



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in

BIOLOGIA APPLICATA

Confronto tra filtri fisici e filtri chimici in creme solari per la protezione dal fotodanno in fibroblasti del derma umano

Comparison between chemical and physical UV filters in sunscreens for protection against photodamage in human dermal fibroblast

Tesi di Laurea Magistrale di:

Jenny Romasco

Primo Relatore:

Dott.ssa Elisabetta Damiani

Secondo Relatore:

Dott. Luca Tiano

Correlatore:

Dott.ssa Sonia Silvestri

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

INTRODUZIONE	4
SCOPO DELLA TESI	8
CAPITOLO 1	10
1.La pelle.....	10
1.1. La composizione degli strati della pelle	10
1.1.1 L'epidermide	12
1.1.2 Il derma.....	17
1.1.3 L'ipoderma.....	19
CAPITOLO 2	20
2. Le radiazioni solari e la loro composizione	20
2.1.1 Le radiazioni UVA e i loro effetti biologici.....	24
2.1.2 Le radiazioni UVB e i loro effetti biologici.....	25
2.2.1 Gli effetti delle radiazioni UV sulla cute	27
2.3 Effetti positivi delle radiazioni UV.....	30
2.3.1.La produzione di vitamina D.....	30
2.3.2 La produzione di serotonina	31
2.3.3 L'abbronzatura	32
2.3.4. Il trattamento di patologie dermatologiche	33
2.4.1. L'eritema solare.....	34
2.4.2. La fotocarcinogenesi	35
2.4.3. I danni oculari	38
2.4.4. Il Fotoinvecchiamento	39
CAPITOLO 3	44
3. La produzione dei radicali liberi	44
3.1 Gli antiossidanti.....	52
CAPITOLO 4	59
4. I Filtri solari	59
4.1 Filtri chimici.....	62
4.2 I Filtri fisici.....	64
CAPITOLO 5	73
5.MATERIALI E METODI.....	73
5.1 Descrizione del modello cellulare utilizzato	73

<i>5.2 Descrizione dei filtri solari utilizzati: SPF e quantità</i>	78
<i>5.3 Descrizione del sistema di irraggiamento con i raggi UVA</i>	79
<i>5.2 Analisi dei livelli intracellulari dei ROS</i>	81
<i>5.3 Analisi del danno ossidativo al DNA (Comet)</i>	84
STATISTICA	88
RISULTATI	89
DISCUSSIONE	103
CONCLUSIONI	113
BIBLIOGRAFIA	114

INTRODUZIONE

Il sole emette diversi tipi di radiazioni appartenenti allo spettro elettromagnetico, il quale è suddiviso in diverse regioni: gli ultravioletti, lo spettro del visibile e gli infrarossi. La componente ultravioletta è un importante fattore naturale che presenta numerosi effetti benefici sulla salute dell'uomo tra cui attività disinfettante, proprietà immunoregatorie, stimolazione della produzione di vitamina D e serotonina. E' noto che le fonti artificiali di UVR vengano utilizzate per garantire la sterilità di utensili e ambienti ospedalieri, per scopi terapeutici come il trattamento di psoriasi, vitiligine ed ittero neonatale, ma anche per finalità estetiche (lampade abbronzanti). A questi vantaggiosi utilizzi si affiancano però una serie di studi che da qualche decennio dimostrano anche l'azione dannosa dei raggi ultravioletti sulla cute, correlando in maniera diretta l'esposizione alla luce solare e l'insorgenza di tumori cutanei.

A seconda della lunghezza d'onda la radiazione ultravioletta è suddivisa in tre regioni: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm). La regione degli UVC, sicuramente più citotossica e dannosa, è interamente assorbita dallo strato di ozono presente nella stratosfera, di conseguenza le componenti ultraviolette di maggiore interesse nello studio della fotocancerogenesi sono le radiazioni ultraviolette A (UVA) e le radiazioni ultraviolette B (UVB).

La quantità di questi raggi che raggiunge la superficie terrestre e il rapporto UVA/UVB dipende da diversi fattori ambientali come la latitudine, la stagione, il tempo meteorologico e l'ora del giorno.

I raggi UVA costituiscono la maggior componente ultravioletta che arriva sulla terra (il 90-95% della radiazione UV totale), penetrano nella cute fino al derma e agiscono promuovendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che sono in grado di ossidare molteplici componenti cellulari come carboidrati, lipidi, proteine e DNA. L'interazione tra i ROS e la doppia elica può portare a fenomeni di rottura del singolo filamento (SSB), crosslink tra DNA e proteine e soprattutto ossidazione delle basi. La base più suscettibile all'ossidazione è la guanina che diventa 8-oxo-7,8-diidroguanina, importante promotore di fenomeni di cancerogenesi.

L'irradiazione UVB, raggiunge solo per il 5% la superficie terrestre e nonostante sia in grado di penetrare solo fino allo strato epidermico della cute, risulta comunque estremamente dannosa a causa dell'alta energia che possiede. Gli UVB, infatti, sono direttamente assorbiti dal DNA e generano la produzione di fotoprodotti (6-4 pirimidina-pirimidone fotoprodotti, 6-4 PP) e soprattutto dimeri di pirimidine (CPDs) che possono portare a fenomeni apoptotici o di cancerogenesi. Anche gli aminoacidi aromatici come il triptofano e la tirosina

sono potenti cromofori dei raggi UVB e le loro modificazioni possono alterare la struttura e quindi la funzione delle proteine.

Le cellule possiedono tuttavia dei meccanismi di difesa e di riparo endogeni in grado di fronteggiare il danno genotossico mediato da UV, ma a volte non bastano.

Attualmente le creme solari sono i soli strumenti in grado di limitare l'effetto degli UV, oltre, all'adozione di comportamenti atti a limitare l'esposizione della pelle. Nelle creme sono contenuti filtri solari con il compito di schermare ed assorbire le radiazioni ultraviolette. I filtri fisici riflettono in gran parte le radiazioni solari mentre i filtri chimici le assorbono.

Tuttavia, alcune creme solari, sembrano fornire meno protezione del previsto ,in quanto l'endpoint biologico per la determinazione del fattore di protezione solare (SPF) è l'eritema solare. L'eritema è limitato alla regione degli UVB e parzialmente alle radiazioni UVA (*Stanfield J et al., 2010*). La dichiarazione in etichetta non indica una protezione dai raggi UVA, ma attualmente i prodotti sul mercato contengono sia filtri per gli UVB che per gli UVA. Le creme in commercio devono attenersi ai requisiti che il Ministero della Salute e le direttive UE hanno attuato in materia di prevenzione e sicurezza. In etichetta devono essere riportate informazioni corrette per il consumatore al fine di garantire a quest'ultimo la massima trasparenza sulla modalità di utilizzo e

sull'efficacia del prodotto. Nei capitoli iniziali vengono trattati argomenti sulle caratteristiche dell'apparato tegumentario, gli effetti positivi e negativi delle radiazioni ultraviolette, con particolare attenzione al fotoinvecchiamento per poi proseguire con l'importanza dell'utilizzo delle creme solari e le differenze tra le creme con filtro chimico e fisico.

SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di confrontare *in vitro* l'efficacia nella protezione dal fotodanno, utilizzando fibroblasti di derma umano, di due tipologie di prodotti per la protezione solare, definiti nel capitolo "oggetto e definizioni" della sezione 1 della Raccomandazione della Commissione Europea (2006/647/CE) come "*qualsiasi preparato (quale crema, olio, gel, spray) destinato a essere posto in contatto con la pelle umana, al fine esclusivo o principale di proteggerla dai raggi UV assorbendoli, disperdendoli o mediante rifrazione*". In particolare, sono stati messi a confronto due tipi di prodotti della stessa marca, uno contenente esclusivamente filtri fisici - costituiti in quanto tali da piccole particelle di minerali in grado di riflettere e disperdere i raggi UV solari, e l'altro contenente esclusivamente filtri chimici composti da sostanze di sintesi in grado di assorbire l'energia delle radiazioni UV, rilasciandola principalmente sottoforma di calore. In entrambi i casi si evita che le radiazioni UV raggiungano i strati profondi della pelle danneggiando le cellule dell'epidermide e del derma. A tal proposito, per ogni tipologia di prodotto solare sono stati confrontati tre diversi fattori di protezione solare, ossia 10, 30 e 50 SPF (*Sun Protection Factor*). Successivamente, tenendo presente quanto riportato nel punto 14 della relativa Raccomandazione Europea, dove si evince che per raggiungere il livello di protezione indicato dal

fattore di protezione solare, i prodotti devono essere applicati in quantitativi analoghi a quelli utilizzati in sede di prova, vale a dire 2 mg/cm², è stata valutata l'efficacia di protezione dal fotodanno di solo quelli con fattore di protezione massimo (50 SPF), testandoli a tre quantità diverse, ossia 0.5, 1 e 2 mg/cm².

Gli esperimenti sono stati condotti *in vitro*, utilizzando una linea primaria di cellule di derma umano (fibroblasti). Il fotodanno è stato quantificato in termini di vitalità cellulare, di livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e del danno ossidativo al DNA. Tutti i parametri sono stati valutati 24 ore dopo l'esposizione delle cellule ai raggi UVA per 15 minuti, emessi da una lampada solare UVA (Philips Original Home Solarium).

CAPITOLO 1

1. La pelle

1.1. La composizione degli strati della pelle

La pelle rappresenta l'organo più esteso del corpo umano, con una superficie che può raggiungere fino a 2 m² in un individuo di media corporatura e statura (Nichols JA and Katiyar SK, 2010). Non è solo il contenitore del nostro corpo ma ci protegge dagli insulti meccanici, chimici, termici e dalle radiazioni, partecipando all'escrezione di cataboliti, all'equilibrio idrosalino e alla sintesi di vitamina D.

La maggior parte della pelle che ricopre il nostro corpo ha uno spessore di 1-2 mm, ma si può andare da meno di 0.5 mm nelle palpebre a 6 mm tra le scapole. La pelle si presenta diversa non solo nello spessore, ma anche nel colore, nella quantità di peli e di ghiandole, nel tipo di innervazione e vascolarizzazione, a seconda della regione corporea che ricopre (Ambrosi et al., 2004. *Anatomia dell'uomo. Edi-Ermes*).

E' composta da tre strati sovrapposti denominati, partendo dall'esterno verso l'interno: epidermide, derma e ipoderma

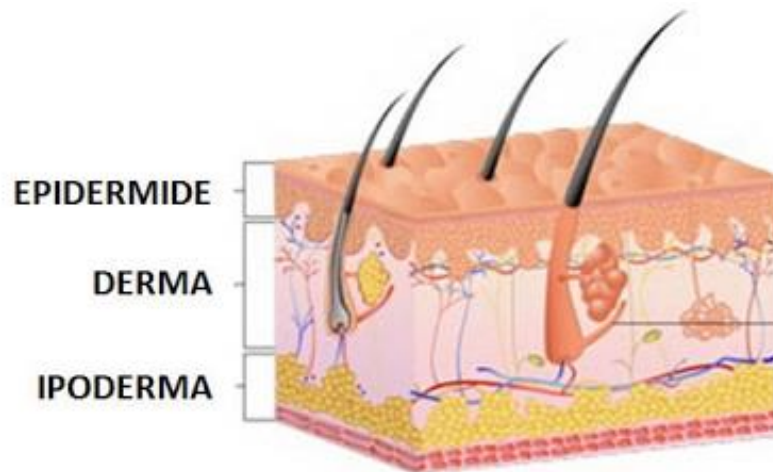


Figura 1.1. Struttura della pelle; *fonte: <https://www.melanomaimi.it>*

Embriologicamente, l'epidermide e le sue appendici sono di origine ectodermica, mentre il derma e l'ipoderma sono di origine mesodermica (*McKee P, 1996; Murphy G, 1996*).

L'epidermide e il derma sono uniti da un'interfaccia irregolare caratterizzata dalla presenza di rilievi connettivali che ne aumentano l'estensione e ne facilitano gli scambi. L'epidermide e il derma sono separati sia fisicamente che funzionalmente dalla membrana basale, la quale è costituita da una lamina densa che presenta strutture a microfibrille di collagene, da una lamina lucida attraversata da filamenti di ancoraggio e da glicoproteine che mantengono l'adesione cellulare (*Castano P et al., 2006*).

1.1.1 L'epidermide

L'epidermide è lo strato più superficiale della pelle in contatto con l'ambiente esterno. È un epitelio pavimentoso pluristratificato e corneificato che poggia sopra una lamina di connettivo denso a fasci intrecciati (derma o corion). È composto da diversi tipi cellulari che si organizzano in cinque strati.

Gli strati che compongono l'epidermide sono, dall'interno verso l'esterno: lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granuloso, lo strato lucido ed infine lo strato corneo.

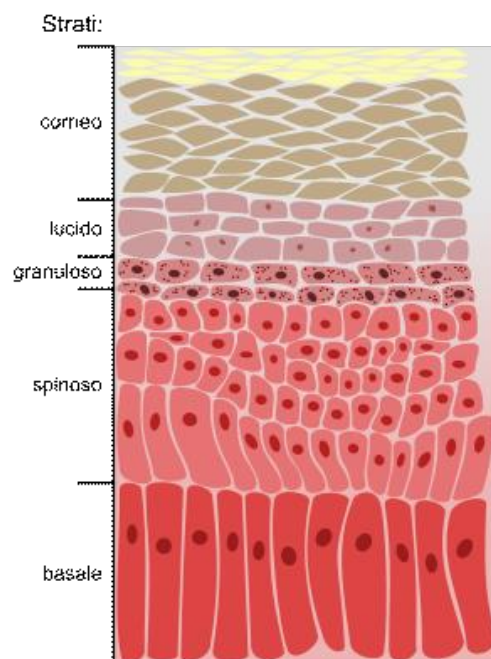


Figura 1.2. Strati dell'epidermide; *fonte: <https://it.wikipedia.org>*

-Lo *strato basale* è quello più profondo ed è costituito da un singolo strato di cellule che poggiano su una membrana basale, alla quale sono legate mediante

giunzioni ancoranti chiamate emidesmosomi. Le cellule di questo strato, denominato anche germinativo, sono altamente indifferenziate e in continua divisione mitotica, costituendo il comparto responsabile del continuo rinnovamento cutaneo (*Kadaja M et al., 2014*). Queste cellule infatti in seguito a divisione asimmetrica daranno origine al tipo cellulare più rappresentativo dell'epidermide, ossia i cheratinociti, che all'aumentare del grado di differenziazione migrano verso gli strati più superficiali (*Mardaryev AN et al., 2014*). A livello basale sono inoltre presenti anche i melanociti e le cellule di Merkel.

-Lo *strato spinoso*, immediatamente sovrastante quello germinativo, è costituito da 5-10 file di cellule poliedriche leggermente appiattite connesse tra loro dai desmosomi. I tipi cellulari contenuti in questo strato sono cellule di Langerhans (prive di desmosomi) e cheratinociti che continuano il loro processo di differenziamento migrando verso gli strati superiori. La denominazione di questo strato deriva dal fatto che le cellule che lo compongono hanno forme variabili ed irregolari che ricordano appunto delle spine. Queste ultime sono ricche di melanosomi, organelli ellissoidali contenenti melanina prodotta dai melanociti, mentre le cellule più superficiali presentano grandi vacuoli detti cheratinosomi il cui numero aumenta nello strato granuloso. I cheratinosomi contengono inoltre una pila di lamelle

lipidiche parallele che viene riversata nello spazio extracellulare formando una barriera impermeabile all'acqua.

- Lo *strato granuloso* è costituito da 3 o più strati di cheratinociti. Questi cheratinociti sono di gran lunga più appiattiti e differenziati di quelli dei precedenti strati in quanto, in corrispondenza di questo strato iniziano ad essere degradate diverse componenti cellulari. Il citoplasma delle cellule dello strato granulare mostra al suo interno granuli di cheratoialina, che interviene nel processo di assemblaggio della cheratina.

- Lo *strato lucido* contiene 1-3 file di cellule appiattite e traslucide a causa della presenza di eleidina, una proteina ricca di lipidi e zolfo. Nei cheratinociti, privi di nucleo ed organuli, non sono presenti i granuli di cheratoialina ma si trovano filamenti di cheratina impacchettati e paralleli alla superficie della cute. Infine, dato che le membrane cellulari risultano molto ispessite, questo strato è presente solo nelle zone di cute spessa come per esempio nel palmo della mano o nella pianta del piede.

