³⁹. Even low UVR intensities, as 30 and 60 mJ/cm² of UVB, were able to induce significant release of ATP⁶³. The peak occurred around one minute after irradiation, with significant differences, when compared to control, after 10 minutes of exposure^{39,40}. After the first 10 minutes, eATP was gradually consumed but it was possible to notice significant differences up to 2 hours after UVR exposure³⁸. Taken together, these results suggest that ATP released after UVR induction occurs, i) due to decrease of cell viability, when skin cells are exposed to higher intensities; ii) as well as in physiological conditions or when skin cells are exposed to lower intensities. Interestingly, the amount of released ATP from NHEK was bigger than from NHEM³⁸, suggesting that ATP from keratinocytes primarily affects neighboring skin cells. These results show that ATP could be a relevant molecule of paracrine signaling in epidermal human cells.

First Author / Year	Cell Type	UV Information		Quantification ATP Released in Basal Condition (No UVR Exposure)	Quantification ATP Released after UVR Exposure	ATP Analysis Time after Irradiation	Decrease Viability? / Assay
		Type	Fluency (mJ/cm ²)				
Lee E.J. / 2019	Human normal skin (foreskin) / NHEM	UVB	200	~8nM	~18nM	2h	No (MTT Assay)
	Human normal skin (foreskin) / NHEK	UVB	100	~110nM	~170nM	2h	Yes (MTT Assay)
Kawano A. / 2015	HaCat	UVA	2500	~3,5nM *	~6,5nM	1 min	No (MST Assay)
Salzer S. / 2014	NHEK	UVB	50	NA	NA	NA	No (LDH Assay)

Ruzsnavszky O. / 2011	HaCat	UVB	40	NA	NA	NA	Yes (MTT Assay)
Takai E. / 2011	HaCat	UVB	100	~1nM	~3,9nM	1 min	No (LDH Assay)
Inoue K. / 2007	Four strains of NHEKs / NHEK	UVB	30	~160nM	~250nM	1 min	Yes (Alamar Blue Assay)
			60	~160nM	~205nM	1 min	Yes (Alamar Blue Assay)
Inoue K. / 2005	Four strains of NHEKs / NHEK	UVB	30 and 60	NA	NA	NA	No (Alamar Blue Assay)

Table 4 – Quantification of ATP Released from Epidermal Cells after UVR Exposure. Analysis at the highest significant peak of ATP release after UVR exposure, as well as the response of cells through the cell viability assay. (*) In Kawano A. and collaborators (2015) quantification of eATP in basal condition (no UVR exposure) was replaced by immediately after exposure UVA due to lack of information. Abbreviations: HaCat: keratinocyte human immortalized; NA: Not Analyzed; NHEK: Normal Human Epidermal Keratinocyte; NHEM: Normal Human Epidermal Melanocyte.

DIFFERENTS SIGNALING PATHWAYS ARE INDUCED BY eATP

Extracellular ATP acts as an important molecule signaling that mediate several physiological and pathological processes in skin^{49,54}. Here, we summarized information about the cellular events in response to the ATP treatment. From the 7 studies selected, six studies of them performed ATP treatment using concentrations of 10 μ M to 3mM. As expected, high concentrations ATP (1 and 3 mM) decreased cell viability in NHEM, whereas low concentration (0.1 and 0.5 mM) did not demonstrate cytotoxicity³⁸. ATP treatment was able to triggers calcium signaling in NHEM (100 μ M)³⁸, NHEK (100 μ M)⁶² and HACAT (180 μ M)⁸⁷. The eATP (100 and 300 μ M) induces release proinflammatory mediators from keratinocytes, such IL-6^{39,63} as well as increased release IL-6 induced for UVA exposure³⁹. Besides that, ATP induces phosphorylation of p38 MAPK in the concentration-dependent manner (0.1 - 100 μ M)⁴⁰. For the first time was demonstrate extracellular ATP has a role in human melanogenesis³⁸. ATP treatment was able to increase protein levels of tyrosinase and MITF, and tyrosinase activity (single exposure 100 μ M). Five days exposure of 100 μ M ATP was able induce melanin production in NHEM culture. Two exposures to ATP (100 μ M) were able to induce melanin production in organ-cultured human skin. These results suggesting ATP is a molecule triggering paracrine signaling in epidermal cells, however, this intercellular communication is far beyond signaling damage.

EXPRESSION PROFILE OF PURINORECEPTORS AND ECTONUCLEOTIDASES AFTER UVR EXPOSURE

Purinergic signaling is composed by ectoenzymes responsible for hydrolyze of nucleotides and nucleosides, as well as purinoreceptors of the P1 and P2 family. Thus, we investigated whether UVR exposure could modulate the expression of purinoreceptors or ectonucleotidases in human skin cells (**Table 5**). Unfortunately, some data are inconclusive due to the low amount of information available. There is no experimental data about P1 receptors and ectonucleotidases after exposure to UVR in selected studies, it is an important field to be explored. Besides that, the only type of cell analyzed was keratinocyte and there are different dose and type of irradiation exposure^{39,62,63}.

We performed a *in silico* investigation for a better interpretation of alterations in expression profile of purinoreceptors (**Table 6**) and ectonucleotidases (**Table 7**). GSE79579 showed that exposure to solar simulated ultraviolet radiation (ssUVR that included UVB, UVA, visible light and infrared irradiations) at 375mJ/cm² was not able to modulate any player of purinergic signaling in NHEM, after 6h of exposure. Isolated types of ultraviolet radiation, just UVB at 20J/cm² in HaCat (GSE65034) or just UVA (GSE104870) at 40 kJ/m² in NHEK showed low ability to alters expression of purinoreceptors or ectoenzymes. However, when keratinocytes are exposed at UVA+UVB at some purinergics players are modulated (GSE103621). Taken together, these results suggest that keratinocytes could be key-cell in responses to initial damage after single exposure to ultraviolet radiation.

First Author / Year	Cell Type	UVR Information	Purinoreceptors			Ectonucleotidases
			P1	P2X	P2Y	
Lee E.J. / 2019	NHEM	200 mJ/cm ² / UVB	NA	NA	NA	NA
	NHEK	200 mJ/cm ² / UVB	NA	NA	NA	NA
Kawano A. / 2015	HaCat	2500 mJ/cm ² / UVA	NA	∅ P2X7	↑ P2Y11 ↑ P2Y13	NA
Salzer S. / 2014	NHEK	50 mJ/cm ² / UVB	NA	∅ P2X7	NA	NA
Ruzsnavszky O. / 2011	HaCat	40 mJ/cm ² / UVB	NA	↓ P2X1 ↑ P2X3 ↓ P2X7	↓ P2Y2	NA
Takai E. / 2011	HaCat	100 mJ/cm ² / UVB	NA	NA	NA	NA
Inoue K. / 2007	NHEK	30 and 60 mJ/cm ² / UVB	NA	NA	NA	NA
Inoue K. / 2005	NHEK	30 and 60 mJ/cm ² / UVB	NA	↑ P2X1 ↑ P2X3 ∅ P2X4 ∅ P2X5 ↑ P2X7	∅ P2Y1 ↓ P2Y2	NA

Table 5 – Expression of Purinergic Signaling Players in Human Keratinocytes after UVR Exposure. Summary of experimental data analysis of protein or mRNA expression of purinoreceptors and ectonucleotidases after UVR Exposure on human keratinocyte. Abbreviations: NA: not analyzed; HaCat: keratinocyte human immortalized; NHEK: Normal human epidermal keratinocytes. Legend: ∅ No significant difference in protein or mRNA expression; ↑ Significant increase in protein or mRNA expression; ↓ Significant decrease in protein or mRNA expression.

	GSE79579	GSE65034	GSE103621		GSE104870
	NHEM ssUVR	HaCat UVB	NHEK 6 h post sUVR	NHEK 24 h post sUVR	NHEK UVA
ADORA1	∅	∅	∅	∅	∅
ADORA2A	∅	∅	∅	∅	∅
ADORA2B	∅	∅	∅	∅	∅
ADORA3	∅	∅	∅	↑ (150 kJ/m ²)	∅
P2RX1	∅	∅	∅	∅	∅
P2RX2	∅	∅	∅	∅	∅
P2RX3	∅	∅	∅	∅	∅
P2RX4	∅	∅	↑ (20 kJ/m ²)	∅	↑
P2RX5	∅	∅	NA	NA	∅
P2RX6	∅	∅	∅	↑ (150 kJ/m ²)	∅
P2RX7	∅	∅	∅	↑ (150 kJ/m ²)	∅
P2RY1	∅	∅	NA	NA	∅
P2RY2	∅	∅	NA	NA	↓
P2RY4	∅	∅	∅	NA	∅
P2RY5	∅	∅	∅	NA	↓
P2RY6	∅	∅	∅	NA	∅
P2RY8	∅	∅	↑ (150 kJ/m ²)	∅	∅
P2RY10	∅	∅	NA	∅	∅
P2RY12	∅	∅	NA	NA	∅
P2RY13	∅	∅	NA	NA	∅
P2RY14	∅	∅	NA	NA	∅

Table 6 - Modulation of mRNA Expression Profile of Purinoreceptors from Epidermal Cells after UVR Exposure.