- Lo *strato corneo* è lo strato più superficiale dell'epidermide, di spessore molto variabile a seconda della sede anatomica, composto da cellule morte, cheratinizzate, di forma laminare. Le lamelle cornee non contengono nucleo né organelli ma solo filamenti impacchettati di cheratina, hanno membrane molto

spesse e uno spazio intercellulare occupato da lipidi derivanti dai cheratinosomi (Ambrosi et al., 2004. *Anatomia dell'uomo. Edi- Ermes*).

Le cellule che costituiscono l'epidermide sono le cellule di Langerhans, le cellule di Merkel, i melanociti e i cheratinociti.

-I *cheratinociti* sono il tipo cellulare più rappresentativo dell'epidermide e sono caratterizzati da un ciclo vitale di circa 14 giorni. Hanno una forma cubica, con un nucleo allungato e il citoplasma basofilo. Sono così chiamati perché il loro processo differenziativo (citomorfosi cornea) è caratterizzato dall'espressione sempre crescente di cheratina (Kadaja M et al., 2014).

La cheratina è una proteina caratterizzata da lunghe catene di amminoacidi che si legano tra loro tramite ponti disolfuro per creare strutture resistenti (la cheratina, per esempio, è il principale costituente di capelli e unghie). In particolare, i cheratinociti originano dalle cellule staminali della lamina basale e risalgono gli strati cutanei subendo il processo di citomorfosi cornea che prevede la sintesi e l'accumulo di α -cheratina, una scleroproteina fibrosa molto resistente, in forma di tonofilamenti.

Mentre le cellule risalgono gli strati epidermici, la quantità di tonofilamenti aumenta progressivamente fino a rappresentare la metà del contenuto proteico cellulare, mentre l'altra metà è costituita da una matrice costituita da proteine derivate dalla trasformazione dei granuli cheratoialini.

I cheratinociti vanno poi incontro a morte per apoptosi e nei due strati più esterni si trasformano in lamelle di cheratina che si forma dalla combinazione di tonofilamenti di α -cheratina e matrice.

La funzione principale di queste cellule è quella di proteggere l'organismo da agenti esterni quali patogeni e radiazioni ultraviolette (UV).

Il processo della citomorfosi cornea è regolato dall'interazione sia da fattori intrinseci che da fattori estrinseci quali ormoni (progesterone, estrogeni, adrenalina), prostaglandine e vitamina A.

- *Le cellule di Merkel* sono simili ai cheratinociti ma di dimensioni minori e si trovano nella zona basale vicino ad aree vascolarizzate ed innervate dal derma, dove associandosi alle terminazioni nervose afferenti partecipano dunque alle funzioni sensoriali della cute (fungono da meccanocettori). Possono essere isolate o raggruppate in formazioni specializzate chiamate terminazioni ediformi e dischi tattili.

- *Le cellule di Langerhans* sono cellule dendritiche in grado di riconoscere, captare e comunicare la presenza di molecole ad attività antigenica ,che verranno poi gestite dalle cellule immunocompetenti.

I *melanociti* derivano invece dalla cresta neurale dell'embrione e conservano la capacità di dividersi con un ritmo correlato con il ricambio dei cheratinociti. Sono grandi cellule dendritiche situate nello strato basale dove producono

melanina, un pigmento derivante dal metabolismo dell'amminoacido tirosina, il cui contenuto aumenta in seguito all'esposizione ai raggi solari, in quanto ha il compito di proteggere i cheratinociti (in particolare il DNA di quelli proliferanti nello strato basale) dall'azione mutagenica dei raggi ultravioletti (Hussein MR, 2005).

1.1.2 Il derma

Il *derma* è un tessuto connettivo denso, che possiede una matrice composta da una rete di collagene ed elastina, intrecciate in una sostanza amorfa formata da glicosaminoglicani, glicoproteine e acqua. Conferisce una grande resistenza alla pelle grazie al numero e alla disposizione delle fibre di collagene ed elastiche. Il derma è essenziale per la sopravvivenza dell'epidermide e durante lo sviluppo rappresenta l'interfaccia di scambio di importanti segnali tra i due strati.

Il derma può essere diviso in due zone: uno strato sottile superficiale, detto *strato papillare* e uno strato più profondo, detto strato reticolare. Il loro confine è indistinto. Il collagene dermico dell'adulto è principalmente di tipo I e III, in proporzioni dell'80- 85 % e del 15-20 % rispettivamente. Le grosse fibre di tipo I sono situate nel derma più profondo, mentre quelle del tipo III sono presenti nel derma papillare e intorno ai vasi sanguigni. Il collagene di tipo IV si trova invece nella lamina basale che separa il derma dall'epidermide, intorno alle

cellule di Schwann dei nervi periferici e nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Due maggiori categorie di cellule sono presenti nel derma dell'adulto: le permanenti e le migranti. Le cellule permanenti includono cellule di strutture organizzate come i nervi, i vasi e le cellule del muscolo pilo erettore e i fibroblasti, che sintetizzano tutti i componenti della matrice extracellulare dermica. Le cellule migranti sono originarie del midollo osseo e includono macrofagi, mastociti, eosinofili, neutrofili, cellule T e B e cellule dendritiche interstiziali che assicurano una sorveglianza immunitaria. Lo strato papillare è immediatamente sotto l'epidermide ed è specializzato per fornire ancoraggio meccanico, supporto metabolico e manutenzione trofica per l'epidermide sovrastante, oltre a fornire terminazioni nervose sensoriali e vasi sanguigni. Il citoscheletro dei cheratinociti basali epidermiali è legato alla matrice fibrosa del derma papillare attraverso delle fibrille di ancoraggio del collagene di tipo VII, che si estendono in profondità nel derma papillare. La parte superficiale del derma presenta papille e creste, che interagiscono con lo strato basale dell'epidermide formando la giunzione dermo-epidermica. Nella pelle sottile queste papille sono molto piccole e poco numerose, mentre nelle regioni di pelle spesse, quali il palmo della mano e la pianta del piede, sono molto larghe e numerose, strettamente aggregate e disposte in linee curve parallele. Lo strato reticolare si fonde con la parte più profonda dello strato papillare. I suoi fasci

di collagene sono più spessi di quelli dello strato papillare e si intrecciano tra loro per formare un reticolo molto forte ma deformabile.

1.1.3 L'ipoderma

L'ipoderma è lo strato più profondo della pelle ed è composto essenzialmente da tessuto adiposo. È riccamente vascolarizzato ed innervato, costituendo un importante deposito di energia perchè partecipa alla termoregolazione del corpo, limitando la dispersione di calore e generandone dell'altro attraverso l'ossidazione dei trigliceridi. *(Colombo R et al, 2007)*

CAPITOLO 2

2. Le radiazioni solari e la loro composizione

La luce del sole è sempre stata per l'uomo sinonimo di benessere fisico, di culto, di adorazione. Ai nostri giorni purtroppo, specialmente nelle culture occidentali e molto meno in Asia, l'adorazione per il sole si è trasformato in un fenomeno di moda: una pelle ben abbronzata è considerata segno di salute, di benessere, di distinzione e prestigio sociale. Questa falsa impressione di efficienza fisica ha indotto ed induce la gente a cercare di rimanere ambrata tutto l'anno, in contrasto agli ammonimenti ed agli avvertimenti che i dermatologi hanno sempre lanciato contro questo atteggiamento. E'opportuno quindi, definire le caratteristiche fisiche e biologiche dei raggi solari, il ruolo ed il significato della melanogenesi e le caratteristiche dei prodotti che applicati sulla cute proteggono dai raggi solari.

Il sole è in grado di emettere radiazioni elettromagnetiche di diverse lunghezze d'onda e frequenze. L'insieme delle lunghezze d'onda elettromagnetiche costituisce lo spettro elettromagnetico che viene suddiviso in regioni parzialmente sovrapposte.

La radiazione solare che raggiunge la terra è composta da:

- raggi infrarossi,
- spettro del visibile

- raggi ultravioletti

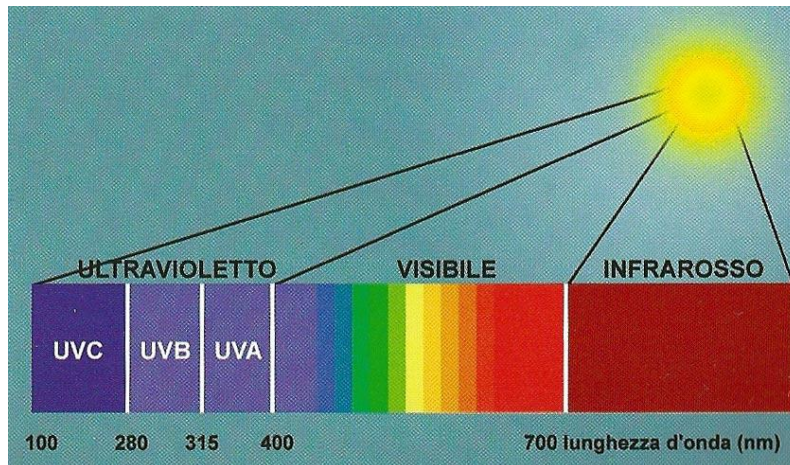


Figura 2.1. Spettro elettromagnetico; *fonte: <http://www.ruggiu.com>*

La radiazione infrarossa (IR) ha lunghezze d'onda comprese tra 780 nm e 1 nm ed è prodotta da qualsiasi corpo caldo.

La radiazione visibile (o semplicemente luce) ha lunghezza d'onda tra i 400 e i 700 nm. È emessa da corpi incandescenti ed è l'unica percepita dall'occhio umano.

Secondo la Commissione Internazionale per l'Illuminazione, la radiazione UV è divisa in tre categorie a seconda della lunghezza d'onda: onda lunga UVA (315–400 nm), UVB a onde medie (280–315 nm) e UVC a onde corte (100–280 nm). Lo strato di ozono assorbe efficacemente le radiazioni UV fino a circa 310 nm in questo modo consuma tutti i raggi UVC e la maggior parte dei raggi UVB (95%).

La capacità di penetrazione attraverso la pelle è direttamente proporzionale alla

lunghezza d'onda delle radiazioni stesse. Le più penetranti sono quelle dotate di minor energia, mentre le radiazioni ad elevata energia sono quelle che penetrano di meno e svolgono quindi la loro azione in superficie, a livello epidermico.

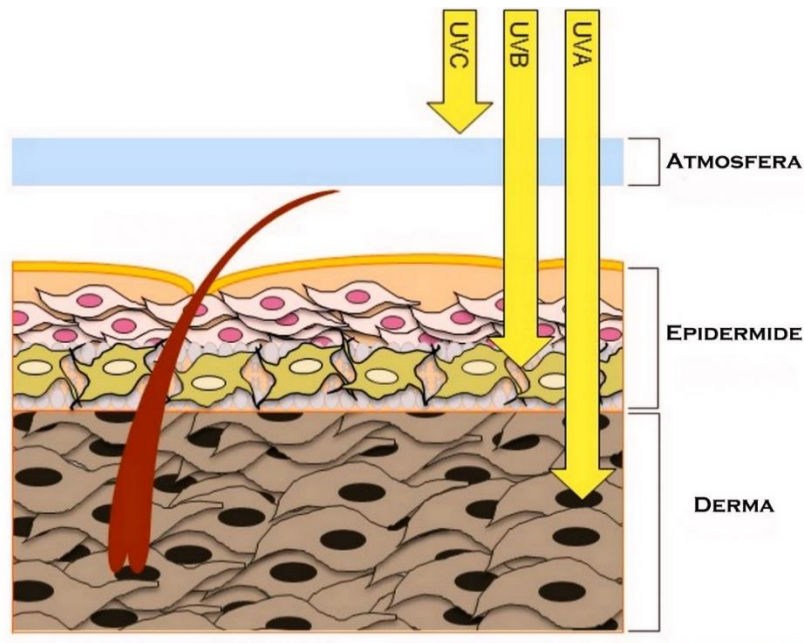


Figura 2.2 Penetrazione delle radiazioni UV nella pelle; *Fonte: <https://medicinaonline.com>*

Le radiazioni infrarosse sono quelle che penetrano negli strati più profondi della pelle e vengono percepite come calore, causando la vasodilatazione locale. L'esposizione eccessiva infatti può danneggiare la pelle per ipotermia, provocando sintomi che vanno dalla vasodilatazione alla disidratazione. Anche le radiazioni visibili (400-800 nm) raggiungono gli strati più profondi della pelle ma non sono altrettanto dannose, anzi sono fondamentali per la regolazione di alcune funzioni come il ritmo sonno-veglia e l'andamento circadiano degli ormoni.

2.1 Gli effetti dell'esposizione ai raggi ultravioletti

Alla fine degli anni Settanta è stata osservata una diminuzione lieve dei livelli generali di ozono nell'atmosfera e soprattutto nelle regioni polari del pianeta, fenomeno che ha portato alla formazione di un vero e proprio "buco". Questo fenomeno, causato dall'uso eccessivo di prodotti contenenti alogeni (soprattutto cloro e bromo), che reagiscono con l'ozono trasformandolo in ossigeno molecolare, ha provocato l'aumento della quantità di raggi UVB che raggiungono la superficie terrestre (*VanLoon GW et al., 2000*).

La sovraesposizione ai raggi UV può provocare effetti sia acuti che cronici sulla pelle, sugli occhi e sul sistema immunitario diventando talvolta anche responsabile dell'insorgenza di eritemi, immunodeficienze e invecchiamento cutaneo precoce. In molti studi è stato dimostrato che tra i danni associati alla sovraesposizione ai raggi UV, il cancro della pelle e il melanoma maligno sono tra gli effetti sulla salute più gravi oltre a un'altra serie di effetti (*Jurja S et al., 2017*). L'attenzione agli effetti generati da un'eccessiva esposizione ai raggi UV diventa sempre più importante poiché negli ultimi anni l'incidenza dei tumori della pelle è notevolmente aumentata a causa dell'incremento dell'esposizione umana al sole (*Hussein MR, 2005*). Di seguito sono descritti nel dettaglio gli effetti biologici generati dall'esposizione alle radiazioni UVA, UVB e UVC.

2.1.1 Le radiazioni UVA e i loro effetti biologici

I raggi UVA hanno una lunghezza d'onda compresa tra i 315 e i 400 nm e costituiscono circa il 95% della radiazione ultravioletta totale che raggiunge la superficie terrestre. Sono in grado di penetrare nella pelle raggiungendo il derma e quindi i melanociti (cellule labili all'azione degli UVA) ossidando la melanina presente (un pigmento con funzione di filtro poiché assorbe le radiazioni) (*Hussein MR, 2005*): per questo motivo gli UVA riescono a scurire immediatamente la pelle (*Wolber R et al, 2008*), provocando invecchiamento e nei casi più estremi tumori cutanei (*Narayanapillai Set al, 2012*).

È ormai scientificamente noto che l'irradiazione UVA causa la formazione di radicali liberi dell'ossigeno, ed è coinvolta anche nel processo di infiammazione. NF-kB, un eterodimero implicato nel processo di infiammazione, si trova normalmente nel citosol legato alla proteina inibitoria I κ B α . Gli UVA stimolano l'attività della chinasi IKK che fosforila I κ B α portando alla sua degradazione nel proteasoma e quindi alla liberazione di NF-kB che così trasloca nel nucleo, dove agisce da fattore trascrizionale. Questo meccanismo porta alla trascrizione dei geni di proteine coinvolte nel fenomeno dell'infiammazione come citochine (IL-1, IL-6), chemochine (IL8), molecole

di adesione (ICAM, VCAM) e di proliferazione (ad esempio la ciclina D1) (Syed DN et al., 2011).

La sovrapproduzione di ROS altera anche l'espressione delle metalloproteinasi (MMP, coinvolte nei processi di proliferazione, migrazione, apoptosi, angiogenesi e differenziamento), delle mitogen-activated protein kinase (MAPK, che regolano la proliferazione, l'espressione genica e l'apoptosi) e delle cyclin-dependent kinase (CDK, proteine regolatrici del ciclo cellulare).

Modifiche a questi pathway possono portare ad una alterata proliferazione e differenziazione delle cellule dell'epidermide nonché alla diminuzione della sintesi di collagene (a causa della up-regolazione degli enzimi di degradazione) (Baumann L, 2007).

2.1.2 Le radiazioni UVB e i loro effetti biologici

I raggi UVB possiedono una lunghezza d'onda tra i 280 e i 315 nm e sono per lo più assorbiti dallo strato di ozono, infatti solo il 5% dell'irradiazione ultravioletta arriva sulla Terra.

Gli UVB hanno un potere penetrante minore rispetto alle radiazioni UVA, infatti raggiungono lo strato basale dell'epidermide senza però penetrare nel derma. Questi raggi causano eritemi, ustioni ed abbronzatura ritardata (Wolber R et al., 2008) perché inducono l'espressione di geni coinvolti nella sintesi della melanina (Choi W et al., 2010). Come per l'irradiazione con gli UVA, la cellula

reagisce all'esposizione con i raggi UVB producendo immediatamente specie reattive dell'ossigeno (ROS) e in tempi successivi specie reattive dell'azoto (RNS) (*Terra VA et al., 2012*).

Avendo un'energia maggiore degli UVA, sono più dannosi (nonostante siano in quantità minore), perché vengono direttamente assorbiti dalle basi del DNA lesionandole. Mutazioni ad uno o più enzimi porta a malattie come lo xeroderma pigmentoso, che causa estrema fotosensibilità e alta insorgenza di tumori alla pelle (*D'Errico M et al., 2006*).

Basse dosi di UVB vengono tollerate dalla cellula, in quanto riesce a riparare i danni al DNA, alte dosi invece, causano lesioni così gravi da indurre la cellula ad andare in apoptosi.

I fotoni dei raggi UVB sono anche in grado di interagire direttamente con amminoacidi aromatici come triptofano e tirosina e in questo modo alterano la struttura delle proteine e di conseguenza anche la loro funzione (*Svobodová A et al., 2009*). Allo stesso modo degli UVA, anche gli UVB stimolano l'attività del fattore trascrizionale NFκB, coinvolto nei fenomeni di infiammazione (*Syed DN et al., 2011*).

2.1.3 Le radiazioni UVC e i loro effetti biologici

Gli UVC hanno lunghezza d'onda compresa tra i 100 e i 280 nm e rappresentano una parte dello spettro elettromagnetico potenzialmente molto

dannosa per la pelle. Hanno una lunghezza d'onda bassa, ma posseggono energia molto alta e sono in grado di penetrare la cute ad una profondità di 60-80 μm . Sono altamente tossici e mutageni per le cellule perché vengono assorbiti da diverse componenti cellulari quali proteine, membrane cellulari e DNA (infatti il picco di assorbimento massimo del DNA è tra 260 e 280 nm), inoltre, come per gli UVA e gli UVB, producono specie reattive dell'ossigeno. Il grosso danno causato da questi raggi spesso porta alla morte cellulare per necrosi (*Kostyuk V et al, 2008*). Fortunatamente vengono completamente schermati dallo strato di ozono presente nell'atmosfera e non raggiungono la superficie terrestre, per questo motivo il loro coinvolgimento nella cancerogenesi cutanea indotta da esposizione alla luce solare non risulta rilevante (*Hussein MR, 2005*).

2.2.1 Gli effetti delle radiazioni UV sulla cute

L'esposizione del corpo umano alla radiazione solare è un evento naturale e si può dire che gli organismi viventi abbiano raggiunto nel corso della loro evoluzione un delicato equilibrio tra effetti benefici e danni biologici prodotti dalla radiazione. Piccole dosi di radiazione UV sono infatti benefiche, mentre una eccessiva esposizione può avere conseguenze indesiderate per la salute. La condizione di esposizione ideale alla radiazione UV non è quindi l'assenza di

esposizione bensì una "giusta" dose che varia in funzione dell'età, del sesso e del tipo di pelle. (Link2)

Infatti, ogni individuo mostra un proprio comportamento cutaneo quando si espone alla luce solare: chi non ha mai sentito dire infatti “io mi abbronzò subito, ho la pelle scura, io mi scotto tutte le volte che mi espongo al sole perché ho la pelle chiara” ecc. Sono due estremi di valutazione dei caratteri biologici che condizionano gli effetti delle radiazioni solari sulla cute umana. In termini scientifici si parla di fototipo ossia del biotipo cutaneo in funzione della reattività alla luce. Si deve ad un dermatologo di Boston, U.S.A., T.B. Fitzpatrick, aver impostato il problema con rigore scientifico, definendo il tipo di pelle in rapporto al comportamento della stessa in occasione dell'esposizione al sole. Tale metodologia si basa su una anamnesi solare con la quale si definisce l'intensità e la durata della reazione eritematosa (scottatura) e la capacità di pigmentazione (abbronzatura), analizzate in base ai primi 45-60 minuti di esposizione al sole dopo l'inverno o dopo esposizione solare nulla.

Tabella 1 Classificazione del fototipo secondo Fitzpatrick e al.		
Fototipo	Sensibilità agli UV	Comportamento in occasione di esposizione al sole
I	elevata	si scotta sempre con facilità, non si abbronzano mai
II	elevata	si scotta sempre con facilità, si abbronzano poco
III	media	si scotta moderatamente, si abbronzano gradualmente
IV	scarsa	si scotta minimamente, si abbronzano sempre e con rapidità
V	minima	raramente si scotta, si abbronzano intensamente e con rapidità
VI	nulla	non si scotta mai, sempre intensamente pigmentato

Tabella1: Classificazione del fenotipo in relazione alla sensibilità agli UV; *Fonte:* <http://www.lucianoschiazza.it>

Come si vede dalla tabella 1, sono sei i tipi di pelle individuati nelle varie razze umane: i primi quattro appartengono ad individui caucasici, i tipi V e VI a soggetti meticci e negroidi, con agli estremi quegli individui che si scottano sempre e non si abbronzano mai e dall'altra coloro che si scottano minimamente e si abbronzano sempre con facilità, escludendo il fototipo VI.

La sensibilità dei singoli individui alla radiazione solare è stimata mediante il MED, spesso 24 ore dopo l'esposizione alle radiazioni. Il MED è definito come la Minima Dose Eritematogena, ovvero la più bassa dose di radiazione ultravioletta in grado di causare un arrossamento appena percettibile o un arrossamento dai bordi ben definiti (*Harrison GI and Young AR, 2002*).

Il MED è misurato su una scala numerica che va da 0 ad infinito e nella quale la dose minima di raggi UV con i quali si ha un arrossamento è fissata a 1. Si tratta quindi di una scala che varia da persona a persona: per un fototipo 2 ad

esempio la MED è molto bassa, mentre si alza enormemente per un fototipo IV o V. Solitamente si tende a considerare che fino a 1 MED non esistono effetti collaterali all'esposizione agli UV, mentre al di sopra si comincia a verificare, oltre all'arrossamento, anche l'invecchiamento cutaneo, il danneggiamento degli occhi se non adeguatamente protetti e le possibili reazioni foto allergiche o fototossiche. (*Harrison GI and Young AR, 2002*).

2.3 Effetti positivi delle radiazioni UV

Gli effetti positivi dell'esposizione a corrette dosi di radiazione UV possono essere ricondotti ai seguenti ambiti:

- Produzione di vitamina D (prevenzione dell'osteoporosi, del diabete di tipo 1, delle malattie autoimmuni e di diversi tipi di tumori)
- Produzione di serotonina (prevenzione depressione)
- Effetto disinfettante (limitazione proliferazione batteri)
- Terapie patologie dermatologiche (cura di diverse patologie quali psoriasi, vitiligine, dermatite atopica)

2.3.1. La produzione di vitamina D

I fotoni solari ultravioletti B vengono assorbiti dal 7-deidrocolesterolo nella pelle, portando alla sua trasformazione in previtamina D3, che viene rapidamente convertita in vitamina D3. Stagione, latitudine, ora del giorno,

pigmentazione della pelle, invecchiamento, protezione solare e vetro influenzano la produzione cutanea di vitamina D3. La forma attivata ossia la 1,25-diidrossivitamina D3 agisce anche come ormone che regola la funzione di vari organi e sistemi e ha un'azione modulante nei confronti dell'inflammatione e del sistema immunitario. Una sua carenza è stata associata a diversi tipi di malattie che vanno dal diabete all'infarto, dall'Alzheimer all'asma o alla sclerosi multipla (*Link3*).

2.3.2 La produzione di serotonina

La serotonina è un ormone e un neurotrasmettitore che prodotta centralmente influenza stati emotivi, appetito, cicli sonno-veglia e altri ritmi umani, mentre a livello periferico è prodotta principalmente dai neuroni del plesso mioenterico del tratto gastrointestinale e contribuisce all'emostasi, all'immunomodulazione e alla percezione del dolore e del prurito. I raggi UVA sono in grado di inibire l'azione dell'enzima N-acetiltransferasi che converte la serotonina in melatonina, alzando la concentrazione dell'ormone neurotrasmettitore che è appunto coinvolto nella regolazione dell'umore, dell'appetito e del ciclo sonno-veglia (*Gambichler T et al, 2002*).

2.3.3 L'abbronzatura

Le radiazioni UV del sole o di fonti artificiali aumentano la pigmentazione della pelle. Esistono tre fasi dell'abbronzatura:

- oscuramento immediato del pigmento (IPD),
- oscuramento persistente del pigmento (PPD)
- abbronzatura ritardata (DT).

L'oscuramento immediato del pigmento si verifica durante i primi minuti di esposizione ai raggi UVA e poi si attenua in poche ore, mentre quello persistente appare entro poche ore dalle dosi più elevate di esposizione ai raggi UVA e persiste fino a diversi giorni o settimane. L'abbronzatura ritardata invece si sviluppa invece dopo 3-7 giorni dall'esposizione ai raggi UVB e rimane per settimane. I meccanismi della pigmentazione indotta dai raggi UVA e UVB sono diversi. Gli UVA inducono l'oscuramento immediato e persistente attraverso l'ossidazione della melanina preesistente o precursori melanogenici. I primi tipi di pigmentazione vengono innescati dall'ossigeno e dai ROS che ne sono considerati responsabili. L'abbronzatura ritardata invece deriva dalla sintesi della melanina nei melanociti, seguita dalla distribuzione della melanina nei cheratinociti vicini. I livelli di radiazione UV del sole variano con la latitudine, l'altitudine, il tempo, ora del giorno e la stagione dell'anno. In

determinate condizioni la pigmentazione indotta dagli UVA dura più a lungo dell'abbronzatura ritardata indotta dagli UVB. Ciò può essere parzialmente spiegato dal fatto che l'abbronzatura indotta dagli UVB si trova negli strati superiori dell'epidermide, mentre quella indotta dagli UVA è localizzata principalmente nello strato cellulare basale. Alte dosi di radiazioni UV provenienti non solo dal sole ma anche dai dispositivi di abbronzatura solare o indoor, portano non solo all'abbronzatura ma anche all'insorgenza di eritemi, all'immunosoppressione locale e sistemica, al danno del DNA, al fotoinvecchiamento e alla fotocarcinogenesi.

2.3.4. Il trattamento di patologie dermatologiche

La radiazione solare ultravioletta (UV) è stata utilizzata fin dall'antichità per curare varie malattie grazie al fatto che un gran numero di molecole cromofore presenti in diversi strati della pelle interagiscono e assorbono i raggi UV. Queste interazioni possono avere implicazioni biologiche sia positive che negative. Diverse malattie della pelle umana, come la psoriasi, la vitiligine, la dermatite atopica e la sclerodermia localizzata, possono essere trattate con radiazioni solari (elioterapia) o radiazioni UV artificiali (fototerapia). Basse dosi sia di UVA che di UVB sono utilizzate infatti per la cura di queste patologie infiammatorie o autoimmuni grazie alla loro capacità di generare effetti immunosoppressivi (*Juzeniene A et al, 2012*).

2.4. Gli effetti negativi delle radiazioni UV

Gli effetti negativi delle radiazioni UV sono proporzionali al tempo di esposizione come dimostra il grafico sotto riportato.

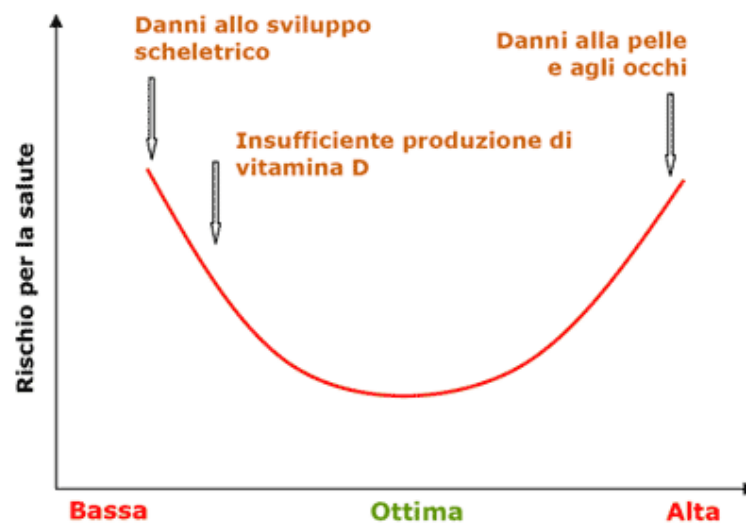


Figura 2.3 Il seguente grafico rappresenta gli effetti delle radiazioni solari avendo sull'ascissa i tempi di esposizione e sull'ordinata il rischio per la salute umana.

Fonte: <https://www.arpae.it>

Nello specifico, gli effetti negativi delle radiazioni solari sono eritema solare, tumore della pelle, danni oculari, invecchiamento, fotocarcinogenesi e produzione di radicali liberi.

2.4.1. L'eritema solare

La parola eritema solare deriva dal termine greco “erythema” e indica un arrossamento della pelle, determinato dalla dilatazione dei vasi sanguigni

superficiali del derma. In altre parole, l'eritema è la risposta ad un'esposizione della pelle a entrambe le lunghezze d'onda, UVA e UVB. La risposta agli UVA è variabile da soggetto a soggetto, a tal punto che l'eritema può verificarsi o no. Gli UVB producono un eritema ritardato, che si instaura dopo 3-4 ore dall'esposizione e si intensifica per 12-24 ore e può essere accompagnato da dolore prurito e formazione di bolle. (*Nelson C.G, 2005*). Diversi studi hanno dimostrato che i raggi UVB sono più efficaci per unità di dose (J/cm^2) degli UVA di diversi ordini di grandezza nell'indurre eritema. In particolare, è noto che il MED degli UVA ($20-80 J/cm^2$) è mille volte inferiore a quello degli UVB ($20-70 mJ/cm^2$) (*Harrison GI and Young AR, 2002*).

2.4.2. La fotocarcinogenesi

La luce ultravioletta è stata identificata come il più importante fattore di rischio ambientale nello sviluppo del cancro della pelle (*Preston e Stern, 1992; Krickler et al., 1994; Elwood e Jopson, 1997; Armstrong e Krickler, 2001*).

I tre principali tipi di tumori della pelle, che possono essere distinti tra gli individui di pelle chiara, sono il carcinoma a cellule squamose (*Alam e Ratner, 2001*), il carcinoma a cellule basali (*Goldberg, 1996*) e il melanoma maligno (*Gilchrest et al, 1999*).

Il **carcinoma a cellule squamose (CSC)** rappresenta il 20% dei tumori cutanei e insorge dai cheratinociti epidermici ed ha una bassa capacità di formare metastasi, ma più alta del carcinoma a cellule basali (CBC). Si sviluppa velocemente in aree esposte alla luce o da lesioni preesistenti, ma può anche insorgere in zone non fotoesposte.



Figura 2.4 Carcinoma a cellule squamose: *Fonte: <https://www.dermaclub.it>*

Il **carcinoma a cellule basali (CBC)** rappresenta la forma più comune e frequente (75%) dei tumori cutanei. Si tratta di un tumore maligno aggressivo ed infiltrante, che origina dallo strato delle cellule basali dell'epidermide ma che raramente metastatizza. Questo tipo di tumore ha una forte tendenza a recidivare se non si procede ad una ampia escissione della zona di cute coinvolta. Cresce nelle parti più esposte alla luce (spesso viso, labbro superiore) e la sua incidenza aumenta con l'età del paziente.



Figura 2.5 Carcinoma a cellule basali; *Fonte: <https://www.dermaclub.it>*

Entrambi questi due tipi di tumori cutanei sono non melanomatosi . Il **melanoma** è invece la forma più comunemente fatale di cancro della pelle, con quasi 50.000 decessi annuali in tutto il mondo (Epidemia di melanoma: un'analisi di sei decenni di dati dal registro dei tumori del Connecticut). (*Alan C. Geller et.al 2013*). Tuttavia è il più raro, rappresenta solo il 5% dei tumori cutanei. E' un tipo di tumore che colpisce entrambi i sessi in ugual misura, prediligendo le persone con carnagione chiara, capelli rossi o biondi, occhi blu. La sua correlazione con l'esposizione agli UV è evidente, tanto che i pazienti colpiti da questo tipo di tumore presentano nella loro storia clinica ripetuti episodi di fotostione (*Galli CLet al. Tossicologia, II edizione, Piccin*).