Summary of Analysis of mRNA Expression Modulation of Purinoreceptors after UVR Exposure on Epidermis Skin Cells. Abbreviations: NA: not analyzed; HaCat: keratinocyte human immortalized; NHEK: Normal human epidermal keratinocytes; NHEM: Normal human epidermal Melanocytes; ssUVR: Solar simulated ultraviolet radiation; sUVR: Simulated ultraviolet radiation (UVA+UVB). Legend: ∅ No significant difference; ↑ Significant increase in mRNA expression; ↓ Significant decrease in mRNA expression.

	GSE79579	GSE65034	GSE103621		GSE104870
	NHEM ssUVR	HaCat UVB	NHEK 6 h post UVR	NHEK 24 h post UVR	NHEK UVA
ENPP1	∅	∅	↑ (150 kJ/m ²)	∅	∅
ENPP2	∅	∅	NA	NA	∅
ENPP3	∅	∅	∅	NA	∅
ENPP4	∅	∅	NA	NA	∅
ENPP5	∅	∅	∅	∅	∅
ENPP6	∅	∅	NA	NA	↓
ENPP7	∅	∅	NA	NA	∅
ENTPD1	∅	∅	NA	NA	∅
ENTPD2	∅	∅	NA	NA	∅
ENTPD3	∅	∅	NA	NA	∅
ENTPD4	∅	∅	∅	↑ (10 and 150 kJ/m ²)	∅
ENTPD5	∅	∅	∅	∅	∅
ENTPD6	∅	∅	↓ (150 kJ/m ²)	∅	∅
ENTPD7	∅	∅	∅	∅	∅
ENTPD8	∅	∅	∅	∅	∅
NT5E	∅	∅	∅	∅	∅

Table 7 - Modulation of mRNA Expression Profile of ENTPDs, ENPPs and NT5E from Epidermal Cells after UVR Exposure. Summary of Analysis of Ectonucleotidases mRNA Expression Modulation after UVR Exposure on Epidermis Skin Cells. Abbreviations: NA: not analyzed; HaCat: keratinocyte human immortalized; NHEK: Normal human epidermal keratinocytes; NHEM: Normal human epidermal Melanocytes. Legend: ∅ No significative difference; ↑ Significative increase in mRNA expression; ↓ Significative decrease in mRNA expression.

4. DISCUSSION

Purinergic signaling begins with release of ATP into extracellular space. ATP is released from epidermal cells under static culture conditions⁵⁷ or after exposure to aggressive agents, such ultraviolet radiation. The peak of ATP release is observed shortly after UVA or UVB exposure (1-10 minutes). ATP extracellular induce release of pro-inflammatory mediators, such as IL-6, IL-1 β and COX-2 from keratinocytes. These processes suggest the relevant role still little explored of purinergic signaling in inflammatory skin disorders, such rosacea. It is noteworthy that beyond to be a damage signaling molecule and to induce ATP is involved in others paracrine signaling processes not yet explored, such as melanogenesis.

The paracrine crosstalk between epidermal keratinocyte and melanocyte is already well-known. In response to UVR, keratinocytes release factors that stimulates

melanin production by melanocyte, such endothelin-1 and α -melanocortin (α -MSH)¹⁹. Melanin is deposited in the keratinocytes as a defense mechanism^{74,90}. For the first time, it was proposed that ATP could be another molecule related to skin pigmentation. Lee E.J. and collaborators (2019) observed that the amount of released ATP from keratinocytes was higher than from melanocytes suggesting these cells are more sensitive to UVR exposure than melanocytes. These experiments reinforce the idea that keratinocytes are important signaling players releasing paracrine mediators to melanocytes^{91,92}. In fact, ATP may have a more relevant role in melanogenesis not yet fully investigated. This knowledge could be useful in pigmentary disorders, such as vitiligo, melasma, solar lentigines and post inflammatory hyperpigmentation. However, it is important to note that these effects caused by 100 μ M ATP, a noncytotoxic dose, could not be observed in a physiological condition⁹³. Moreover, it would be interesting to analyze the release of ATP from others cell types and included UVA radiation, because it can penetrate more deeply into the skin than UVB, affecting cells located in the dermis, such as fibroblasts⁹⁴. In experiments with human melanocytes, it would be interesting to separate donor groups by phototype because is not known whether more reactive melanocytes from individuals with higher phototypes have changes in the expression of purinergic receptors when compared to melanocytes from patients with lower phototypes. There are few studies about purinoreceptors and ectonucleotidases in human melanocytes. Although Lee E. J. and collaborators (2019) showed for the first time the presence of P2X2, P2X4, P2X7, P2Y1 and P2Y11 receptors in human melanocyte, they did not evaluate modulations in these receptors after UVR exposure. In silico evaluation using data from GSE79579 there is no modulation on ecto-enzymes and purinoreceptors in NHEM exposed to ssUVR (375mJ/cm²). However, the exposure to phenolic agent (4-tertiary butyl phenol) induces upregulation of adenosine A2_BR and melanocyte apoptosis, it could be involved in the occupational vitiligo⁵².

ATP release in extracellular space triggering the signal through the P2 receptors. UVA exposure (2500mJ/cm²) in Hacat was able to increase protein expression of P2Y11 and P2Y13 and this modulation is related to IL-6 release³⁹. Inoue K. and collaborators (2007) show UVB exposure (30mJ/cm²) in NHEK was able to induce ATP release and increase IL-6 mRNA expression. The group identified expression mRNA of P2Y11 and P2Y13 receptors in NHEK in basal conditions, but

didn't analyze their modulation after UVR exposure⁶³. The results from GSE104870 showing downregulation of *P2RY2* on NHEK also are in accordance with GSE102676 that showed the downregulation of this receptor on HaCaTs cells, after exposition to ssUVR¹⁴. In addition, there was a decrease in protein expression at 24 and 36 hours, followed by a decrease in mRNA levels at 12, 24 and 36 hours after exposed to UVB (40 mJ/cm²)⁸⁷. Besides that, exposed to UVB (30 and 60mJ/cm²) was able to decrease mRNA *P2Y2* in NHEK⁶². Interesting, the *P2RY2* receptor was found co-localized with keratinocyte proliferation markers^{55,56}. Taken together, this data suggests that the decrease in *P2RY2* levels could be an earlier marker to be evaluated, after exposition to UVR, in order to infer whether the proliferation is altered, without impairs cellular viability of keratinocytes.

The analysis of GSE103621 dataset, using commercial NHEK, showed an increased expression in the levels of *P2RX4* genes 6h after exposure (sUVR at 20kJ/m²). In accordance, the analyses of GSE104870, showed an upregulation in the *P2RX4* levels on human primary keratinocytes collected 7h post irradiation (UVA at 40J/cm²). However, expression mRNA of *P2X4* in NHEK 6h after UVB exposure (30 and 60mJ/cm²) was not changed⁶². The upregulation of *P2RX4* was observed after ATP released through mechanical stimulation of keratinocytes derived from glabrous skin⁹⁵. Mechanistically, it is known that *P2RX4* is activated rapidly and desensitize within the seconds by ATP concentrations ranging from nanomolar to low micromolar⁹⁶. The quantification of ATP release after 60mJ/cm² was around 250nM⁶³, perhaps increase of *P2X4* occurs in greater amounts of eATP due to greater dose of ultraviolet radiation. The analysis of GSE103621 dataset showed an increased in the *P2RX6* genes after 24h of (sUVR at 150kJ/m²). Even though studies evaluating gene or protein expression and the functionality of *P2RX6* are scarce. Inoue reported the presence of *P2RX6* mRNA in only one cultured NHEK from four strains tested⁶². This reinforces the heterogeneity of the cell subclones, as well-known in primary cultured keratinocytes⁹⁷. In NHEK, the analysis of GSE103621 dataset showed an increased in the *P2RX7* genes after 24h of exposure (sUVR at 150kJ/m²) and, in accordance, there was the increase of expression genic *P2X7* 6h after UVB exposure (30 and 60mJ/cm²)⁶². Despite *P2X7* receptor to be a purinoreceptor broadly studied in skin cells and have proapoptotic role, few studies have evaluated the effects of its modulation on keratinocytes cells after UVR exposition. Lee and collaborators (2019)

evaluated the capacity of extracellular ATP modulate melanogenesis through P2X7 receptor in primary human epidermal melanocytes non-irradiated. The Pep19-2.5, a synthetic anti-lipopolysaccharide (LPS) peptide that promotes activation of *P2X7R*, enhanced in both, HaCaT cells and NHEK, the ability of migration and accelerated *in vitro* wound closure in a dose-dependent manner⁹⁸. These effects were abolished in the presence of non-selective P2 purinergic antagonist PPADS (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid). Indeed, the Pep19-2.5 peptide was showed efficient in accelerating *in vivo* wound healing process⁹⁹. In periderm cells, the P2X7 receptor was observed immune-colocalized with caspase-3 and with periderm cells that were positive for TUNEL staining, which evidences nuclear DNA fragmentation⁵⁶. These findings suggest a potential role of P2X7 receptor in the process of apoptosis in these cells. Interesting, just at 15 and 30 minutes after UVB-irradiation with 30 mJ/cm² on HaCats cells led to increased ERK phosphorylation and intracellular levels of H₂O₂, respectively¹⁰⁰. Indeed, the authors that provide GSE103621 data showed that at 24 h post exposure at a dose of 150 kJ/m², there is modulation of expression of genes involved in cell cycle signaling and in DNA repair, as well as in cancer-promoting pathways¹⁰¹.