E' relativamente raro nelle popolazioni con carnagione scura. Questo tipo di tumore può originare 'de novo' dalla cute sana o da una lesione preesistente. Circa il 15% origina da nevi. La maggior parte delle varianti ha dapprima una crescita superficiale (radiale): questa è la fase in cui può esser maggiormente

curato con l'escissione chirurgica. Durante questa fase i melanociti proliferano lateralmente nell'epidermide, lungo la linea di giunzione dermo-epidermica o nel derma papillare ma non metastatizzano. Col passare del tempo possono entrare in una fase di crescita verticale in cui le cellule penetrano nel derma reticolare sottostante. La comparsa di un nodulo lungo il margine laterale di una melanoma maligno costituisce un marker della crescita verticale. Vi sono quattro tipi di melanomi: il melanoma a diffusione superficiale, la lentigo maligna, il melanoma nodulare e il melanoma lentiginoso acrale (*Celotti F e Veraldi S. Patologia generale e fisiopatologia. Edises*).



Figura 2.6 Melanoma; *Fonte: <https://www.bcrmagazine.it>*

2.4.3. I danni oculari

Oltre alla pelle, anche gli occhi sono molto colpiti dalle radiazioni ultraviolette. Gli effetti dell'esposizione acuta comprendono fotocheratite e fotocongiuntivite (risposte infiammatorie analoghe all'eritema nella cute). Una

prolungata esposizione, in particolare ai raggi UVB, causa patologie come pterigio (data da una crescita anomala della congiuntiva sulla cornea) e cataratta (cioè la perdita di trasparenza del cristallino) (*Yam JC et al., 2013*). Oltre il 99% della radiazione UV viene assorbita dalla parte anteriore degli occhi, causando, danno corneale, cataratta e degenerazione maculare e nei casi più gravi possono portare alla cecità. Il melanoma, può anche svilupparsi dentro l'occhio nell'iride, corpo ciliare o coroide, prendendo il nome di melanoma uveale. Il melanoma uveale è il tumore primario dell'occhio più comune con una incidenza annuale che va da circa due casi per milione in paesi dell'Europa meridionale a otto casi nel nord dei Paesi europei.

2.4.4. Il Fotoinvecchiamento

Partendo dal presupposto che le teorie per spiegare l'invecchiamento sono centinaia, la scienza ha comunque stabilito con certezza che i fattori che lo determinano sono numerosi e che essi agiscono simultaneamente. In generale l'invecchiamento può essere definito come “la somma di tutti i cambiamenti fisiologici, genetici e molecolari che si verificano con il passare del tempo”. Si tratta di un processo fisiologico, che comporta il progressivo declino delle funzioni biologiche dell'organismo. Le nostre cellule subiscono delle trasformazioni che le rendono difficilmente riconoscibili dal nostro organismo e che pertanto tende ad eliminarle. In alternativa, l'invecchiamento può essere

visto come il risultato di un progressivo accumulo di errori nei processi che si svolgono all'interno delle cellule, che perdono così nel tempo la loro funzione. Le cause principali alla base dell'invecchiamento cutaneo sono di natura genetica, costituzionale e ambientale. A tal proposito è importante considerare la differenza tra due tipi di invecchiamento: quello intrinseco e quello estrinseco. L'invecchiamento intrinseco, anche detto cronologico, è legato all'età dell'individuo. Si tratta di un processo individuale che può presentarsi più o meno precocemente e con evidenza più o meno marcata a seconda della predisposizione genetica ed ereditaria di ciascuno di noi. Gli ormoni svolgono un ruolo molto importante nell'invecchiamento cutaneo, ad esempio in seguito alla menopausa si osserva spesso una riduzione dello spessore della pelle e una diminuzione della sua idratazione oltre che dell'elasticità. L'invecchiamento estrinseco, anche detto fotoinvecchiamento, è invece indipendente dall'età, ma si associa a numerosi fattori come le abitudini di vita e alimentari, le malattie, l'inquinamento ambientale, l'esposizione alle radiazioni solari ecc. (*Link 4*). Nei nostri cromosomi esiste un particolare "orologio biologico" dell'invecchiamento, il telomero, una specie di capsula che protegge il nostro prezioso DNA e ne comanda la riparazione. Il sole e in particolare i raggi UV e infrarossi disattivano questo "orologio", con effetti cumulativi nel corso dell'intera vita, a partire dall'infanzia. Inoltre, i ricercatori della School of

Medicine dell'Università di Yale hanno scoperto che le cellule responsabili della colorazione della pelle (melanociti) possono accumulare mutazioni pericolose anche nelle ore successive all'esposizione solare. I radicali liberi prodotti alterano la melanina e quando l'energia viene rilasciata il DNA subisce ulteriori lesioni, anche diverse ore dopo l'esposizione.

L'integrità strutturale della pelle dipende dal collagene. Il collagene è la principale proteina fibrosa insolubile che si trova nel tessuto connettivo e nella matrice extracellulare cutanea dove fornisce alla pelle forza e resistenza. La sintesi di collagene è finemente regolata da eventi intracellulari ed extracellulari. E' stato dimostrato che il fattore di crescita, citochina profibrotica TGF- β , regola molteplici funzioni cellulari, tra cui differenziazione, proliferazione e sintesi delle principali proteine della matrice extracellulare, cioè collagene ed elastina. Nella pelle umana, il TGF- β inibisce la proliferazione dei cheratinociti e stimola i fibroblasti. (*Sérgio Schalka et al. 2014*). L'altro importante regolatore, il quale si forma in seguito all'eterodimerizzazione dei fattori di trascrizione c-Fos e c-Jun, è la proteina 1 dell'attivatore del fattore di trascrizione (AP-1) che inibisce la sintesi del collagene e ne promuove la decomposizione. Studi recenti mostrano che l'AP-1 può anche essere indotto dalla proteina 61 (CYR61) ricca di cisteina, che è un altro importante regolatore della sintesi del collagene che viene attivato dalla

radiazione UV. Il meccanismo attraverso il quale deriva la scomposizione del collagene e l'inibizione della sintesi, tuttavia, dipende dall'insulto a cui è esposta la pelle e dal tipo di pelle dell'individuo. Il diagramma riportato di seguito illustra il meccanismo molecolare del fotoinvecchiamento.

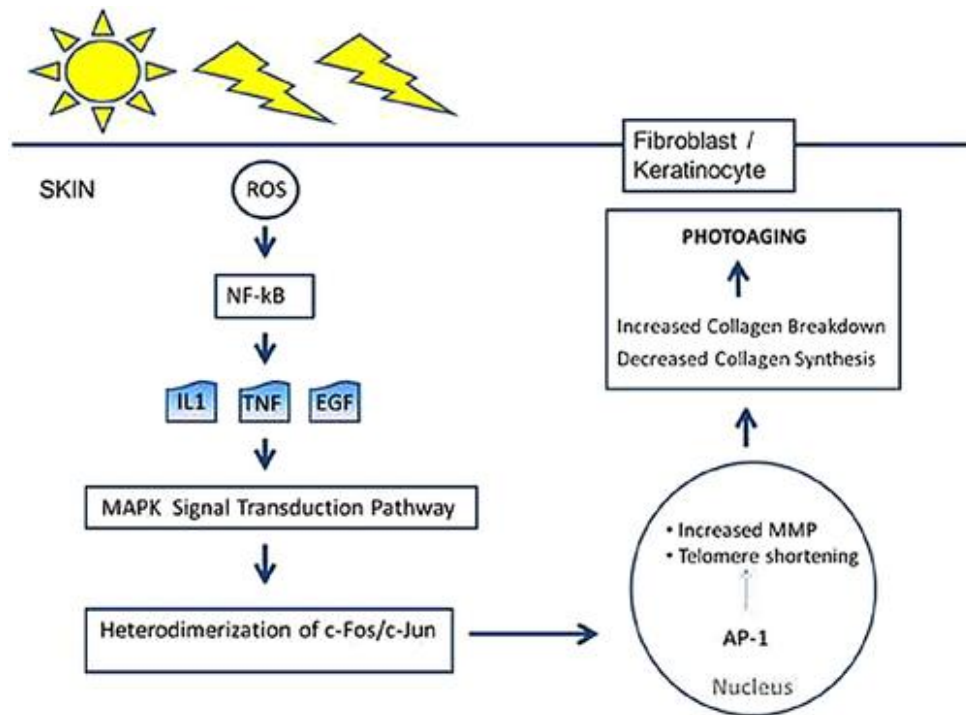


Figura 2.7 Meccanismo molecolare del fotoinvecchiamento;
fonte: <https://www.google.com>

La radiazione ultravioletta innesca la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che a loro volta attivano il fattore nucleare kappa-B (NF-kB). L'attivazione di questo fattore di trascrizione promuove l'espressione delle citochine proinfiammatorie e dei fattori di crescita, rispettivamente l'interleuchina-1 (IL1), il fattore di necrosi tumorale (TNF) e il fattore di

crescita epidermica (EGF) che a loro volta vanno ad attivare il pathway regolato dalla protein chinasi, MAPK. L'attivazione di questi meccanismi determinano successivamente il potenziamento degli effetti delle metalloproteinasi della matrice extracellulare (MMP).

Nello specifico, MMP-1 distrugge il collagene di tipo I, l'MMP-2 degrada l'elastina così come i composti della membrana basale compresi il collagene di tipo IV e VII, mentre l'MMP-3 mostra la più ampia specificità di substrato per le proteine come il collagene di tipo IV, i proteoglicani, la fibronectina e la laminina. (*Pinnell S R, 2003*).

Allo stesso tempo, anche la sintesi del collagene viene ridotta, in seguito all'inibizione della via del TGF- β , con conseguente riduzione del pro-collagene I e aumento della sintesi di MMP, con conseguente degrado progressivo delle fibre di collagene. (*Sérgio Schalka et al. 2014*)

Sebbene venga prodotto del collagene compensativo fresco in risposta all'insulto UV, con una continua esposizione ai raggi UV, il risultato finale è lo sviluppo di "cicatrici solari", che possono portare nel tempo a danni visibili evidenti come le rughe. (*Flora P. et al., 2014*)

CAPITOLO 3

3. La produzione dei radicali liberi

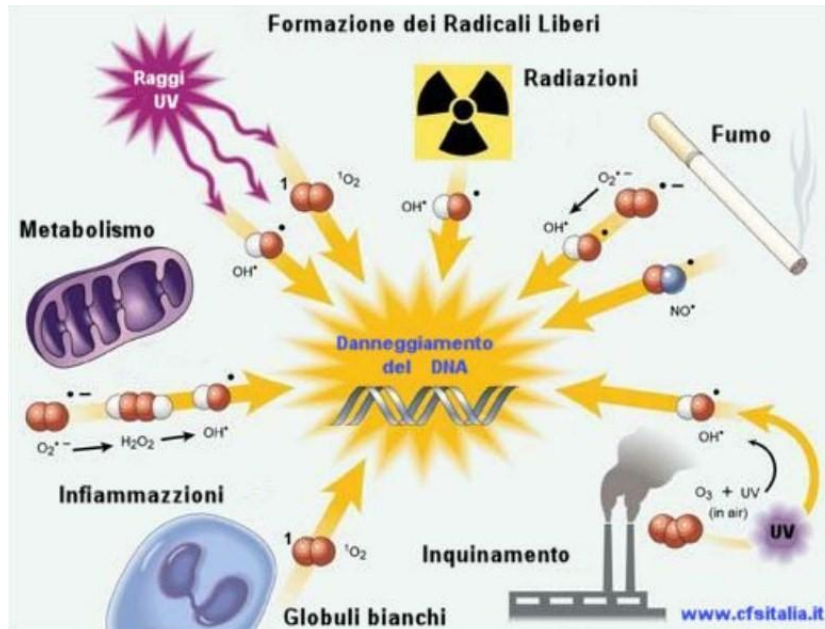


Figura 3.1. Cause possibili che portano alla formazione di radicali liberi; *Fonte:* www.anagen.ne

I radicali liberi, o più in generale, le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e le specie reattive dell'azoto (RNS), o collettivamente RONS sono prodotti del normale metabolismo cellulare e si formano continuamente nelle cellule a seguito di reazioni enzimatiche e non enzimatiche (*Patricia Coutinho de Souza et al 2015*). Sono prodotti dalle radiazioni, dalla luce ultravioletta, dal metabolismo di farmaci, da prodotti chimici esogeni, dal fumo di sigaretta, dall'infiammazione ma anche dalle reazioni di ossidazione endogena durante le normali reazioni metaboliche (*Celotti F e Veraldi S. Patologia generale e*

fisiopatologia. Edises). La loro produzione quindi è anche un evento fisiologico e varie sostanze che si formano in seguito a eventi radicalici, svolgono funzioni regolatorie nell'organismo. Infatti in condizioni fisiologiche partecipano a molti processi come il controllo dell'espressione genica, la trasduzione del segnale, la respirazione cellulare e l'apoptosi. I radicali dell'ossigeno, quali l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il radicale ossidrile (OH^{\cdot}) (*He YY et al., 2005; Wang CC et al., 2013*) sono in grado di reagire con diversi elementi cellulari come i carboidrati, il DNA, le proteine e i lipidi. Tuttavia l'esposizione cronica ai raggi ultravioletti è dannosa e pericolosa in quanto la luce UV può penetrare nella cute e compromettere la difesa antiossidante cellulare di diversi tipi cellulari compresi i fibroblasti umani (HDF) cutanei, che svolgono un ruolo importante nel mantenimento della normale struttura e funzione della pelle. (*Cheng J.Z. 1999 et al, 2019*). Quindi si può instaurare una situazione di disequilibrio tra antiossidanti e radicali, chiamata stress ossidativo. Tra i principali radicali troviamo :

- L'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$)
- Radicale idrossile (OH^{\cdot})

L'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), è il risultato della riduzione univalente dell'ossigeno diatomico (Miller et al. 1990). Processi spontanei che si verificano in prossimità della membrana mitocondriale interna (*Cadenas and*

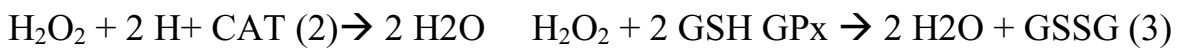
Sies 1998), e catalizzati sia da enzimi che metalli (*Valko et al. 2005*) ne presiedono la formazione. In particolare, l'anione superossido può generarsi:

- per il trasferimento di elettroni, che occasionalmente sfuggono ai complessi della catena di trasporto mitocondriale, all'ossigeno molecolare;
- nel corso di ossidazioni metallo-dipendenti di neurotrasmettitori, quali adrenalina e noradrenalina, e di alcuni composti tiolici;
- per produzione diretta nel corso di alcune reazioni catalizzate da ossidoreduttasi quali la xantina ossidasi, implicata nel metabolismo delle basi azotate (*Nedergaard and Dirnagl 2005; Kuppusamy and Zweier 1989*);
- nei processi di stimolazione delle cellule fagocitarie del sistema immunitario (macrofagi, monociti e granulociti neutrofili) volti alla eliminazione di diversi ceppi batterici mediante il rilascio di radicali liberi e specie ossidanti (*Valko et al. 2007*). Enzima chiave del burst ossidativo è la nicotinammide adenin dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi, proteina ampiamente caratterizzata nei neutrofili, dove esplica la sua funzione rilasciando $O_2^{\cdot-}$ necessario per la distruzione dei batteri (*Valko et al. 2007*).

La citotossicità dell'anione superossido è parzialmente limitata dalla sua carica negativa, che ne ostacola la diffusione attraverso la membrana mitocondriale, e da processi di dismutazione che possono avvenire sia spontaneamente (Allen

1977) sia in reazioni catalizzate da enzimi appartenenti alla famiglia delle superossido dismutasi (SOD).

Dalla reazione di dismutazione, si forma perossido di idrogeno, specie reattiva dell'ossigeno non radicalica, che viene rapidamente neutralizzato dagli enzimi catalasi (2) e glutatione perossidasi (3):



Pur non essendo una molecola particolarmente reattiva, l' H_2O_2 riveste un ruolo importante nei sistemi cellulari, sottolineato dalla sua capacità di diffondere velocemente attraverso le membrane biologiche raggiungendo altri distretti dove può attivare processi perossidativi. Come intermedio, inoltre, il perossido di idrogeno partecipa a reazioni che inducono la formazione di ROS altamente reattivi, in modo particolare il radicale idrossile (OH^\bullet).

Il radicale idrossile (OH^\bullet) ha un'emivita di soli 10^{-9} s circa (*Pastor et al. 2000*), presenta una reattività tale da poter reagire in vivo in prossimità del sito di formazione (entro pochi Angström). Fatta eccezione dell' OH^\bullet prodotto dall'eccessiva esposizione a radiazioni ionizzanti, gran parte del radicale idrossile formatosi *in vivo*, deriva dall'interazione dell' H_2O_2 con metalli (M^{n+}), quali Ti^{3+} , Cu^+ , Fe^{2+} (Walling 1982) o Co^{2+} (*Gutteridge and Bannister 1986*).

Il principale bersaglio dei ROS è rappresentato dalla componente fosfolipidica delle biomembrane e delle lipoproteine plasmatiche (Kowaltowski *et al.* 1999). La perossidazione lipidica è un processo causato dall'interazione tra molecole ossidative reattive libere e atomi di idrogeno presenti negli acidi grassi: questo dà origine a radicali lipidici. Questi radicali sono a loro volta instabili e si legano facilmente all'ossigeno molecolare formando radicali perossili lipidici che sono in grado di ossidare altri lipidi, innescando così una reazione a catena. Le molecole più suscettibili ad un attacco radicalico sono gli acidi grassi insaturi, in particolare i polinsaturi presenti nei fosfolipidi ed il colesterolo che fanno parte delle membrane cellulari. Il principale prodotto di reazione della lipoperossidazione è la malondialdeide (MDA), un'aldeide reattiva in grado di reagire con la deossiguanina e la deossiadenosina del DNA formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi.

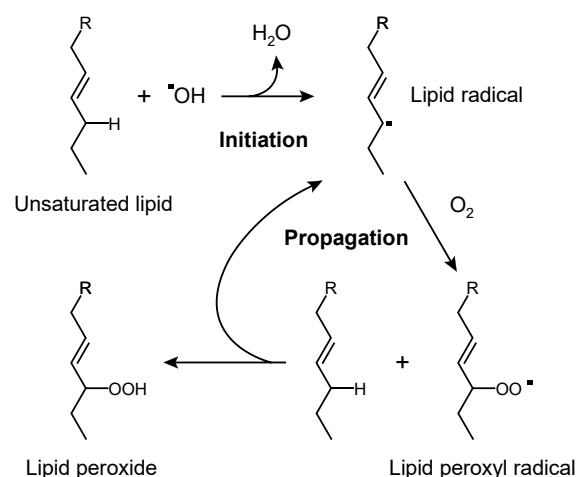


Figura 3.2. Processo di perossidazione lipidica; *Fonte: <https://it.wikipedia.org>*

Per stimare la quantità di MDA si sfrutta la sua reattività con l'acido tiobarbiturico (TBA): la condensazione di queste due molecole origina un composto fluorescente facilmente rilevabile spettrofotometricamente (*Hseu Y-C et al, 2012*). Inoltre i radicali possono danneggiare anche le proteine (*Kehrer et al.1993*) modificando le proprietà fisiche, e strutturali pertanto viene meno anche la funzione poichè struttura e funzione sono strettamente correlate. Gli aminoacidi più sensibili, ovvero quelli che assorbono maggiormente la radiazione UVB, sono gli aminoacidi aromatici come triptofano e tirosina. (*Verschooten et al. 2006*). Queste modifiche possono modificare l'attività di alcuni enzimi e causare frammentazione, aggregazione e suscettibilità alla digestione proteolitica (*Rivett, 1986*). Infine, l'azione dannosa dei ROS può esplicarsi anche a livello del DNA sia nucleare che mitocondriale.

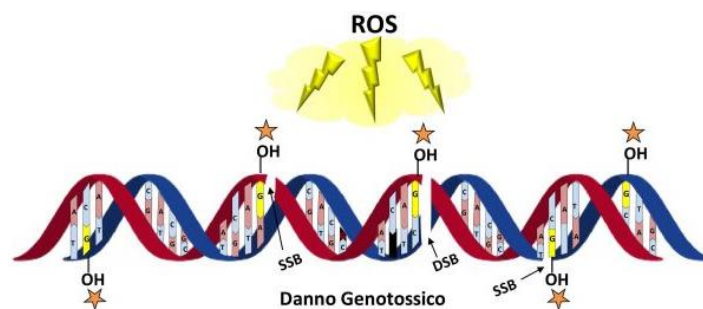


Figura 3.3. L'immagine mostra le rotture a doppia (DSB) e singola elica del DNA e l'ossidazione della guanina; *Fonte: <https://www.unina.it>*

In particolare, il radicale ossidrilico è noto per la sua capacità di reagire con tutti i componenti del DNA, danneggiando sia le basi che lo scheletro carbonioso del deossiribosio (*Dizdaroglu et al. 2002*). La doppia elica viene

danneggiata, in modo indiretto dai ROS che reagiscono con gli acidi nucleici, in particolare con le pirimidine, causando danno al DNA. Esistono però delle glicosilasi, specifiche e non, che sono coinvolte nel processo di riparazione per escissione di basi (BER), che riconoscono queste basi modificate e le eliminano dal DNA lasciando un sito abasico, che viene poi processato dalla polimerasi β (*D'Errico M et al., 2006*). Non sempre però la correzione dei danni è efficace: le rotture al singolo filamento (SSB) non riparati nella fase G1 del ciclo cellulare possono generare danni alla doppia elica (DSB) nella fase S (*Wischermann K, 2008*). Ciò potrebbe portare ad aberrazioni cromosomiche come delezioni, traslocazioni, amplificazioni (*Valko M et al, 2004*) o addirittura al blocco totale dei processi di replicazione del DNA (*Harman D, 1981*). Sembra, però, che gli UVA non siano in grado di causare DSB in maniera diretta, a causa della bassa energia dei loro fotoni (*Greinert R, 2012*).

Nell'ambito delle basi puriniche e pirimidiniche, la guanina risulta essere quella più suscettibile all'ossidazione ed il prodotto di questa reazione, l'8oxoG, è uno dei marker più rilevanti del danno ossidativo al DNA. Questa viene di solito prodotta da lunghezze d'onda di circa 350 nm, mentre lunghezze d'onda più alte causano danni maggiori che possono portare a fenomeni di mutagenesi e cancerogenesi (*Runger TM et al., 2007*), motivo per cui gli UVA, insieme agli UVB, sono stati classificati come cancerogeni di classe I

dall'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (*El Ghissassi F et al., 2009*).

I ROS possono inoltre danneggiare diverse componenti del mitocondrio. L'attacco radicalico alla membrana del mitocondrio causa la perdita di potenziale di membrana e la conseguente liberazione di fattori apoptogenici come l'AIF (apoptosis inducing factor) e il citocromo c che inducono la cellula ad andare in apoptosi (*Viola G et al., 2008; Jandova J et al., 2012*).

Anche il DNA mitocondriale (mtDNA) è bersaglio dell'attività dei ROS ed è più sensibile del DNA nucleare a causa della mancanza di un sistema di riparazione e dell'assenza di proteine istoniche (*Cadenas E et al., 2000*). Le mutazioni al mtDNA possono portare alla sintesi di proteine della catena respiratoria alterate, con conseguente aumento di ROS e ulteriori danni al DNA mitocondriale.

I ROS possono, inoltre, reagire con le proteine. Sono in grado di provocare modifiche reversibili o irreversibili, che determinano cambiamenti strutturali e poichè struttura e funzione sono correlati, una modifica alla prima causa inevitabilmente anche un cambiamento funzionale che può tradursi in degradazione, misfolding o aggregazione. L'eccessiva ossidazione e il conseguente cross-linking, invece, rendono le proteine resistenti alla degradazione (*Davies KJ, 1987*).

3.1 Gli antiossidanti

Lo stress ossidativo può essere facilmente definito come la condizione derivante dallo squilibrio tra le specie tossiche reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) e i sistemi antiossidanti. (Iona Miruna B. et al, 2016)

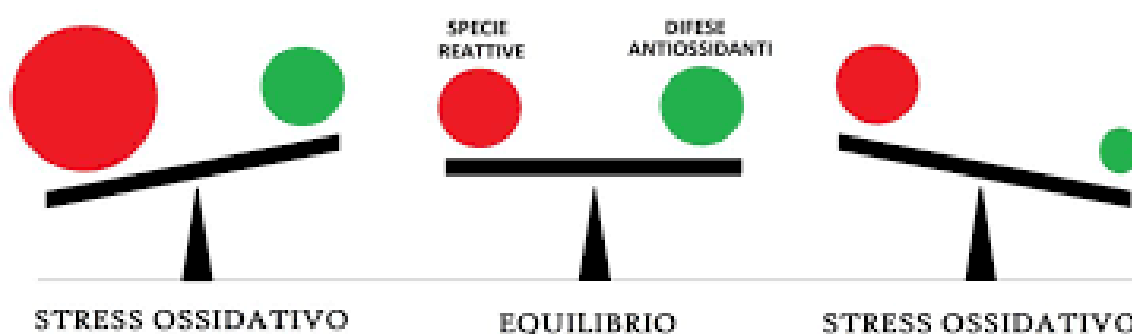


Figura 3.4 L'immagine mostra come un disequilibrio tra radicali e antiossidanti, che sia a favore degli uni o degli altri, sono causa di stress ossidativo. Fonte: <https://www.google.com>

E' anche noto che lo stress ossidativo rappresenti una condizione patologica causata da uno sbilanciamento fra la produzione e l'eliminazione, da parte dei sistemi di difesa antiossidanti, di specie chimiche ossidanti. L'alterazione dello stato ossido-riduttivo intracellulare è stato dimostrato essere presente in diversi tipi di cellule cancerose rispetto alle cellule normali; questo sbilanciamento si pensa sia correlato con la stimolazione oncogenica. L'insorgenza di una mutazione nel DNA è considerato uno step importante nella cancerogenesi. (Valko M et al, 2006).

Tutti e quattro i nucleotidi possono subire modificazioni ossidative, anche se le pirimidine (citosina e timina) sembrano essere più suscettibili ai processi di idrossilazione, saturazione, apertura o condensazione dell'anello imidazolico. Inoltre, la guanina può andare incontro alla formazione di un derivato ossidato, quale l'8-oxoguanina (8-oxoG) che si rinviene spesso come comune denominatore di patologie neurodegenerative come il Morbo di Parkinson, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e l'Alzheimer. (*Schraufstatter I. et al, 1988*). Inoltre, sembra che il danno al DNA sia particolarmente legato al processo di iniziazione della carcinogenesi (*Valko M et al, 2006*).

Per i motivi appena descritti gli organismi hanno sviluppato un sistema di difesa antiossidante che può essere suddiviso in diverse classi:

- difese antiossidanti di natura enzimatica e non, che interagiscono direttamente con i radicali liberi;
- complessi metalloproteine/enzimi (come ferritina e transferrina) che riducono la partecipazione di metalli pesanti (come ferro e rame) alla formazione di ROS;
- sistemi che riparano biomolecole dopo che sono state danneggiate dai ROS come polimerasi, lipasi e proteasi.

I sistemi enzimatici principalmente coinvolti sono:

- la superossido dismutasi (SOD)

- la catalasi (CAT)
- la glutazione perossidasi (GPx)

Tutti questi enzimi sfruttano la presenza dello ione di un metallo di transizione redox-attivo. In condizioni ideali la SOD, la CAT e la GPx agiscono in maniera ordinata e sequenziale potenziandosi nel loro importante ruolo di antiossidanti. Tuttavia, questi sistemi di protezione non possono impedire l'instaurarsi del danno cellulare, quando la formazione dei radicali supera le loro capacità tampone o quando i sistemi di protezione sono inefficaci. (*Celotti F e Veraldi S. Patologia generale e fisiopatologia. Edises*).

La superossido dismutasi è un metalloenzima, agisce sullo ione superossido ($O_2^{\cdot -}$) trasformandolo in ossigeno molecolare (O_2) e acqua ossigenata (H_2O_2) e costituisce il primo sistema di difesa contro i danni causati da radicali dell'ossigeno; per questo motivo è un enzima essenziale per tutti gli organismi aerobi. Esistono 3 isoforme, ognuna delle quali è legata ad un metallo diverso: CuZn-SOD (legata uno ione rame e uno ione zinco), Mn-SOD (legata ad uno ione manganese) e Fe-SOD (unita ad uno ione ferro). (*Hermes-Lima M et al, 2004*).

Il MnSOD (SOD2) contenente manganese, localizzato nella matrice mitocondriale, è il più divergente e mostra una minima somiglianza con gli altri SOD, che condividono il 60% di omologia attorno ai domini catalitici e leganti

il metallo. A causa delle loro distinte localizzazioni e dell'impermeabilità della membrana di $O_2^{\cdot-}$, si prevede che ciascun membro della famiglia SOD abbia ruoli compartimentati specifici, come la regolazione dei fattori di trascrizione sensibili al redox, il rilevamento del livello di ossigeno mitocondriale o protezione del tessuto circostante dall'infiammazione ossidativa durante l'infezione. Ciò implica che le funzioni SOD non sono ridondanti, nonostante abbiano costanti di velocità simili. (*Brandon Griess et al, 2017*)

Le catalasi sono enzimi contenente gruppo eme in grado di distruggere alti livelli di H_2O_2 prodotti all'interno delle cellule sotto stress ossidativo. Le catalasi dei mammiferi sono in genere omotetrameri che legano 4 Fe-protoporfirina IX (eme) e da 2 a 4 molecole NADPH. Oltre all'attività di dismutasi, la catalasi agisce anche come perossidasi. Entrambe le attività sono eme-dipendenti (*Ritu Chakravarti et al, 2015*)

Il glutathione perossidasi invece, è un enzima selenio-dipendente, presente nel citosol e nei mitocondri, formato da 4 subunità in grado di inattivare il perossido di idrogeno e altri perossidi (attraverso un complesso ciclo di reazioni) portando rispettivamente alla formazione di acqua e alcoli. Ne esistono 5 isoforme (GPx-1/GPx-5), che differiscono per localizzazione cellulare e tissutale. Le GPx sono in grado di metabolizzare i perossidi organici

come i perossidi lipidici derivati dal processo di lipoperossidazione (*Hermes-Lima M et al.,2004*).

Esistono in natura sostanze che sono in grado di reagire con i radicali liberi.

Queste sostanze possono essere di due tipi:

- gli scavenger: agenti che riducono la concentrazione di radicali liberi grazie alla loro capacità di reagire con essi, ossidandosi a loro volta;
- i chainbreaker: capaci di bloccare la propagazione delle reazioni radicaliche a catena.

Questi antiossidanti sono molto presenti nel mondo vegetale e sono suddivisi in tre categorie:

- vitamine
- carotenoidi
- polifenoli

Tra le vitamine, quelle con il maggiore potere antiossidante sono la vitamina C (di tipo idrosolubile) e la vitamina E (di tipo liposolubile).

La vitamina C o acido ascorbico è un potentissimo riducente ed in presenza di ossigeno e metalli tende ad ossidarsi formando acido L-deidroascorbico ed acqua ossigenata. La vitamina E, detta anche tocoferolo, è in grado di prevenire l'ossidazione degli acidi grassi di membrana, evento chiave nello sviluppo del

processo di lipoperossidazione. La vitamina E è in grado di donare un atomo di idrogeno ai radicali perossili lipidici, rendendoli meno reattivi.

Alcuni studi hanno proposto anche una sua attività di regolatore genico (*Azzi et al, 2002*). I carotenoidi invece, sono una classe di oltre 600 pigmenti presenti in piante e batteri ma non negli animali. Sono suddivisi in due classi: i caroteni, che sono privi di ossigeno, e le xantofille che invece contengono ossigeno. Sono pigmenti accessori che assorbono luce ad una lunghezza d'onda diversa rispetto alla clorofilla, infatti hanno un colore giallo-rosso. Negli organismi fotosintetici prendono parte alla catena di trasporto dell'energia e proteggono il centro di reazione dei fotosistemi, coinvolti nel processo di fotosintesi.

Nell'uomo (che deve assumerli con la dieta), hanno un importante ruolo come antiossidanti (che varia a seconda della loro struttura): agiscono contro $O_2^{\cdot-}$, e H_2O_2 . I carotenoidi, invece di generare altre reazioni chimiche, dissipano l'energia rilasciandola nel mezzo in cui si trovano e sono quindi subito disponibili per agire su altri radicali liberi (*Sies H et al, 1995*). Negli organismi umani i caroteni sono precursori della vitamina A (sono definiti, infatti, provitamina A), molto importante per la vista, la crescita ossea e lo sviluppo embrionale (*Zile MH, 1998*).