Considering that UVR exposure leads to ATP release from keratinocytes, which is subsequently hydrolyzed to adenosine, the up-regulation of receptors of P1 family is expected and can be rationally justified. The analysis of GSE103621 dataset showed an increased expression in the levels of *ADORA3* genes 6h after exposure (sUVR at 150kJ/m²). Of note, there is no studies analyzing the modulation of *ADORA3*, which encodes A3 adenosine receptor, in keratinocytes exposed to UVR. However, when human skin samples were topically treated with an anti-inflammatory drug, named Piclidenoson (also known as IB-MECA or CF-101), an agonist to A3 adenosine receptor, it was observed an increased deposition of melanin from B16 melanoma cells into keratinocytes¹⁰². In addition to find in the study with phenolic agent exposure⁵², these results suggests an interesting involvement still little explored between adenosine/P1 receptors and human pigmentation.

After ATP release, several ecto-enzymes acts in this molecule and others nucleotides and nucleosides orchestrating the availability of ligants⁶⁰. The analysis of GSE103621 dataset, showed an increased expression in the levels of *ENPP1* genes

6h after exposure (sUVR at 150kJ/m²). Although there is no study investigating whether there is modulation of *ENPP1* gene in keratinocytes in response to UVR, Fitialos and collaborators (2007) demonstrated that *ENPP1* gene expression is quickly modulated (up- and down-regulated) in human keratinocytes isolated from healthy neonatal foreskin during in vitro wound healing.

There is no experimental data about activity or expression of *ENTPD4* in keratinocytes that was showed increased in 15 kJ/m² and 150 kJ/m², but not in 20 kJ/m² dose of UVR at 24h post exposure from GSE103621 dataset. Besides that, we observed that mRNA levels for *ENTPD6* were decrease after UVR exposure. This result is in line with data obtained with HaCaT cells that were collected one week after been exposed to five repetitive doses of ssUVR at 12 J/cm², which also led to decrease on *ENTPD6* expression¹⁴. Marais and collaborator (2017) also found in this study activation of upstream regulator TP63 that is a transcription factor regulating the expression of *NT5E* gene. However, our analysis of data from GSE65034 revealed that there is no modulation in the gene expression levels of receptors or enzymes of the purinergic signaling, in HaCaTs after exposed to 6 or 12 h to UVB (20 J/m²).

Taken together, these results shown some players of purinergic signaling were modulated by UVR exposure in epidermal human cells. The results indicated ATP released by keratinocytes may be a key-molecule in communication with others cells of skin and more studies about its availability are important for a better comprehension. Players of purinergic signaling are involved in several skin processes, such aging, alters in cell cycle or pigmentary and inflammatory disorders. This knowledge could be useful for a better comprehension for cellular and molecular basis of the several pathways signaling and help to develop new mechanism for dermatological aesthetic and health.

CAPÍTULO 2: CHARACTERIZATION OF ECTONUCLEOTIDASES ACTIVITY IN HACAT AFTER ULTRAVIOLET RADIATION EXPOSURE

* Dados experimentais preliminares

1. INTRODUCTION

In 1929 was the first report of the extracellular physiological action of adenosine compounds⁴⁷. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) was proposed as a non-adrenergic and non-cholinergic transmitter and the term "purinergic" was introduced by Geoffrey Burnstock in the 1970s^{48,77}. Purinergic signaling acts in normal and pathological conditions in several skin cell processes⁴⁹. Besides to adenosine compounds, purinergic signaling includes receptors – classified in P1 and P2 families – and ectoenzymes. Through purinoreceptors, nucleotides and nucleosides trigger several physiological responses. Thus, this signaling is fine regulated by a group of ectoenzymes that by their nucleotidase activity control the availability of ligands levels in the purinoreceptors⁶⁰. The four groups of ecto-nucleotidases include ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (ENTPDases), ecto-5'-nucleotidase (CD73), ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterases (ENPPs) and alkaline phosphatases (APs). E-NTPDases are nucleotide-specific and hydrolyze nucleoside triphosphates (ATP) and diphosphates (ADP), generating nucleoside monophosphates (AMP) as the end product of hydrolysis. Ecto-5'-nucleotidase/CD73, encoded by *NT5E* gene, hydrolyze AMP into adenosine.

There are evidences that exposure to aggressive agents, such as ultraviolet radiation, causes the ATP release from epidermal cells, especially from keratinocytes^{38–40,63}. This extracellular ATP (eATP) can be a paracrine or autocrine signaling pathway. Interestingly, Chia-Lin Ho and collaborators (2013) observed the gene expression of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3 (NTPDase3) by HaCat – immortalized human keratinocyte – in basal conditions. Furthermore, the use of interfering RNA for NTPDase2 led a significantly decreases of ATP hydrolysis. These results indicate that the activity of NTPDase2 in keratinocytes can modulate the ATP concentration in the epidermal microenvironment.

This modulation is relevant because eATP induces the release of pro-inflammatory mediators by keratinocytes^{39,63}, which in excess could result in an exacerbated skin immune response⁶⁴. In addition, HaCat when exposed to high fluency of sUVR exhibited significant activation of upstream regulator TP63 that is a transcription factor regulating the expression of *NT5E*¹⁴. However, there no experimental data about alterations in ectonucleotidases enzymatic activity after exposure to UVR in epidermal cells. Therefore, in this study, we aimed to understand the contribution of these ectoenzymes in this field still poorly understood.

2. MATERIALS AND METHODS

CELL CULTURE

Immortalized human keratinocytes (HaCaT) were maintained with Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose (DMEM High) (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich), which was changed every 3 days. The cultures were maintained at 37 °C, 5% CO₂, 95% humidity to reach confluence. Cells were placed as written in each methodology and cultured for 48 h before each experiment.

ULTRAVIOLET RADIATION

Solar simulated UV radiation (sUVR) was performed using instrument Vilber-Loumart, Eberhardzell, (Germany). Energy emission of UVA was 365 nm, whereas energy emission of UVB was 312 nm. Fluency used was described in each experiment, however, the ratio between UVA and UVB remained the same in all tests (95% UVA and 5% UVB). This proportion was chosen because it resembles sUVR that has contact with the Earth's surface, mimicking the radiation that would affect human skin. Plate of control was wrapped with foil during irradiation (sham). Before each sUVR exposure, medium cell culture was replaced for phosphate buffered saline (PBS) solution.

ANALYSIS OF CELL VIABILITY – MTT ASSAY

This method provides a quantitative measurement of the number of cells with metabolically active mitochondria and is based on the mitochondrial reduction of a tetrazolium bromide salt (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay). Cells were plated in a 96-well plate and incubated at 37°C and 5% CO₂. After one day, the medium was removed and replaced for PBS solution than cells were exposed to UVR. After 0h, 24h, 48h and 72h for exposure, medium was aspirated and replaced with a fresh standard medium containing MTT (5 mg/mL) for 2h at 37 °C. After incubation, the supernatant was carefully aspirated from each well, followed by solubilization with dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was read by SpectraMax M2 (Molecular Devices Corporation, USA) at 560 nm. The results were expressed by cell viability (%) in comparison sham group.

RNA ISOLATION AND cDNA SYNTHESIS

Total RNA from cells was isolated with Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) in accordance with the manufacturer's instructions. The RNA concentration and purity were assessed with the NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and stored at -80 °C. 1 µg of total RNA was reverse transcribed to produce cDNA using random and oligo-dT primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) in total reaction volumes of 20 µL. All cDNA sample were diluted 10-fold with diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water and stored at -20 °C.

QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (qPCR) AND REFERENCE GENE SELECTION

Quantitative PCR was performed using Applied Biosystems® StepOne™ Real-Time PCR System using Kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The quantitative PCR was performed with an initial denaturation (10 min at 95 °C), followed by 40 cycles of denaturation (15 s at 95 °C),

annealing and extension (45 s at 60 °C). Melting curve was acquired to ensure that a single product was amplified in each reaction. Primers sequence, product length and NCBI reference sequence for reference genes by RT-qPCR was described previously¹⁰³. Quantification of amplified samples was performed based on amplification of a standard curve with five successive ten-fold dilution points of a pool of cDNA samples. The relative gene expression values used as reference gene for normalization was TATA binding protein (*TBP*). The analyses of GSE102676 dataset, provided by study of Marais and collaborators, showed that *TBP* gene has the lowest coefficient of variation (CV=8,70%) when compared to β -2-microglobulin (*B2M*; CV=13.18%), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*; CV=20.38%), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase1 (*HPRT-1*; CV=21.84%) and β -actin (*ACTB*; CV=23,30) genes.

ECTONUCLEOTIDASE ASSAYS

Enzymatic activities of ectonucleotidases in HaCat cells were determined by using ATP, ADP and AMP as substrates as already described¹⁰⁴. Briefly, ATPase, ADPase and AMPase activity were measured by adding 1 mM ATP, ADP or AMP to reaction medium (2 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM Hepes - pH 7.4) at 37 °C. For AMPase activity, the same incubation medium was used with the exception that 2 mM MgCl₂ was used instead of CaCl₂ and the final nucleotide concentration was 1 mM. Following 15, 30 and 60min incubation, the reaction was stopped by removing an aliquot of the incubation medium and transferring it to a pre-chilled tube containing trichloro-acetic acid (5.0% w/v). The release of inorganic phosphate (Pi) was measured by the malachite green method¹⁰⁵ with KH₂PO₄ as a Pi standard. Specific activity was expressed as nmol of Pi released per min per mg of protein (nmol Pi/min/mg protein). Protein concentration of samples was determined by Bradford protein assay¹⁰⁶. This experimental data was performed 24h after irradiation.

STATISTICAL ANALYSIS

The GraphPad Prism® version 7 software was used to performed the evaluation statistical. Student's t-test was performed to compare two groups while one-way or

two-way ANOVA was used to compare three or more groups. Results were considered significant when $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**) and $P < 0.0001$ (***)).

3. RESULTS AND DISCUSSION

HIGH DOSES OF ULTRAVIOLET RADIATION INDUCES CYTOTOXICITY

First, we determined the effect of simulated ultraviolet radiation (sUVR) on the viability of HaCat cells using MTT assay (**Figure 1**). Cells were exposed to radiation of low (175, 375, 575 and 1.500 mJ/cm²)¹⁰⁷ and high (3, 6 and 12 J/cm²)¹⁴ fluency. The viability of cells irradiated at 3 J/cm² or more was significantly decrease after 72 h of exposure (**Fig. 1A**), while the viability of HaCat cells irradiated at 1500 mJ/cm² or less was not reduced (**Fig. 1B**). Our data showed that after 72 h of exposition to 3, 6 or 12 J/cm², cells exhibited losses in their viability in more than 50%, when compared with sham group. However, lower fluencies did not decrease viability cell. These results are in accordance with another data of literature with HaCat cells^{39,108}.

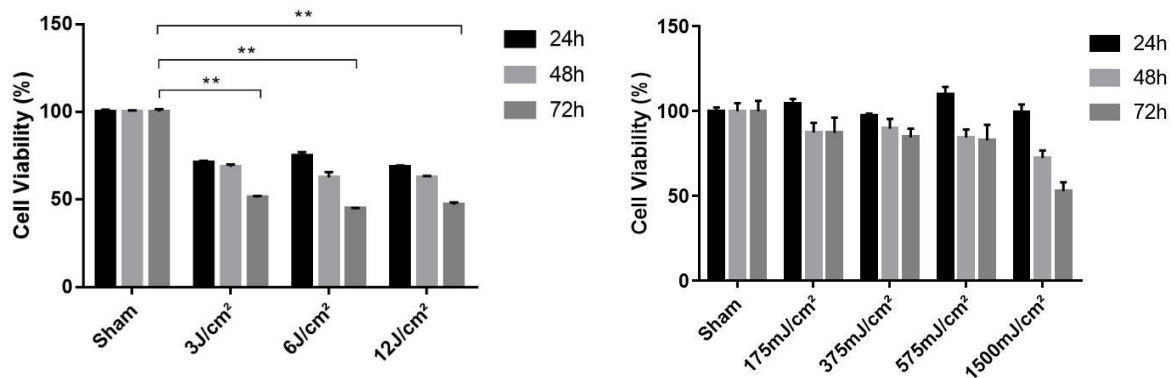


Figure 1 – Effect of high (A) or low (B) fluency of the sUVR exposure on the viability of Hacat. Asterisks denote significant differences (** $p < 0.01$) after 72h of the exposure in high doses by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($n=3$).

Next, using the RNA was extracted in both conditions, high and low fluency, we analyzed the RNA integrity by visualizing the ribosomal RNAs (28S and 18S) bands on a 1% agarose gel (**Figure 2**). As result of exposure after high fluency, the analysis showed intact bands of 28S and 18S at sham and 6 h after exposition sUVR and degradation of RNA at 12 and 24 h after sUVR exposition (**Fig. 2A**). It was possible to note the highest degradation of bands, when cells were exposed in the 12 J/cm² at 6, 12 and 24 h. On the other hand, the bands of RNA of cells exposure to low fluency revealed integrity bands after 6, 12 or 24 h (**Fig. 2B**).

absence of *ENTDP1* gene and presence of *ENTPD2* gene⁵⁷. High fluencies for sUVR exposure to HaCat did not modulated expression of *NT5E* when compared with control group ($p > 0.05$) (**Fig. 3E**).

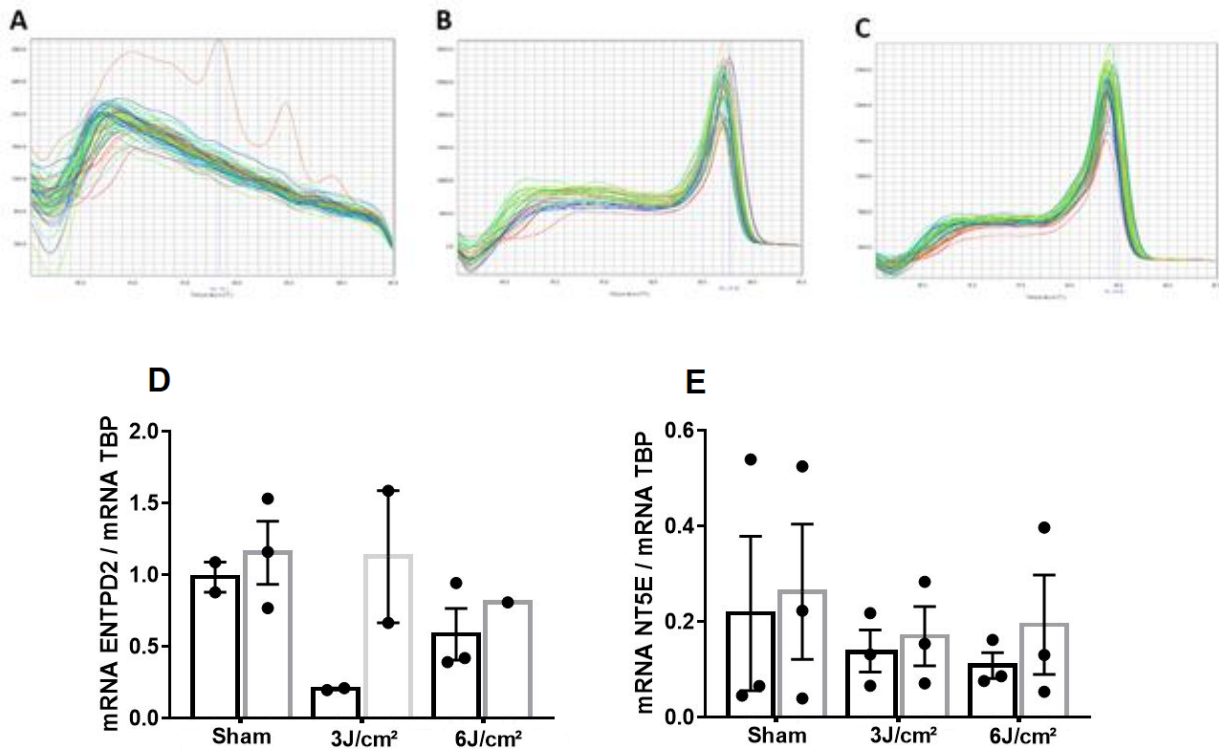


Figure 3 – Analysis of mRNA profile profile of ectonucleotidases from HaCat cells after sUVR Exposure. The melting curve showed non-specific peak for *ENTPD1* gene (A) and a specific peak for *ENTPD2* (B) and *NT5E* (C). The individual value plots display the expression values for *ENTPD2* expression (D) and there is not significant difference in mRNA expression of *NT5E* immediately after and 6h after exposure sUVR (E). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($n=3$).

EXTRACELULLAR NUCLEOTIDE HYDROLYSIS BY HACAT AFTER sUVR EXPOSURE

Studies have evaluated that epidermal cells release ATP just after UVR exposure^{38–40,63}. However, there is no experimental data about modulation of extracellular nucleotide hydrolysis by skin cells after exposure to sUVR. Therefore, we aimed to perform a panel to test the ability of HaCat irradiated with low fluencies to hydrolyze extracellular ATP (**Fig. 4A-C**), ADP (**Fig. 4D-F**) and AMP (**Fig. 4G-I**) nucleotides. To better investigate the pattern of extracellular nucleotides metabolism, cells were

exposed to 15, 30 and 60 min of incubation, as shown in **Figure 4**. Low fluencies for sUVR exposure to HaCat did not affect significantly extracellular nucleotide hydrolysis. These results are in agreement with our *in silico* investigation that showed no modulation on mRNA of ectoenzymes expressed by HaCat cells, even considering differences between cell lineages and primary culture, and irradiation conditions.