I polifenoli, invece, sono una famiglia di oltre 5000 molecole organiche derivate dal metabolismo secondario delle piante. Sono molecole segnale per

la maturazione e la crescita, danno resistenza contro i patogeni e gli insetti e sono la causa di pigmentazione e caratteristiche organolettiche. Contribuiscono, inoltre, alla protezione contro la continua esposizione delle piante ai raggi solari, in particolare ai raggi UV. Sono presenti soprattutto nel tessuto delle foglie, nella corteccia, nei fiori e nei frutti. Come indica il nome, sono caratterizzati dalla presenza di gruppi fenolici associati in strutture più o meno complesse ad alto peso molecolare.

CAPITOLO 4

4. I Filtri solari

Storicamente, i filtri solari sono stati ideati per prevenire scottature nelle attività lavorative e per prolungare il tempo libero all'aperto, oltre a consentire un certo grado di abbronzatura. Le prime formule risalgono al 1928 e miravano a ridurre l'incidenza di UVB, il principale induttore di eritema e danni al DNA, sulla pelle. Fu solo negli anni '70 che iniziò la produzione su scala commerciale di creme solari topiche, che rese popolare il loro uso. Gli studi degli anni 80 hanno messo in luce l'importanza della radiazione UVA nel fotoinvecchiamento e il suo ruolo di coadiuvante nella carcinogenesi cutanea. Concettualmente, la protezione solare topica (o la protezione solare) rappresenta quell'insieme di prodotti che vengono applicati sulla pelle, composti da sostanze che interferiscono con le radiazioni solari, riducendo i loro effetti biologici sui tessuti. I filtri ultravioletti sono gli elementi presenti nelle formule del fotoprotettore che interferiscono direttamente con la radiazione solare incidente attraverso l'assorbimento, la riflessione o la dispersione di energia (*Sérgio Schalka et al,2014*). Inoltre sono disponibili in una grande varietà di tipi e formulazioni .

I prodotti per la protezione solare, regolamentati dalla direttiva 76/768/CEE del Consiglio, del 27 luglio 1976, vengono considerati prodotti cosmetici . Tale

norma fa parte del percorso di unificazione della regolamentazione europea sull'utilizzo commerciale dei filtri solari e riporta quelli ammessi, specificandone la concentrazione massima che può essere utilizzata in una formulazione. Questa normativa, è stata sostituita a partire dall'11 luglio 2013 dal Regolamento Europeo 1223/2009, con lo scopo di:

- armonizzare le disposizioni già esistenti in materia
- tenere conto dei progressi e dei cambiamenti avvenuti nel settore,
- rafforzare e chiarire le attuali norme sulla sicurezza dei cosmetici.

Contiene una serie di disposizioni per garantire la sicurezza del prodotto sotto vari punti di vista (dal metodo di fabbricazione al controllo degli ingredienti, dall'obbligo delle informazioni da dichiarare in etichetta alle valutazioni eseguite da un esperto).

Inoltre la commissione europea ha pubblicato, nel 2006, una “raccomandazione sull'efficacia dei prodotti per la protezione solare e sulle relative indicazioni” con l'obiettivo di fare chiarezza in questo campo e di semplificare le scelte dei consumatori, rendendo più uniformi e semplici le indicazioni presenti sull'etichetta dei prodotti solari. Ecco alcuni dei punti cardini previsti dalla Raccomandazione:

- fornisce definizione precisa di prodotto per la protezione solare, inteso come “qualsiasi preparato (quale crema, olio, gel, spray) destinato a essere posto

in contatto con la pelle umana, al fine esclusivo o principale di proteggerla dai raggi UV assorbendoli, disperdendoli o mediante rifrazione”. Inoltre, si forniscono definizioni di altri termini pertinenti, come raggi UVB, raggi UVA, fattore di protezione solare e fattore di protezione UVA. Fornisce una serie di indicazioni sulla protezione, le precauzioni d’impiego e le istruzioni per l’uso dei solari.

- specifica che i prodotti solari devono proteggere sia dai raggi UVB sia dai raggi UVA; la protezione UVA deve essere almeno pari ad 1/3 di quella UVB;
- stabilisce che non possono essere usate (in etichetta, sulla confezione o sul contenitore) diciture come “schermo totale” o “protezione totale”, che lasciano presupporre una protezione del 100% dai raggi UV, oppure “prevenzione per tutto il giorno”, che fanno pensare che non sia necessario riapplicare il prodotto. Infatti, si tratta di informazioni non veritiere;
- chiarisce che sulla confezione dovrebbero essere riportati consigli sulle precauzioni da adottare in aggiunta all’uso di prodotti solari (come non rimanere esposti al sole troppo a lungo) e istruzioni d’uso (come applicare il prodotto prima dell’esposizione e riapplicarlo con frequenza).
- fornisce indicazioni sull’efficacia, affermando che dovrebbero essere semplici e chiare.

Dal punto di vista strutturale, i filtri ultravioletti possono essere composti organici o inorganici. Gli attivi organici (o filtri chimici) assorbono i fotoni delle radiazioni UV (UVR), promuovendo un'alterazione della loro struttura molecolare. Gli attivi inorganici (o filtri fisici) hanno un'origine minerale e principalmente riflettono i raggi UV, ma in parte possono anche assorbirla. (*Sérgio Schalka et al, 2014*)

4.1 Filtri chimici

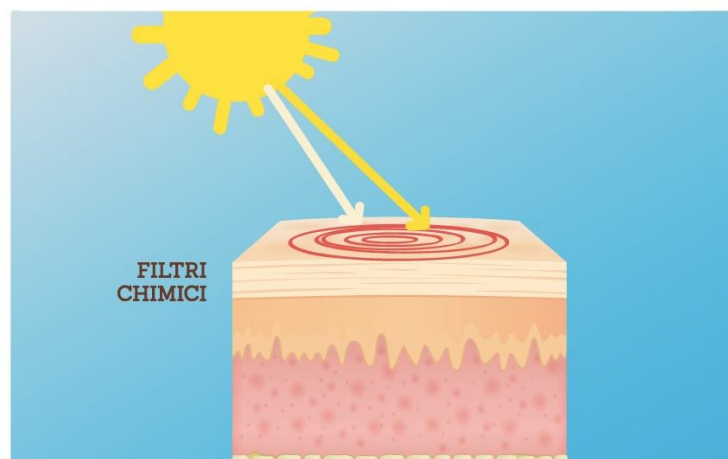


Figura 5.1. Filtri chimici; *Fonte: <https://blog.lasaponaria.it>*

Gli attivi organici (o filtri chimici) sono composti aromatici coniugati, che operano attraverso un meccanismo molecolare di assorbimento della radiazione UV la cui energia viene restituita all'ambiente mediante emissione di lunghezze d'onda più lunghe e meno energiche, come luce visibile e radiazione infrarossa. Assorbono in modo selettivo le radiazioni UVA e UVB, agendo su lunghezze d'onda diverse. Alcuni assorbono solo i raggi UVA altri solo gli

UVB, altri ancora sia gli UVA che gli UVB. I filtri UVA assorbono le radiazioni nella regione 320-380 nm dello spettro UV (benzofenoni, avobenzone). I filtri UVB assorbono nella regione 290-320 nm dello spettro UV e sono i Paraaminobenzoati, cinnamati, salicilati e derivati dalle canfore. Generalmente, nella loro struttura presentano un anello aromatico, in grado di assorbire le radiazioni e di convertirle in una forma di energia meno dannosa quali calore, radiazioni a lunghezza d'onda maggiori, energia vibrazionale e rotazionale. (Shaaf NA, 2005) L'energia assorbita dal filtro viene usata dagli elettroni negli orbitali più esterni per compiere transizioni elettroniche. La molecola quindi, passa da uno stato energetico fondamentale ad uno eccitato dove permane per breve tempo e successivamente ritorna allo stato fondamentale emettendo una quantità di energia pari a quella assorbita. Il prodotto solare ideale oltre ad essere ad ampio spettro deve avere filtri fotostabili, ovvero resistenti all'azione del sole. Se i filtri non sono fotostabili, possono andare incontro a fotodegradazione, un fenomeno che porta a modifiche della struttura chimica del filtro stesso riducendo il potere protettivo e producendo prodotti di fotodegradazione potenzialmente tossici. La radiazione assorbita può anche causare processi di isomerizzazione cis-trans o keto-enolica che pur alterando la struttura originaria, non ne riduce la capacità di assorbimento delle radiazioni UV in maniera significativa. (M.M. Rieger et al 1997). Il limite

principale dei filtri chimici è rappresentato dal fatto che possono dare irritazioni, fototossicità, sensibilizzazioni, e possono dare il via a reazioni fotochimiche, soprattutto se non sono fotostabili. Ad esempio, il filtro PABA (acido para-aminobenzoico) che è stato uno dei filtri più utilizzati nel recente passato, dal 2009 è stato vietato perché accertato cancerogeno e fortemente sensibilizzante. Tra i filtri molto utilizzati troviamo anche il Benzophenone, che è stato accertato essere un distruttore endocrino, oppure l'Octinoxate, un ingrediente persino trovato nel latte materno, con potenziali ricadute sulla salute umana e sull'ambiente. Inoltre, i filtri chimici sono potenzialmente inquinanti per pesci, molluschi, alghe e coralli poiché possono generare delle modificazioni genetiche alterando comportamenti neurologici e riproduttivi di diverse specie. (*Link 5*)

4.2 I Filtri fisici

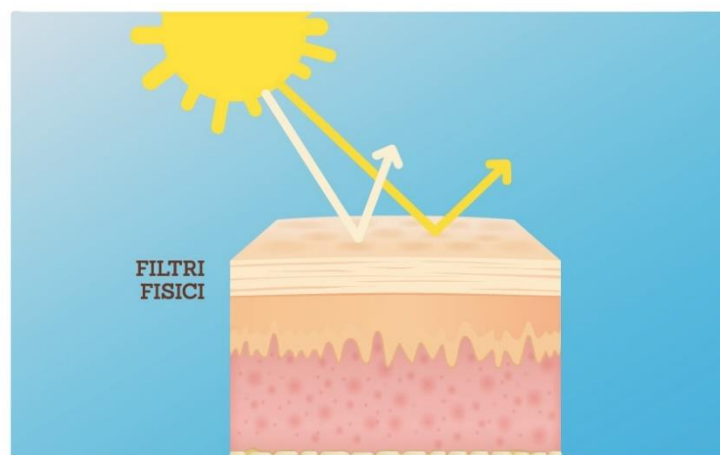


Figura 4.2. Filtri fisici; *Fonte: <https://blog.lasaponaria.it>*

I filtri fisici hanno un'origine minerale e promuovono il riflesso dei raggi UV sulla parte esterna del tessuto. Questo tipo di filtro permette di ottenere un'adeguata protezione senza dover utilizzare quantità elevate di filtro organico. I più utilizzati sono il biossido di titanio (TiO_2) e l'ossido di zinco (ZnO). Il biossido di titanio è più efficace per la protezione UVB, mentre l'ossido di zinco risulta essere più efficace nello schermare le radiazioni sia UVA che UVB. I filtri fisici possono agire con meccanismi d'azione diversi. Quando una radiazione interagisce con un prodotto applicato sulla cute, una piccola frazione viene riflessa dalla superficie del film, la restante parte penetra in esso per rifrazione. Di questa frazione, parte viene assorbita dalla particella solida, parte diffusa e parte trasmessa. Per quanto riguarda il processo di assorbimento tutte le radiazioni di lunghezza d'onda (λ) a 400 nm e 385 nm oltre ad essere diffuse vengono assorbite da TiO_2 e ZnO . Le lunghezze d'onda superiori vanno incontro soltanto al fenomeno di diffusione. Risulta evidente che l'efficacia degli schermi fisici dipende dalle dimensioni delle particelle e dalla loro dispersione stabile ed omogenea nel prodotto finito. (*M.M. Rieger, 1997*) Più piccola è la particella, migliore è la copertura cutanea e, di conseguenza, la riflessione; ma la rifrazione è peggio. Pertanto, la riflessione e la rifrazione sono inversamente correlate. Quando micronizzati, questi filtri diminuiscono l'aspetto biancastro della pelle e favoriscono la stabilità

dell'emulsione. Sono spesso rivestiti con silicone, silice, ossido di alluminio, acido estearico, estearato di alluminio, tra gli altri, migliorando la dispersione del filtro, evitando l'agglomerazione di particelle e alterando la reologia dell'emulsione. Il biossido di titanio, ad esempio, può essere associato all'avobenzone solo se ricoperto di silice e dimeticone. D'altra parte, solo alcuni filtri inorganici con particelle di dimensioni superiori a 200 nm sono in grado di riflettere nella gamma di luce visibile, offrendo quindi protezione. Nel caso si verificano fenomeni di aggregazione, le particelle che si uniscono a formare l'agglomerato si comportano come singole particelle di dimensioni maggiori, agendo da pigmento bianco e non da schermo UV. (*Lautenschlager S et al., 2007*) Riassumendo, possiamo dire che i filtri solari chimici assorbono i raggi UV ad alta energia mentre i filtri fisici riflettono o diffondono la luce. Il particolato inorganico può disperdere le microparticelle negli strati superiori della pelle, aumentando così il percorso ottico dei fotoni, portando all'assorbimento di più fotoni e migliorando il fattore di protezione solare (SPF), con conseguente alta efficienza del composto (*MS Latha et al. 2013*). I filtri chimici rispetto ai filtri inorganici, presentano un maggiore potenziale di sensibilizzazione, un maggiore rischio di assorbimento percutaneo e una minore fotostabilità, fortemente dipendenti dalla sua struttura chimica e dalla combinazione di attivi nella formula. I filtri UV fotoinstabili possono

danneggiare la pelle umana con due meccanismi che, alla fine, sono strettamente correlati e molto probabilmente si potenziano l'un l'altro. In primo luogo, i filtri UV possono comportarsi come sensibilizzatori dei raggi UV. Durante la fotolisi dei filtri UV fotoinstabili, si possono produrre degli intermedi reattivi e prodotti di foto-degradazione le quali non sempre si conosce la loro potenziale tossicità per la pelle ROS . In secondo luogo, una diminuzione dose-dipendente della capacità di assorbimento dei raggi UVA/UVB provoca un aumento del danno cutaneo indotto dal esposizione solare. Nelle formulazioni più recenti viene sempre più impiegata l'associazione tra filtri chimici e fisici, che garantisce uno spettro di fotoprotezione più ampio, permettendo di ridurre i rischi derivati dall'uso di alte concentrazioni di filtri chimici. Attualmente, sta emergendo una nuova classe di prodotti di protezione solare contenenti sostanze quali il metilene-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenolo, che agiscono sia come micropigmenti (quindi come schermo fisico), sia come assorbenti organici di UV (quindi come filtro chimico) e dotati di estrema fotostabilità. Infine, va sottolineato anche il ruolo di altri importanti fattori che influenzano la protezione solare, indipendentemente dal prodotto di protezione utilizzato, come le condizioni ambientali (latitudine, altezza sul livello del mare), la durata della fotoesposizione, le caratteristiche individuali della cute (fenotipo).