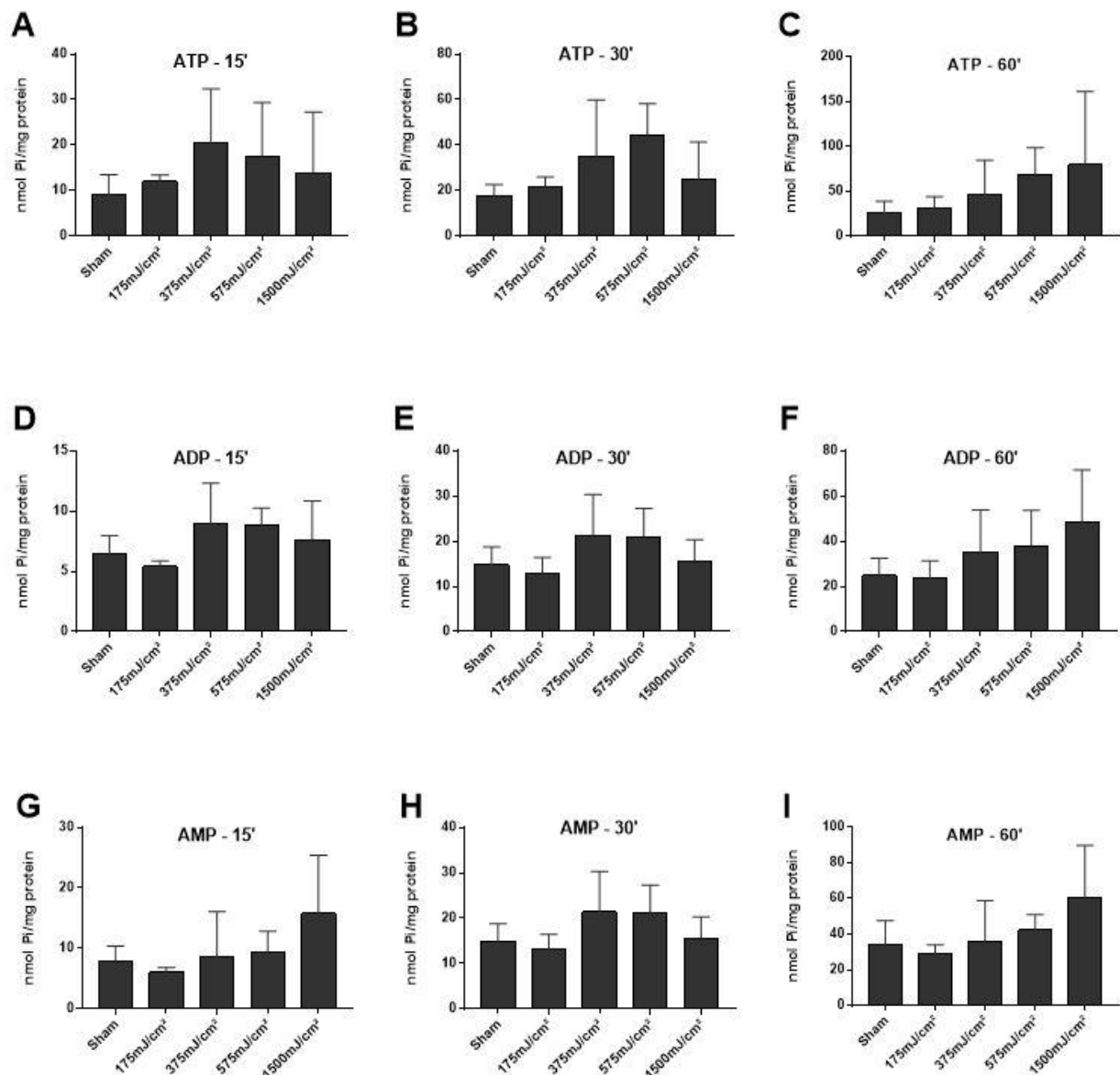


Figure 4 – Extracellular nucleotide metabolism in HaCat after sUVR exposure. Cell cultures were incubated with ATP (A-C), ADP (D-F) or AMP (G-I) for 15', 30' and 60' and the release Pi was determined using malaquites green assay, as describe in material and methods. Data were expressed as mean and represent the media \pm SD of at 3 experiments performed in triplicate. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (n=3)

Preliminary Conclusions

We observed a tendency of increase in nucleotides degradation in cells that were exposed to radiation from 375 mJ/cm². However, the variability observed in the experiments did not allow this conclusion. Therefore, the results presented in this chapter are still preliminary and further studies are necessary for understand whether exposition of epidermal cells to irradiation could modulated the expression or activity of ectonucleotidases.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da exposição do tegumento à radiação solar ter efeitos benéficos, como síntese de vitamina D e liberação de endorfinas, é de conhecimento geral os prejuízos cutâneos oriundos da exposição crônica à radiação ultravioleta. Aqui foram abordados resultados originados de uma revisão sistemática, de análises *in silico* a partir de dados depositados em *Gene Expression Omnibus* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e de dados experimentais. Focamos compreender sobre possíveis alterações na sinalização purinérgica após a exposição de células epidermais à radiação ultravioleta.

É digno de nota que há uma grande variação experimental, devido aos diferentes equipamentos e intensidades aplicadas nas análises de radiação. Há uma vasta possibilidade de combinações de tipos de radiação, como radiação solar simulada (com todos os comprimentos de onda emitidos pelo sol), radiação ultravioleta simulada (radiação ultravioleta que atinge a superfície terrestre composta UVA e UVB), além da utilização de apenas um comprimento de onda possibilitando o estudo individual do impacto do UVA ou do UVB. Além disso, vale ressaltar que as diferentes fluências e quantidades de exposição das radiações ocasionarão processos celulares distintos. Portanto, associar a dose aplicada no equipamento com identificação de respostas celulares, além da avaliação da citotoxicidade, seria uma abordagem interessante para uma possível padronização.

Acreditamos que os queratinócitos possam de alguma forma “proteger” os danos da exposição solar, pelo menos de forma inicial. Entretanto, essa exposição quando se torna crônica poderia promover alterações. Por isso seria fundamental analisar de forma concomitante o efeito da radiação a curto e a longo prazo nos queratinócitos. Os dados experimentais sugerem um aumento da degradação de ATP a partir de 375 mJ/cm^2 que, possivelmente, não foi significativo devido a variabilidade dos resultados. Seria interessante confirmar esses achados, aliando a medida da atividade em células primárias nas condições estabelecidas com as HaCats.

PERSPECTIVAS

Devido a pandemia, muitos experimentos não puderam ser realizados/refeitos. Abaixo colocamos algumas possibilidades de ensaios que temos interesse em realizar em curto prazo. Além disso, vale ressaltar que seria interessante explorarmos as alterações oriundas da exposição crônica de radiação ultravioleta.

Acreditamos que apenas uma única exposição à RUV não seja o suficiente para promover alterações na expressão e atividade das ectoenzimas. Talvez o pico de ATP liberado dessa única exposição seja hidrolisado pelas ectoenzimas já existentes sem necessidade de aumento de expressão proteica. Ademais, é digno de nota que as principais alterações cutâneas oriundas pela exposição solar ao tegumento humano são oriundas de inúmeras exposições de longo prazo por vários anos. Sendo assim, seria interessante a elaboração de protocolo de exposição seriada/crônica à radiação ultravioleta. Utilizando a metodologia de Marais e colaboradores (2017), realizamos 5 exposições das doses altas de UVA+UVB (3, 6 e 12J/cm²) no período de duas semanas em HaCats (dados não mostrados). Entretanto, essa dose se mostrou excessivamente danosa e causou a morte de todas as células. Achemos que essa discrepância possa ser explicada pela utilização de equipamentos de radiação diferentes. A padronização de um protocolo de exposições seriadas poderia ser uma metodologia altamente enriquecedora em nossos estudos.

EXPERIMENTO 1: ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE

Acreditamos que as análises da citotoxicidade pelo teste de MTT após a exposição à radiação ultravioleta nos tempos de 24, 48 e 72h foram adequadas. Entretanto, no experimento em que as HaCats foram expostas à baixas doses (175, 375, 575 e 1.500mJ/cm²) há uma tendência de significância na maior fluência no último tempo analisado. Acreditamos que a diferença estatística não foi encontrada devido a discrepância no experimento, portanto temos interesse em refazer essa análise. Ademais, gostaríamos de utilizar queratinócitos humanos primários (NHEK) nessas mesmas condições. Após isso, gostaríamos de utilizar esse mesmo ensaio em HaCats e NHEK expostas de maneira seriada à RUV.

EXPERIMENTO 2: EXPRESSÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES

Nesse trabalho, a partir de PCR, verificamos a expressão gênica de ENTPD1, ENTPD2 e NT5E em 0 e 6h após a exposição de doses altas em HaCat (3 e 6J/cm²). Não tivemos amplificação para ENTPD1, sendo esse resultado coerente com a literatura⁵⁷. Algumas amostras de ENTPD2 também não amplificaram, mas acreditamos que possa ser um erro operacional. Portanto, gostaríamos de refazer esse experimento para fecharmos o *n* faltante e termos esse resultado finalizado. Ademais, já temos material armazenado, de 0, 6, 12 e 24h após a exposição à baixas doses (175, 375, 575 e 1.500mJ/cm²) para que consigamos completar esse experimento. Ademais, gostaríamos de utilizar queratinócitos humanos primários (NHEK) nessas mesmas condições visto que já foi demonstrado anteriormente pelo nosso grupo que a imortalização pode afetar a expressão gênica e proteica das ectoenzimas¹⁰⁹. Após isso, gostaríamos de utilizar esse mesmo ensaio em HaCats e NHEK expostas de maneira seriada à RUV.

EXPERIMENTO 3: HIDRÓLISE DOS NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES

Nós observamos uma tendência de aumento da degradação dos nucleotídeos extracelulares com irradiações acima de 375mJ/cm². Entretanto, acreditamos que essa diferença não foi encontrada devido a discrepância nos experimentos. Assim, gostaríamos de refazer essa análise. Vale ressaltar que o resultado desse experimento é descrito pela quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado e pela quantidade total de proteína em cada poço. Apesar dessa correção pela quantidade de proteína, uma baixa confluência pode alterar o resultado da atividade enzimática. Devido a um erro operacional, podemos não ter o resultado correto dessa análise, o que reforça a necessidade de reproduzir esse experimento novamente. Ademais, gostaríamos de utilizar queratinócitos humanos primários (NHEK) nessas mesmas condições. Após isso, gostaríamos de utilizar esse mesmo ensaio em HaCats e NHEK expostas de maneira seriada à RUV.

EXPERIMENTO 4: QUANTIFICAÇÃO DO ATP LIBERADO APÓS EXPOSIÇÃO À RUV

A partir das análises oriundas do artigo de revisão sistemática, pudemos compreender que o ATP é liberado imediatamente após a exposição à radiação ultravioleta. Lee e colaboradores (2019) mostraram que NHEK liberam por volta de 170nM de ATP, sendo essa avaliação feita após 2h de exposição à 100mJ/cm² de UVB. Já Takai e colaboradores (2011) observaram que HaCats liberam cerca de 3,9nM de ATP logo após a mesma exposição à 100mJ/cm² de UVB. Esse dado indica fortemente que queratinócitos humanos primários liberam uma quantidade maior de ATP que queratinócitos imortalizados. Acreditamos que seria interessante fazer a quantificação de ATP liberado a partir da exposição única à radiação ultravioleta utilizando esses dois tipos celulares após 1, 5, 10, 60 e 120 minutos de exposição.

REFERÊNCIAS

1. Iqbal, M. *An Introduction To Solar Radiation*. (1983).
2. Stix, M. *The Sun – An Introduction*. (2012).
3. Green, S. F. & Jones, M. H. *An introduction to the Sun and Stars*. (2004).
4. Arking, A. Absorption of Solar Energy in the Atmosphere: Discrepancy Between Model and Observations. *Science* (80-.). 273, 779–782 (1996).
5. Gilgen, H. & Ohmura, A. The Global Energy Balance Archive. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 80, 831–850 (1999).
6. Tarpley, J. D. Estimating Incident Solar Radiation at the Surface from Geostation Satellite Data. *J. Appl. Meteorol.* 18, 6 (1979).
7. Leckner, B. The spectral distribution of solar radiation at the earth's surface-elements of a model. *Sol. Energy* 20, 143–150 (1978).
8. HAAR, T. V., RASCHKE, E., BANDEEN, W. & PASTERNAK, M. Measurements of solar energy reflected the earth and atmosphere from meteorological satellites. *Sol. Energy* 14, 175–184 (1973).
9. Lacis, A. A. & Hansen, J. E. A Parameterization for the Absorption of Solar Radiation in the Earth's Atmosphere. *J. Atmos. Sci.* 31, 118–133 (1974).
10. Fisher, G. J. *et al.* Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* 138, 1462–70 (2002).
11. Rittié, L. & Fisher, G. J. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, 1–14 (2015).
12. CLYDESDALE, G. J., DANDIE, G. W. & MULLER, H. K. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.* 79, 547–568 (2001).

13. Coelho, S. G. *et al.* Short- and Long-Term Effects of Ultraviolet Radiation on the Pigmentation of Human Skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 14, 32–35 (2009).
14. Marais, T. L. Des *et al.* Transcription factors and stress response gene alterations in human keratinocytes following Solar Simulated Ultra Violet Radiation. *Sci. Rep.* 1–13 (2017) doi:10.1038/s41598-017-13765-7.
15. IARC. Solar and Ultraviolet Radiation. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. *Int. Agency Res. Cancer* 55, (1992).
16. *ISO 21348 Definitions of Solar Irradiance Spectral Categories.*
<http://spacewx.com>.
17. Parisi, A. V. & Wong, J. C. F. An estimation of biological hazards due to solar radiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 54, 126–130 (2000).
18. de Gruijl, F. R. UV adaptation: Pigmentation and protection against overexposure. *Exp. Dermatol.* 26, 557–562 (2017).
19. Orazio, J. D., Jarrett, S., Amaro-ortiz, A. & Scott, T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Scineces* 14, 12222–12248 (2013).
20. Bernard, J. J., Gallo, R. L. & Krutmann, J. Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 688–701 (2019).
21. González Maglio, D. H., Paz, M. L. & Leoni, J. Sunlight Effects on Immune System: Is There Something Else in addition to UV-Induced Immunosuppression? *Biomed Res. Int.* 2016, (2016).
22. Arda, O., Göksügür, N. & Tüzün, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin. Dermatol.* 32, 3–13 (2014).
23. Hatzfeld, M., Keil, R. & Magin, T. M. Desmosomes and intermediate filaments: Their consequences for tissue mechanics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9,

- 1–20 (2017).
24. Owaribe, K. *et al.* The hemidesmosomal plaque. *Differentiation* 45, 207–220 (1990).
 25. Walko, G., Castañón, M. J. & Wiche, G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* 360, 529–544 (2015).
 26. Pora, A., Yoon, S., Windoffer, R. & Leube, R. E. Hemidesmosomes and Focal Adhesions Treadmill as Separate but Linked Entities during Keratinocyte Migration. *J. Invest. Dermatol.* 139, 1876-1888.e4 (2019).
 27. Ishida-Yamamoto, A., Igawa, S., Kishibe, M. & Honma, M. Clinical and molecular implications of structural changes to desmosomes and corneodesmosomes. *J. Dermatol.* 45, 385–389 (2018).
 28. Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E. & Declercq, W. Cell death by cornification. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 3471–3480 (2013).
 29. Suter, M. M. *et al.* The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet. Dermatol.* 20, 515–532 (2009).
 30. Candi, E., Schmidt, R. & Melino, G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 328–340 (2005).
 31. Lin, J. Y. & Fisher, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 843–850 (2007).
 32. Jimbow, K., Quevedo, W. C., Fitzpatrick, T. B. & Szabo, G. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J. Invest. Dermatol.* 67, 72–89 (1976).
 33. Woodley, D. T. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. *Dermatol. Clin.* 35, 95–100 (2017).
 34. Muller, H. J., Altenburg, L. S., Meyer, H. U., Edmondson, M. & Altenburg, E. The Lack of Proportionality Between Mutation Rate and Ultraviolet Dose in

- Drosophila. Heredity (Edinb).* 8, 53–185 (1954).
35. Altenburg, E. The production of mutations by ultra-violet light. *Science (80-)*. 78, 587 (1933).
 36. Stadler, L. J. & Sprague, G. F. GENETIC EFFECTS OF ULTRA-VIOLET RADIATION IN MAIZE. III. EFFECTS OF NEARLY MONOCHROMATIC 2537, AND COMPARISON OF EFFECTS OF X-RAY AND ULTRA-VIOLET TREATMENT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 22, 584–591 (1936).
 37. Altenburg, E. The Artificial Production of Mutations by Ultra-Violet Light. *Am. Soc. Nat.* 68, 491–507 (1934).
 38. Lee, E. J. *et al.* Critical Role of ATP-P2X7 Axis in UV-Induced Melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 139, 1554-1563.e6 (2019).
 39. Kawano, A., Kadomatsu, R., Ono, M., Kojima, S. & Tsukimoto, M. Autocrine Regulation of UVA-Induced IL-6 Production via Release of ATP and Activation of P2Y Receptors. *PLoS One* 1–16 (2015) doi:10.1371/journal.pone.0127919.
 40. Takai, E. *et al.* Involvement of P2Y6 Receptor in p38 MAPK-Mediated COX-2 Expression in Response to UVB Irradiation of Human Keratinocytes
Involvement of P2Y6 Receptor in p38 MAPK-Mediated COX-2 Expression in Response to UVB Irradiation of Human Keratinocytes. *Radiat. Res.* 175, 358–366 (2011).
 41. Gruijl, F. R. de. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *METHODS Enzymol.* 319, 359–366 (2000).
 42. Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H. N. MOLECULAR MECHANISMS OF PHOTOCARCINOGENESIS. *Front. Biosci.* 765–783 (2002)
doi:10.2741/matsumur.
 43. Marrot, L. & Meunier, J. R. Skin DNA photodamage and its biological