In virtù di ciò, le caratteristiche più importanti che le sostanze impiegate in un prodotto solare devono possedere sono:

- Caratteristiche chimico-fisiche:
 - buon assorbimento nell'UVB e UVA
 - stabilità chimica
 - essere incolori e inodori
 - fotostabilità (non devono degradarsi con la fotoesposizione, altrimenti l'efficacia protettiva diminuisce)
- Caratteristiche tossicologiche:
 - non irritanti
 - non mutagene
 - non sensibilizzanti
- Caratteristiche tecnologiche:
 - compatibili con le materie prime
 - buona solubilità
 - buona stabilità
 - facile spalmabilità e applicazione (*Cook et.al.2001*)

5.3. Sun Protection Factor (SPF)

La protezione UVB è misurata dall'SPF (Fattore di Protezione solare) di un prodotto, il che indica teoricamente che i prodotti con SPF elevati forniscono

una maggiore protezione contro gli effetti pericolosi della luce solare rispetto a quelli con SPF bassi. L'SPF viene misurato come il rapporto tra la quantità di radiazione UV richiesta per scottare la pelle protetta (con protezione solare) e quella necessaria per scottare la stessa pelle non protetta (senza protezione solare), essendo tutti gli altri fattori costanti. L'SPF viene misurato utilizzando la seguente formula:

$$SPF = MED \text{ della pelle protetta} / MED \text{ della pelle non protetta} \text{ (MED = dose eritemica minima)}$$

La MED è la quantità di energia efficace, espresso in Joules/cm², richiesto per la produzione della prima evidente reazione eritematosa con confini ben demarcati, identificati da un professionista formato e qualificato. Ciò significa che quando viene applicato un prodotto con SPF 50, questo proteggerà la pelle per un tempo equivalente a 50 volte tanto il tempo in cui la pelle viene scottata in assenza di protezione. (R. Azurdia et al., 2000) .Essendo un rapporto che valuta una risposta biologica, presenta di conseguenza una variabilità intrinseca. Proprio per questo motivo, in questo tipo di valutazione viene definito a priori un margine di accettabilità di errore. L'SPF determinato con un simulatore solare non è un valore assoluto, ma tiene conto di una variabilità, legata all'accettazione di determinati e definiti criteri statistici. Va comunque ricordato che l'SPF, dà un informazione sull'efficacia molto utile per il

consumatore. Tuttavia, a causa delle differenze tra i metodi sperimentali usati per il calcolo della MED e della non riproducibilità delle prove, l'industria internazionale ha dovuto ricercare un'unica metodologia che potesse essere utilizzata da tutti e che resolvesse le differenze tra i vari metodi esistenti. Basandosi su queste metodologie, il gruppo di lavoro COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association), costituito nel 1990 da esperti, ha messo appunto un metodo di riferimento standard per la valutazione dell'SPF. Da allora questo metodo si è rivelato attendibile e ha sostituito tutte le altre metodologie esistenti, soprattutto in Europa. Il grado di protezione, quindi, viene valutato in base al valore SPF, accompagnato anche da categorie descrittive quali protezione "bassa", "media", "elevata", insieme ai tradizionali indicatori di protezione solare, come indicato nell'immagine sotto riportata. (Sheu MT, 2003)



Figura 5.3 Classificazione della protezione solare in base all'SPF; *Fonte* <https://www.osservatoriovegank.com>

Nell'uso pratico però la protezione ricevuta può essere diversa da quella promessa dall'etichetta. Questo perché difficilmente viene applicata sulla cute la stessa quantità di prodotto usata in laboratorio (2 mg/ cm^2): infatti un soggetto adulto per rispettare il numero di SPF riportato sulla confezione, dovrebbe applicarne 40 grammi per volta per proteggere tutte le zone esposte del proprio corpo. Inoltre, spesso ci si dimentica di riapplicare il prodotto antisolare dopo la prima applicazione o lo si fa non rispettando i tempi consigliati (solitamente ogni 2 ore o dopo il bagno o intensa sudorazione).

Tra gli altri fattori che possono influenzare l'efficacia degli schermi solari nella pratica quotidiana, ricordiamo il tempo che intercorre tra l'applicazione e l'esposizione (dovrebbe essere di almeno 30 minuti), l'effetto della luce solare esterna che nei tests di confronto con il simulatore solare di laboratorio tende a dare valori di SPF minori, la composizione della formulazione, la persistenza (capacità dello schermo di conservare la propria efficacia nelle condizioni d'uso normali) e la sostantività (capacità di tenuta dello schermo solare nel mantenersi negli strati superficiali dell'epidermide a distanza di tempo dall'applicazione) del prodotto, importanti soprattutto a garantire l'efficacia del prodotto anche dopo sudorazioni abbondanti e bagni in acqua. Riguardo a quest'ultima ricordiamo che l'acqua di mare rimuove meno filtro rispetto a quella di lago, di fiume o di piscina e che una maggiore temperatura

dell'acqua riduce la durata della protezione.*(Link 1)* Esistono metodi per valutare la protezione delle creme contro gli UVA, come ad esempio il calcolo della FPA-PPD (Persistent Pigment Darkening). Questo metodo si basa sulla risposta della pigmentazione persistente alla radiazione UVA . Questo è un metodo in vivo che valuta la risposta della pelle con pigmentazione dopo l'esposizione (da 2 a 4 ore) alle radiazioni UVA. Un altro metodo in vivo comporta il calcolo, IPD (Immediate Pigment Darkening), che è la pigmentazione transitoria della pelle dopo l'esposizione alle radiazioni UVA. Allo stesso modo è possibile valutare la foto-stabilità di film di creme solari *(Routaboul C, 1999;)*

CAPITOLO 5

5.MATERIALI E METODI

5.1 Descrizione del modello cellulare utilizzato

L'utilizzo delle colture cellulari è uno strumento insostituibile in quanto ha permesso di usufruire di un "sistema modello" semplificato e riproducibile in numerosi campi della ricerca scientifica come: lo studio della biochimica, della fisiologia cellulare, gli studi oncologici, nella diagnosi di malattie genetiche, nella creazione di organismi transgenici ecc. Le cellule che costituiscono le colture cellulari si ottengono in seguito a espanto di organi, biopsie di tessuti animali che vengono chirurgicamente rimossi e frammentati meccanicamente o per via enzimatica fino a ottenere una sospensione cellulare che viene trasferita in appositi contenitori sterili di vetro o di plastica. Le colture cellulari vengono mantenute in un terreno liquido all'interno di contenitori sterili (fiasche, bottiglie o capsule Petri) in particolari condizioni sperimentali che riproducono il più possibile le condizioni chimico-fisiche dell'ambiente cellulare naturale. Per ricreare *in vitro* l'ambiente più simile a quello presente in natura, le cellule sono immerse in un adeguato terreno di coltura, cioè una soluzione isotonica che contiene le sostanze nutritive, i sali minerali, gli aminoacidi, i fattori di crescita necessari per la loro crescita e sono inoltre mantenute alla temperatura idonea costante all'interno di opportuni sistemi di

incubazione. Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate le cellule HDF (Human Dermal Fibroblast) neonatali. Le HDF crescono in un monostrato adeso al substrato del contenitore in cui sono state seminate, sono caratterizzate dall'inibizione da contatto e assumono la tipica forma fusiforme (Figura 5.1).

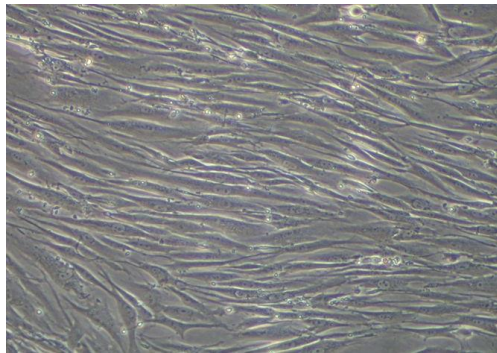


Figura 5.1. Fibroblasti visualizzati al microscopio a contrasto di fase (40X); *Fonte* <https://www.medicinapertutti.it>

Nell'allestimento della coltura cellulare è fondamentale mantenere la massima sterilità, utilizzando non solo supporti sterili, ma anche prendendo tutti i possibili accorgimenti utili ad evitare qualsiasi tipo di contaminazione, poiché materiali come i mezzi di coltura rappresentano l'habitat ideale per lo sviluppo e la crescita di batteri, lieviti e funghi. Le HDF utilizzate nel presente progetto sono state coltivate nel MEM (Minimum Essential Medium), al quale sono stati addizionati una percentuale pari al 10% di siero fetale bovino (FBS) [ricco di fattori di crescita e ormoni, fattori di adesione (fibronectina), sali minerali utili come cofattori di enzimi, lipidi, proteine (transferrina, albumina)

fondamentali per favorire l'adesione, lo sviluppo e la proliferazione cellulare], l'1% di penicillina/streptomicina (10000 U Penicillina/mL e 10 mg Streptomicina/mL) e glutammina (200 mM) . Il terreno completo, una volta preparato è stato mantenuto a +4° C in camera fredda e prima di ogni utilizzo è stato scaldato in un bagnetto termostato fino al raggiungimento di 37°C, temperatura necessaria per evitare qualsiasi tipo di shock termico.

Oltre all'ideale terreno di coltura, per l'allestimento delle colture cellulari sono stati utilizzati i seguenti reattivi:

-Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X senza calcio e magnesio(PBS) ossia un tampone fosfato salino impiegato ad una concentrazione 1X utilizzato principalmente per effettuare i lavaggi della coltura cellulare;

-Tripsina/EDTA (etilendiamminotetracetico) 1x al 0.05%/0.02% in PBS; la tripsina è un enzima, appartenente alla classe delle idrolasi che digerisce le proteine della matrice extracellulare. Ha un'azione ottimale a 37°C, ma agisce anche a temperatura ambiente. L'EDTA spesso associata alla tripsina, serve per incrementare la sua funzionalità, infatti essendo un chelante per gli ioni calcio e magnesio (fondamentali per le proteine d'adesione) favorisce il distacco delle cellule e il loro cambiamento morfologico da affusolate a rotondeggianti;

-Fiasche per colture cellulari; supporti fabbricati in polistirene, completamente trasparente per permettere di osservare le cellule al microscopio. Il loro interno viene reso sterile grazie al trattamento con i raggi gamma; sono generalmente dotate di un tappo ventilato, ovvero contenente un filtro che permette gli scambi gassosi e contemporaneamente consente il mantenimento della sterilità. Vengono inoltre trattate per favorire l'adesione cellulare, rendendole idrofile e cariche negativamente. Il tipo di fiasche prevalentemente utilizzate sono state le F25 e le F75, la cui connotazione numerica riflette l'area di crescita disponibile alle cellule (25 cm^2 e 75 cm^2).

-Piastrine multiwell da 6, 24 o 96 che come le fiasche sono usate per la crescita di colture in adesione la cui semina varia in base al tipo di piastra. Nel presente lavoro sono state utilizzate tutte e tre le tipologie di piastrine con una densità di semina rispettivamente di, 100.000, 70.000 e 30.000 per well.

-Pipette monouso sterili da 25, 10.5 o 2 mL che permettono le manovre di rimozione e aggiunta di mezzo di coltura, tripsina, o PBS ecc.

-Camera di conta (camera di Burker); è un dispositivo impiegato per la conta cellulare al microscopio;

-Incubatore (Thermo Scientific): permette il mantenimento delle condizioni ambientali ottimali per le colture, mantenendo stabili alcuni parametri quali la temperatura a 37°C , l'umidità e la tensione dei gas ($5\% \text{ CO}_2$) all'interno. I

fibroblasti, utilizzati nel presente lavoro di tesi, derivano dallo scongelamento di aliquote cellulari conservate in criovials, contenenti mezzo di coltura addizionato di dimetilsolfossido (DMSO) (10%), necessario per la crioprotezione, e stoccate in azoto liquido (-196°) fino al momento dello scongelamento. Quando la coltura cellulare raggiunge all'interno dei supporti sterili il 70/80 % di confluenza, le cellule vengono staccate e successivamente seminate su piastre multiwell per l'allestimento dei vari esperimenti, e su fiasche F25 o F75 per l'espansione cellulare al fine di avere la cosiddetta coltura di mantenimento. Gli esperimenti sono stati condotti tra il 10° e il 19° passaggio. Il protocollo seguito per l'espansione delle subcolture è stato il seguente:

-Rimozione del mezzo di coltura;

-Lavaggio con PBS sterile;

-Aggiunta di tripsina (3 mL in F75 o 1 mL in F25, al fine di coprire tutta la superficie del supporto);

-Incubazione per circa 5-10 minuti a 37°C, monitorando il distacco al microscopio (al momento del distacco i fibroblasti assumono una forma rotondeggiante);

- Neutralizzazione della tripsina con il mezzo di coltura (il mezzo aggiunto è il triplo del quantitativo di tripsina usata);
- Risospensione omogenea della coltura, per evitare la formazione di cluster e la sedimentazione delle cellule sul fondo;
- Conta delle cellule nella camera di Burker;
- Semina del numero di cellule opportuno nelle nuove fiasche e/o piastre multiwell;

5.2 Descrizione dei filtri solari utilizzati: SPF e quantità

Nel presente lavoro di tesi sono state messe a confronto due tipologie di creme solari rispetto al tipo di filtri UV presenti nella formulazione (chimici o fisici) e al valore del fattore di protezione solare (10,30 o50). Sono creme presenti in commercio ed appartenenti alla stessa casa produttrice e tra un utilizzo e l'altro sono state conservate al buio a temperatura ambiente. L'apposita quantità di creme sono state spalmate con un dito coperto con un guanto di lattice su vetrini circolari di quarzo, perfettamente combacianti con i pozzetti delle piastre multiwell da 6 impiegate per le colture cellulari. Secondo il metodo *in vitro* per la determinazione dell'SPF, dettato dalla FDA, la quantità di crema da testare è in relazione all'area della superficie su cui va spalmata: 2 mg/cm².

Una volta prelevato il quantitativo di crema con una pipetta e puntali appositi, precedentemente calcolato e pesato, la crema è stata spalmata delicatamente e in modo uniforme su tutta la superficie del vetrino utilizzando l'indice ricoperto da un guanto in lattice. I vetrini così preparati sono stati disposti al buio prima dell'irraggiamento. È stata testata inoltre anche l'efficienza delle due creme con lo stesso SPF pari a 50, distribuendo tre quantitativi diversi sui vetrini, ovvero: 2 mg/cm²-1 mg/cm² e 0.5 mg/cm². A tal proposito è stato calcolato il quantitativo di crema da applicare su ogni vetrino (vedi tabella) per poi eseguire la stessa procedura precedentemente descritta per valutare l'efficienza delle due creme ma con un diverso SPF.

Range del quantitativo di crema spalmato sulla superficie del vetrino (area vetrino 10.74 cm ²) (mg)	Quantitativo di crema prelevato dal flacone (μL)
19 - 23.5	28
8.75 - 12.75	16
3.37 - 7.37	9

Tabella 2. La tabella mostra nella prima colonna i quantitativi unitari di crema (mg/cm²) oggetto di confronto nel presente studio, la seconda e la terza colonna, rispettivamente il quantitativo totale di crema necessario per ricoprire la superficie del vetrino di quarzo avente un'area di 10.74 cm² e il quantitativo di crema fluida (μL) effettivamente prelevato dal flacone.

5.3 Descrizione del sistema di irraggiamento con i raggi UVA

L'irraggiamento delle colture cellulari è stato effettuato con una lampada abbronzante solare commerciale Philips Original Home Solarium (modello

406/A; Philips, Groningen, Olanda, dotata di bulbo Philips HPA, Uv tipo 3 ; erogante un flusso di 50 mW/cm^2 tra 300 e 400 nm (Figura 5.3). La lampada è stata poggiata su un supporto al fine di sorreggerla e mantenerla a una distanza di 20 cm dal campione da irraggiare.



Figura 5.3 Lampada abbronzante solare commerciale Philips Original Home Solarium;
Fonte: <https://www.kijiji.it/>

Le cellule da trattare sono state lavate e coperte con uno strato sottile di PBS (1 mL) e successivamente irraggiate con i raggi UVA secondo lo schema riportato nella figura 5.4. . Il coperchio di plastica della multiwell è stato rimosso e sostituito dai vetrini circolari di quarzo (preparati poco prima, come descritto sopra). La piastra è stata collocata su un blocco di ottone incassato nel ghiaccio al fine di ridurre l'evaporazione, a una distanza di 20 cm dalla sorgente luminosa proveniente dall'alto. Per poter valutare la produzione di ROS e il danno al DNA, le cellule sono state irradiate per 15 min (45 J/cm^2). Come riferimento, 45 J/cm^2 è approssimativamente equivalente a circa 120 minuti di

sole nella riviera francese (Nizza) in estate a mezzogiorno. Una volta concluso l'irraggiamento, è stato rimosso il PBS e sostituito con del mezzo di coltura fresco. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati 24 h dopo l'irraggiamento dei fibroblasti.

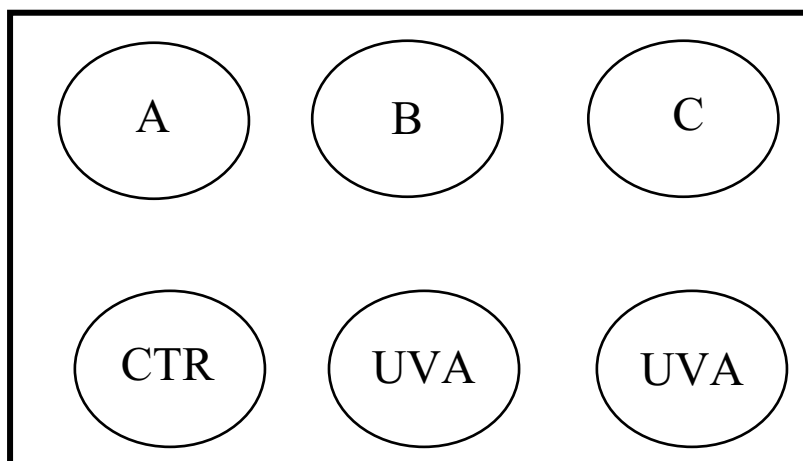


Figura 5.4. Rappresentazione dello schema di irraggiamento con i raggi UVA dei fibroblasti di derma umano in coltura all'interno di piastre multiwell da 6 pozzetti. CTR rappresenta il controllo negativo (non irraggiato); UVA rappresenta i controlli positivi (irraggiati ma senza filtro) e A, B e C rappresentano i campioni irraggiati in presenza del filtro chimico/fisico, con un diverso fattore di protezione solare (10, 30 o 50 SPF) o con un diverso quantitativo (0.5, 1 o 2 mg/cm²).