- consequences. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58, 139–148 (2008).
44. Wittgen, H. G. M. & Van Kempen, L. C. L. T. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res.* 17, 400–409 (2007).
 45. Petit-Frère, C. *et al.* Induction of interleukin-6 production by ultraviolet radiation in normal human epidermal keratinocytes and in a human keratinocyte cell line is mediated by DNA damage. *J. Invest. Dermatol.* 111, 354–359 (1998).
 46. Pillai, S., Oresajo, C. & Hayward, J. Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - A review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 27, 17–34 (2005).
 47. Drury, A. N. & Szent-Györgyi, A. The Physiological Activity of Adenine Compounds with Especial Reference to their Action upon the Mammalian Heart. *J. Physiol.* 68, 213–237 (1929).
 48. Burnstock, G. Purinergic Nerves. *Pharmacology* 24, 509–581 (1972).
 49. Burnstock, G., Knight, G. E. & Greig, A. V. H. Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *J. Invest. Dermatol.* 132, 526–546 (2012).
 50. Burnstock, G. & Verkhratsky, A. Long-term (trophic) purinergic signalling: Purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis.* 1, e9-10 (2010).
 51. Ralevic, V. & Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492 (1998).
 52. Le Poole, I. C. *et al.* Altered gene expression in melanocytes exposed to 4-tertiary butyl phenol (4-TBP): Upregulation of the A2b adenosine receptor. *J. Invest. Dermatol.* 113, 725–731 (1999).

53. Li, Y. F. *et al.* Caffeine protects skin from oxidative stress-induced senescence through the activation of autophagy. *Theranostics* 8, 5713–5730 (2018).
54. Burnstock, G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.* 2, 1–10 (2018).
55. Dixon, C. J. *et al.* Regulation of epidermal homeostasis through P2Y2 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1680–1686 (1999).
56. Greig, A. V. H., Linge, C., Terenghi, G., McGrouther, D. A. & Burnstock, G. Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 120, 1007–1015 (2003).
57. Ho, C. L., Yang, C. Y., Lin, W. J. & Lin, C. H. Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 Modulates Local ATP-Induced Calcium Signaling in Human HaCaT Keratinocytes. *PLoS One* 8, (2013).
58. Tsukimoto, M., Homma, T., Ohshima, Y. & Kojima, S. Involvement of purinergic signaling in cellular response to γ radiation. *Radiat. Res.* 173, 298–309 (2010).
59. Ishimaru, M., Tsukimoto, M., Harada, H. & Kojima, S. Involvement of P2Y11 receptor in IFN- γ -induced IL-6 production in human keratinocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 703, 67–73 (2013).
60. Zimmermann, H., Zebisch, M. & Sträter, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* 8, 437–502 (2012).
61. Burnstock, G. Pathophysiology and therapeutic potential of Purinergic Signaling. *Pharmacol. Rev.* 58, 58–86 (2006).
62. Inoue, K., Denda, A. M., Tozaki, A. H., Fujishita, K. & Koizumi, S. Characterization of Multiple P2X Receptors in Cultured Normal Human

- Epidermal Keratinocytes. 756–763 (2005) doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23683.x.
63. Inoue, K., Hosoi, J. & Denda, M. Extracellular ATP Has Stimulatory Effects on the Expression and Release of IL-6 Via Purinergic Receptors in Normal Human Epidermal Keratinocytes. *127*, (2007).
 64. Salzer, S. *et al.* Cathelicidin peptide LL-37 increases UVB-triggered inflammasome activation : Possible implications for rosacea. *J. Dermatol. Sci.* *76*, 173–179 (2014).
 65. Beckenkamp, A. *et al.* Ectonucleotidase expression profile and activity in human cervical cancer cell lines. *Biochem. Cell Biol.* *92*, 95–104 (2014).
 66. Wolff, K. & Winkelmann, R. K. Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* *48*, 50–54 (1967).
 67. Mizumoto, N. *et al.* CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat. Med.* *8*, 358–365 (2002).
 68. Kollias, N., Jr, E. R. & Sayre, R. M. Letter to the Editor The Value of the Ratio of UVA to UVB in Sunlight. *Photochem. Photobiol.* *87*, 1474–1475 (2011).
 69. Karran, P. & Brem, R. Protein oxidation , UVA and human DNA repair. *DNA Repair (Amst)*. *44*, 178–185 (2016).
 70. Ikehata, H. & Ono, T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J. Radiat. Res.* *52*, 115–125 (2011).
 71. Nishigori, C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol. Sci.* *5*, 208–214 (2006).
 72. Gilchrest, B. A. & Yaar, M. Ageing and photoageing of the skin: Observations at the cellular and molecular level. *Br. J. Dermatol.* *127*, 25–30 (1992).

73. Kirnbauer, R. *et al.* Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *Soc. Investig. Dermatology* 96, 484–489 (1991).
74. Costin, G. & Hearing, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 21, 976–994 (2007).
75. Coelho, S. G. *et al.* UV exposure modulates hemidesmosome plasticity, contributing to long-term pigmentation in human skin. *J. Pathol.* 236, 17–29 (2015).
76. Worswick, S. D., Cockburn, M. & Peng, D. Measurement of ultraviolet exposure in epidemiological studies of skin and skin cancers. *Photochem. Photobiol.* 84, 1462–1472 (2008).
77. Burnstock, G. Neuronal Nomenclature. *Nature* 229, 282–283 (1971).
78. Geraghty, N. J., Watson, D., Adhikary, S. R. & Sluyter, R. P2X7 receptor in skin biology and diseases. *World J. Dermatology* 5, 72 (2016).
79. Khakh, B. S. & North, R. A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527–532 (2006).
80. Burnstock, G. & Knight, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. *Int. Rev. Cytol.* 240, 31–304 (2004).
81. Gönczi, M. *et al.* Altered calcium handling following the recombinant overexpression of protein kinase C isoforms in HaCaT cells. *Exp. Dermatol.* 17, 584–591 (2008).
82. Granstein, R. D. *et al.* Augmentation of Cutaneous Immune Responses by ATP γ S: Purinergic Agonists Define a Novel Class of Immunologic Adjuvants. *J. Immunol.* 174, 7725–7731 (2005).
83. Georgiou, J. G. *et al.* Human epidermal and monocyte-derived langerhans cells express functional P2X7 receptors. *J. Invest. Dermatol.* 125, 482–490

- (2005).
84. Burrell, H. E., Bowler, W. B., Gallagher, J. A. & Sharpe, G. R. Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: Evidence for functional P2Y1, P2Y2, and P2Y4 receptors. *J. Invest. Dermatol.* 120, 440–447 (2003).
 85. Asahina, R. & Maeda, S. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. *Vet. Dermatol.* 28, 1–11 (2017).
 86. Liberati, A. *et al.* The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions : explanation and elaboration. *BMJ* 339, (2009).
 87. Ruzsnavszky, O. *et al.* Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology UV-B induced alteration in purinergic receptors and signaling on HaCaT keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 105, 113–118 (2011).
 88. Giuliani, A. L., Sarti, A. C. & Di Virgilio, F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunol. Lett.* 205, 16–24 (2019).
 89. Patel, S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 18, 1–12 (2018).
 90. Mohania, D. *et al.* Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. in *Ultraviolet Light in Human Health, Disease and Environment* (Springer, 2017). doi:10.1007/978-3-319-56017-5_7.
 91. Tada, A. *et al.* Endothelin-1 Is a Paracrine Growth Factor that Modulates in Their Responses to Ultraviolet Radiation. *Cell Growth Differ.* 9, 575–584 (1998).
 92. Park, H. Y., Kosmadaki, M., Yaar, M. & Gilchrest, B. A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1493–1506 (2009).

93. Abdel-malek, Z. A. Fueling Melanocytes with ATP from Keratinocytes Accelerates Melanin Synthesis. *J. Invest. Dermatol.* 139, 1424–1426 (2019).
94. Wang, Y. *et al.* Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation. *J. of Dermatological Sci.* (2017) doi:10.1016/j.jdermsci.2017.06.018.
95. Moehring, F. *et al.* Keratinocytes mediate innocuous and noxious touch via ATP-P2X4 signaling. *Elife* 7, 1–35 (2018).
96. Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Pablo Huidobro-Toro, J. & Stojilkovic, S. S. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* 63, 641–683 (2011).
97. Roshan, A. *et al.* Human keratinocytes have two interconvertible modes of proliferation. *Nat. Cell Biol.* 18, 145–156 (2016).
98. Pfalzgraff, A. *et al.* Synthetic antimicrobial and LPS-neutralising peptides suppress inflammatory and immune responses in skin cells and promote keratinocyte migration. *Sci. Rep.* 6, 1–12 (2016).
99. Pfalzgraff, A. *et al.* Antimicrobial endotoxin-neutralizing peptides promote keratinocyte migration via P2X7 receptor activation and accelerate wound healing in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 175, 3581–3593 (2018).
100. Chang, H., Oehrl, W., Elsner, P. & Thiele, J. J. The role of H₂O₂ as a mediator of UVB-induced apoptosis in keratinocytes. *Free Radic. Res.* 37, 655–663 (2003).
101. Qutob, S. S. *et al.* The application of transcriptional benchmark dose modeling for deriving thresholds of effects associated with solar-simulated ultraviolet radiation exposure. *Environ. Mol. Mutagen.* 59, 502–515 (2018).
102. Madi, L., Rosenberg-Haggen, B., Nyska, A. & Korenstein, R. Enhancing pigmentation via activation of A₃ adenosine receptors in B16 melanoma cells

- and in human skin explants. *Exp. Dermatol.* 22, 74–77 (2013).
103. Naasani, L. I. S. *et al.* Extracellular Nucleotide Hydrolysis in Dermal and Limbal Mesenchymal Stem Cells: A Source of Adenosine Production. *J. Cell. Biochem.* 118, 2430–2442 (2017).
 104. Wink, M. R. *et al.* Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett.* 198, 211–218 (2003).
 105. Chan, K. M., Delfert, D. & Junger, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380 (1986).
 106. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54 (1976).
 107. Ferruccio, B. *et al.* Molecular effects of 1-naphthyl-methylcarbamate and solar radiation exposures on human melanocytes. *Toxicol. Vitro.* 38, 67–76 (2017).
 108. Zhang, X. *et al.* Solar simulated ultraviolet radiation induces global histone hypoacetylation in human keratinocytes. *PLoS One* 11, 1–17 (2016).
 109. Beckenkamp, L.R. *et al.* Immortalization of Mesenchymal Stromal Cells by TERT Affects Adenosine Metabolism and Impairs their Immunosuppressive Capacity. *Stem Cell Reviews and Reports* 16:776-791 (2020).

CURRICULO LATTES

ID Lattes: 3817177852926338

Endereço Eletrônico: <http://lattes.cnpq.br/3817177852926338>

Nome civil

Nome **Walquíria Souza Nunes**

Nascimento **10/07/1993 - Porto Alegre/RS - Brasil**

Formação acadêmica/titulação

- 2018 Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências.
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil
Título: Análise da Sinalização Purinérgica em Células Epidermais Humanas após Dano por Exposição à Radiação Ultravioleta
Orientador: Márcia Rosângela Wink
Co-orientador: Ana Paula Santin Bertoli
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2013 - 2017 Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Administração Crônica de Fluoxetina Altera a Dinâmica Temporal da Consolidação Sistêmica de Memórias Aversivas
Orientador: Lucas de Oliveira Alvares
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
-

Formação complementar

- 2019 - 2019 Curso de curta duração em Despertar Empreendedor. (Carga horária: 32h).

	Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2019 - 2019	Curso de curta duração em I Meeting de Harmonização Facial. (Carga horária: 12h). Instituto Aprendente, IA, Brasil
2019 - 2019	Curso de curta duração em Ambulatório Prático em Preenchimento Facial. (Carga horária: 8h). SkinCursos, SKINCURSOS, Brasil
2017 - 2017	Curso de curta duração em Introdução aos Equipamentos e Procedimentos Combinados na Estética Avançada. (Carga horária: 4h). Universidade Feevale, FEEVALE, Novo Hamburgo, Brasil
2017 - 2017	Curso de curta duração em Cosmetologia e Procedimentos Estéticos Injetáveis. (Carga horária: 4h). Universidade Feevale, FEEVALE, Novo Hamburgo, Brasil
2016 - 2016	Curso de curta duração em Curso de Mesoterapia e Microagulhamento. (Carga horária: 8h). Clínica Sagitta de Biomedicina Estética, SAGITTA, Brasil
2016 - 2016	Curso de curta duração em Curso de Carboxiterapia. (Carga horária: 8h). Clínica Sagitta de Biomedicina Estética, SAGITTA, Brasil
2015 - 2015	Curso de curta duração em Ferramentas de Gerenciamento de Referências. (Carga horária: 3h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2015 - 2015	Curso de curta duração em Coleta de Sangue Venoso e Tipagem Sanguínea. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2014 - 2014	Curso de curta duração em Citometria de Fluxo e suas Aplicações. (Carga horária: 4h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2014 - 2014	Curso de curta duração em Estudo do Comportamento Animal em Laboratório. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2013 - 2013	Curso de curta duração em Introdução às Noções Básicas do Cultivo Celular. (Carga horária: 15h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2017 - 2017 **Vínculo: Estágio Supervisionado, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 700, Regime: Dedicção exclusiva**

Outras informações: Estágio supervisionado do curso de Biomedicina para a obtenção de habilitação de Biomedicina Estética

2017 - 2018 **Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Monitora, Carga horária: 20, Regime: Parcial**

Outras informações: Monitora no projeto de reforço acadêmico para a área de histologia. A monitoria era ministrada para todos os alunos da área da saúde.

2016 - 2017 **Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial**

Outras informações: Bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Neurobiologia da Memória, sob orientação do prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares.

2013 - 2016 **Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial**

Outras informações: Bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Plasticidade Neuroglial sob orientação da prof. Dra. Carmem Gottfried.

2. Clínica Sagitta de Biomedicina Estética - SAGITTA

Vínculo institucional

2018 - 2018 **Vínculo: Funcionária, Enquadramento funcional: Funcionária, Carga horária: 40, Regime: Integral**

Outras informações: Atuação como biomédica esteta na Clínica Sagitta. Esse ofício inclui todos os passos relacionados ao atendimento, desde a anamnese até o procedimento estético per se. Dentre as técnicas utilizadas está a carboxiterapia facial e corporal, a radiofrequência corporal e facial, limpeza de pele, PEIM, preenchimento semipermanente, mesoterapia, depilação a laser e aplicação de toxina botulínica.

3. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo institucional

2018 - Atual **Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista de Mestrado, Regime: Parcial**

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. FONTES-DUTRA, MELLANIE; DELLA-FLORA NUNES, GUSTAVO; SANTOS-TERRA, JÚLIO; **SOUZA-NUNES, WALQUÍRIA**; BAUER-NEGRINI, GUILHERME; HIRSCH, MAURO MOZEL; GREEN, LILY; RIESGO, RUDIMAR; GOTTFRIED, CARMEM; BAMBINI-JUNIOR, VICTORIO Abnormal empathy-like pro-social behaviour in the valproic acid model of autism spectrum disorder. BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH., v.364, p.11 - 18, 2019.

2. PEDRAZA, LIZETH K.; SIERRA, RODRIGO O.; GIACHERO, MARCELO; **NUNES-SOUZA, WALQUIRIA**; LOTZ, FERNANDA N.; DE OLIVEIRA ALVARES, LUCAS Chronic fluoxetine prevents fear memory generalization and enhances subsequent extinction by remodeling hippocampal dendritic spines and slowing down systems consolidation. Translational Psychiatry. , v.9, p.53 - 65, 2019.

3. HIRSCH, MAURO MOZEL; DECKMANN, IOHANNA; FONTES-DUTRA, MELLANIE; BAUER-NEGRINI, GUILHERME; DELLA-FLORA NUNES, GUSTAVO; **NUNES, WALQUIRIA**; RABELO, BRUNA; RIESGO, RUDIMAR; MARGIS, ROGERIO; BAMBINI-JUNIOR, VICTORIO; GOTTFRIED, CARMEM Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY. , v.18, p.S0278-6915 - , 2018.

4. HIRSCH, MAURO MOZEL; DECKMANN, IOHANNA; FONTES-DUTRA, MELLANIE; BAUER-NEGRINI, GUILHERME; NUNES, GUSTAVO DELLA-FLORA; **NUNES, WALQUIRIA**; RABELO, BRUNA; RIESGO, RUDIMAR; MARGIS, ROGERIO; BAMBINI-JUNIOR, VICTORIO; GOTTFRIED, CARMEM Data on social transmission of food preference in a model of autism induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. DATA IN BRIEF, v.18, p.1433 - 1440, 2018.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **NUNES-SOUZA, W.; GOTTFRIED, C.**

Resveratrol Previne Alterações Comportamentais no Modelo Animal de Autismo Induzido por Ácido Valproico In: XXVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2015, Porto Alegre.

XXVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS., 2015.

2. **NUNES-SOUZA, W.; GOTTFRIED, C.**

Modelo animal de autismo induzido por Ácido Valproico: ação histaminérgica sobre o comportamento e estudo do receptor H3 In: XXVI Salão de Iniciação Científica - 2014, 2014, Porto Alegre.

XXVI Salão de Iniciação Científica - 2014. **Porto Alegre: UFRGS, 2014.**