5.2 Analisi dei livelli intracellulari dei ROS

L'analisi dei livelli intracellulari di ROS è stata effettuata mediante l'utilizzo della diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) (Invitrogen). La DCFH-DA è una molecola non polare, che diffonde facilmente all'interno delle cellule e viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetati rendendola polare e quindi impermeabile. Il nuovo composto polare DCFH viene ossidato a livello intracellulare dai ROS prodotti dando origine alla

formazione di 2,7- diclorofluoresceina (DCF), una molecola altamente fluorescente che emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm (figura 5.3)

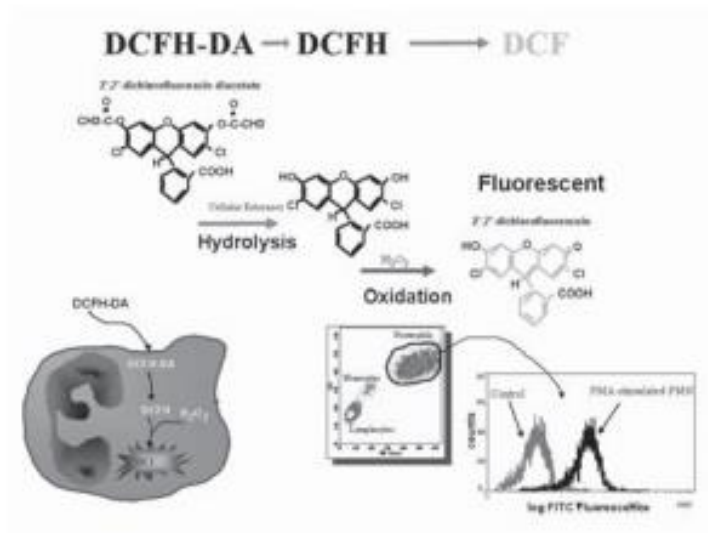


Figura 5.3. schema relativo all'emissione di fluorescenza da parte di 2,7 diclorofluoresceina di acetato (DCFH-DA) in seguito ad ossidazione ad opera di specie reattive dell'ossigeno.
Fonte:www.google.it

Le cellule vengono marcate con DCFH-DA ad una concentrazione finale di 1 μ M e incubate a 37°C al buio per 30 min; successivamente l'eccesso di sonda viene eliminato con un lavaggio di PBS e le cellule vengono staccate dai supporti utilizzando tripsina e, monitorando al microscopio il distacco cellulare. A distacco avvenuto, la tripsina è stata neutralizzata con il mezzo di coltura e le cellule sono state trasferite in eppendorf opportunamente etichettate mantenendo il tutto in ghiaccio. A questi passaggi hanno fatto seguito, la centrifugazione delle eppendorf a 600g per 5 minuti a 4°C, l'eliminazione del surnatante e la risospensione in 200 μ L di PBS. Di questi, 50 μ L sono stati

trasferiti in eppendorf precedentemente preparate contenenti 200 μ L di sonda Via Count millipore diluita 1:5 con PBS. Terminati i 5 minuti di incubazione in ghiaccio al buio, è stata effettuata la lettura al citofluorimetro (Millipore-Guava-easyCyte). La citometria a flusso è una tecnologia laser utilizzata per la conta cellulare, per la selezione cellulare, il rilevamento biomaker e l'ingegneria delle proteine, sospendendo cellule in un flusso di fluido ed esponendole ad un apparato di rilevamento elettronico costituito da uno o più laser e diversi detector in grado di rilevare, e amplificare, il segnale luminoso e la fluorescenza prodotta da fluorocromi incorporati nelle cellule o associati ad anticorpi per la discriminazione di specifici epitopi presenti nel campione. Ad ogni singola cellula viene associato un segnale elettrico, relativo all'intensità luminosa emessa. il sistema pertanto si configura come un analizzatore a livello di singola cellula fornendo dati relativi alla morfologia e al segnale associato a specifici fluorocromi. In particolare, il citofluorimetro, utilizzando i principi della dispersione della luce, dell'eccitazione e dell'emissione di molecole di fluorocromi, può effettuare un'analisi multi-parametro di proprietà fisiche e chimiche che di singole cellule o particelle in sospensione. Il citofluorimetro è in grado di eccitare con una lunghezza d'onda di 488 nm il campione. I livelli di ROS intracellulari sono stati valutati sfruttando l'emissione della DCF, ossidata e eccitata a 525 nm, nella regione del verde. Il valore di fluorescenza

emesso rappresenta la forma ossidata della DCF ed è quindi proporzionale alla formazione di ROS. Parallelamente all'analisi dei ROS, è stata valutata anche la vitalità cellulare mediante l'utilizzo della sonda ViaCount millipore. La vitalità è stata valutata sfruttando l'emissione del colorante nella regione del rosso (695nm) e nella regione del giallo (583nm). Le due sonde, quando sono legate al DNA emettono luce a queste due lunghezze d'onda. Tutti gli eventi fluorescenti, relativi a cellule consentono l'esclusione dei debris e l'analisi morfologica. Inoltre le diverse caratteristiche di permeabilità delle sonde consente di discriminare le cellule: , morte, apoptotiche.

5.3 Analisi del danno ossidativo al DNA (Comet)

L'elettroforesi su singola cellula (SCGE) o Comet assay è un test di mutagenesi che permette di identificare i danni al DNA di singole cellule. Questo test viene utilizzato per saggiare la capacità mutagena di sostanze chimiche o agenti fisici. Le cellule vengono poste su un vetrino portaoggetti preagarizzato con normal gel agarose (1%) e trattate con detergenti per lisare le membrane cellulari in modo che sul vetrino rimangano solo i nuclei che vengono sottoposti ad elettroforesi in una soluzione di corsa elettroforetica a pH alcalino ($\text{pH} \geq 13$). La corsa elettroforetica a questo pH permette di evidenziare danni al singolo e doppio filamento (SSBs e DSBs) e siti labili agli alcali (*Marabini L et al, 2011*).

Durante la corsa elettroforetica infatti, i filamenti integri (di grosse dimensioni) migrano scarsamente, mentre i frammenti derivati dai filamenti danneggiati migrano verso l'anodo in base al peso molecolare: più basso è quest'ultimo, maggiore sarà la distanza percorsa dal frammento durante la corsa. I frammenti migrano producendo una conformazione a "cometa" che risulta essere tanto più lunga quanto più è ingente il danno al DNA. Il DNA viene infine messo in evidenza da una sostanza fluorescente (SyBR Gold) che si intercala nel danno permettendo così la visualizzazione al microscopio a fluorescenza.

Questo saggio è stato effettuato sia sulle HDF irradiate a tempi diversi (5 min-10 min-15 min-18 min-20 min), in questo caso non è stata effettuata l'incubazione con FPG, sia su HDF coltivate in piastre multiwell da 6 e dopo 24 ore dalla fine dell'esposizione ai raggi UVA. Successivamente al trattamento e al distacco in tripsina, i campioni sono stati sottoposti a conta cellulare, centrifugati per eliminare il surnatante e risospesi in PBS, per poi essere divisi in 3 aliquote di sospensione cellulare al quale è stato aggiunto un egual volume di soluzione di congelamento precedentemente preparata e tenuta in ghiaccio. I campioni sono stati così congelati. Al momento dell'allestimento del saggio del comet assay e in base alla conta cellulare effettuata in fase di congelamento, le cellule di ciascun campione sono state scongelate aggiungendo al volume già presente, un egual volume di soluzione di

scongelo (preparata al momento dell'utilizzo). Subito dopo è stata prelevata, da ogni eppendorf la quantità necessaria per avere 1500 cellule per spot, trasferendo l'aliquota desiderata in 200 μ L di PBS per effettuare un lavaggio. Tutte le eppendorf così preparate sono state centrifugate per 5 minuti a 2000 rpm. Dopo aver aspirato il surnatante, le cellule sono state risospese in agarosio a basso punto di fusione (LMA) e stratificate sui vetrini (Trevigen) posti a raffreddare sul ghiaccio per 15 minuti al buio in modo da creare una trama (definita "sandwich") all'interno della quale si trovano le cellule. Al termine di questi 15 minuti, i vetrini sono stati immersi in una soluzione di lisi per 1 ora a 4°C. Questo passaggio è necessario per lisare le membrane e liberare l'acido nucleico. Al termine della lisi i vetrini sono stati incubati con formamido-pirimidin glicosilasi (Fpg). L'Fpg riconosce specificamente e sottopone a clivaggio le basi puriniche ossidate del DNA, in particolare 7,8-diidro-8-ossiguanina, 2,6-diamino-4-idrossi-5-formamidopirimidina, 4,6-diamino-5 formamido-pirimidina e piccole quantità di 7,8-diidro-8-ossiadenina, producendo siti apurinici. Questi a loro volta sono convertiti in rotture del filamento, grazie all'attività endonucleasica associata all'enzima. Il numero di frammenti prodotti dal trattamento enzimatico risulta direttamente proporzionale al danno ossidativo arrecato al DNA. Infine, i vetrini sono stati inseriti in una vasca elettroforetica posta a 4°C, riempita con il tampone

elettroforetico a pH 13. Prima della corsa elettroforetica i vetrini sono stati lasciati stabilizzare per 30 minuti nella vasca in modo che il DNA si possa srotolare (fase di unwinding). Dopo la fase di stabilizzazione è stata avviata l'elettroforesi per 20 minuti, a 18 Volts).

Terminata la corsa, i vetrini sono stati posti in un contenitore contenente la soluzione di neutralizzazione che si lascia agire per 5 minuti. Successivamente sono stati immersi in H₂O distillata ed infine i gel sono stati fissati mediante immersione in etanolo. I vetrini sono stati successivamente essiccati in stufa a 50°C e, una volta asciutti, sono stati colorati con 20 µL di SyBR Gold. La colorazione SYBR Gold è una colorazione cianina asimmetrica che ha un'alta resa quantica (~0,6) quando si lega al DNA a doppio o singolo filamento o all'RNA. I massimi di eccitazione per i complessi di acido nucleico sono a ~495nm e ~300nm e il massimo di emissione è ~537 nm.

A questo punto i vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza (Lion Heart). Per ogni vetrino sono state effettuate 12 fotografie in modo tale da ottenere le immagini delle cellule contenute nell'intero spot. In assenza di danno il nucleo appare rotondo e compatto; nel caso vi siano rotture, invece, i gruppi fosfato dei nucleotidi (che sono carichi negativamente) migrano verso l'anodo formando una struttura allungata e disomogenea, simile alla coda di una cometa. Maggiore è il danno, più grande è la cometa. Per concludere si

effettua l'analisi computerizzata, con la quale l'entità del danno al DNA, in termini di rotture, viene stimata mediante l'acquisizione di due parametri: % di DNA nella coda (misurabile come intensità di fluorescenza dopo colorazione detta Tail intensity, TI) e lunghezza della coda definita come Tail length (TL). A partire da questi è possibile calcolare il momento della coda della cometa definita come Tail moment (TM), definito come il prodotto dell'intensità di fluorescenza della coda per la sua lunghezza, riassumendo i due precedenti parametri. (Collins et al., 1996).

STATISTICA

Gli esperimenti sono stati condotti effettuando il triplicato sia tecnico che sperimentale e i dati ottenuti sono stati analizzati mediante i test statistici Student t-test e One Way Anova, utilizzando il Tukey test come fattore di correzione nel caso delle comparazioni multiple. I dati sulla vitalità cellulare e sui livelli intracellulari di ROS sono rappresentati come istogrammi che illustrano la media più o meno l'errore standard (SEM) della percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS. I dati del danno ossidativo al DNA sono illustrati invece come box plot che riassumono la distribuzione dei principali indici di danno al DNA calcolati dal comet assay. Nello specifico la distribuzione della popolazione in relazione al danno è caratterizzata dai valori massimo e minimo, il 25° e il 75° percentile e il valore della mediana di ciascun

indice. Le significatività delle variazioni tra i campioni sono state riportate come segue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

RISULTATI

VITALITA' CELLULARE, LIVELLI INTRACELLULARI DI ROS E DANNO OSSIDATIVO AL DNA IN HDF

L'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare è stata effettuata tramite l'impiego di un'apposita miscela di due fluorocromi (ViaCount), in grado di discriminare le cellule vive da quelle apoptotiche e morte, con l'obiettivo di identificare il tempo ottimale di irraggiamento, in corrispondenza del quale si verifica una significativa diminuzione della vitalità cellulare rispetto al controllo non irraggiato. L'analisi è stata eseguita utilizzando un modello *in vitro* di cellule neonatali di derma umano (HDF, *human dermal fibroblasts*), 24 ore dopo l'esposizione delle stesse ad una scala temporale di irraggiamento (5-15 minuti) con raggi UVA emessi da una lampada UVA (Philips Original Home Solarium). Come mostra la **figura 1**, a partire da 10 minuti di irraggiamento è possibile osservare una diminuzione significativa (-19.8 %; * $p < 0.05$) della percentuale di cellule vitali (barre verdi) e un aumento altrettanto significativo di quella delle cellule apoptotiche (barre gialle), (+525%; * $p < 0.05$), che aumenta in maniera dose dipendente fino a 15 minuti di irraggiamento accompagnato da una diminuzione del -30.2% (* $p < 0.05$) di quelle vitali rispetto al campione non irraggiato (0 minuti).

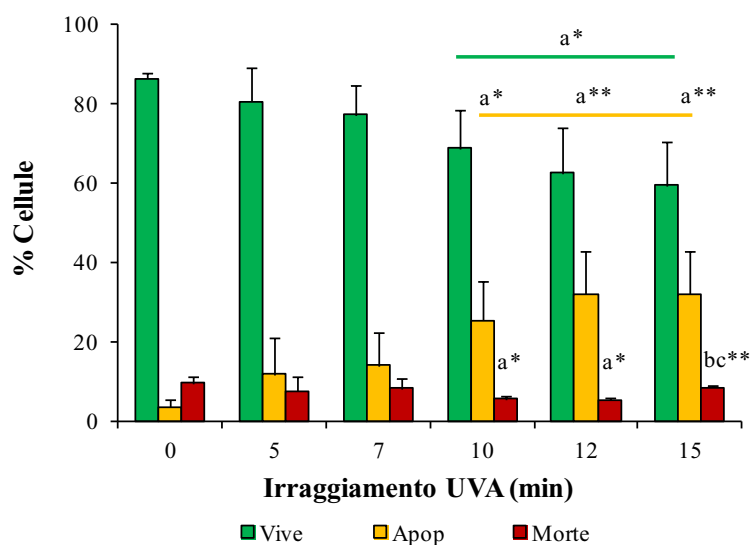


Figura 1. Vitalità cellulare espressa come percentuale (%) di cellule vive, apoptotiche e morte, analizzata in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 5, 7, 10, 12 e 15 minuti. I dati sono espressi come media±SEM. a=0 minuti; b=10 minuti; c=12 minuti; *p<0.05; **p<0.01.

Contemporaneamente all'analisi della vitalità cellulare e con le stesse condizioni sperimentali, sono stati analizzati al citofluorimetro anche i livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), utilizzando la sonda *leuco* (DCF₂), una forma ridotta di fluoresceina la cui intensità di fluorescenza risulta direttamente proporzionale alla quantità di radicali liberi presenti all'interno delle cellule vitali, a loro volta discriminate tramite il simultaneo impiego di ViaCount. Per mettere meglio in evidenza la produzione dei ROS in seguito all'insulto ossidativo, rappresentato dall'irraggiamento a diversi tempi con raggi UVA, la popolazione cellulare è stata suddivisa in cellule con un basso (barre verdi), medio (barre gialle) e alto (barre rosse) contenuto di ROS, regioni stabilite arbitrariamente definendo su una popolazione di controllo negativo non irraggiato la regione alto contenuto pari al 10% e basso

contenuto di ROS pari al 50% della popolazione totale. La **figura 2** mostra come al contrario della vitalità cellulare, l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS è risultato significativo già a partire da 5 minuti di irraggiamento (+61.5%; **p<0.05), diventando altamente significativo (+115.4%; ***p<0.001) a partire da 10 minuti di irraggiamento, raggiungendo un massimo di +223.1% a 15 minuti, rispetto al campione di controllo non irraggiato (0 minuti).

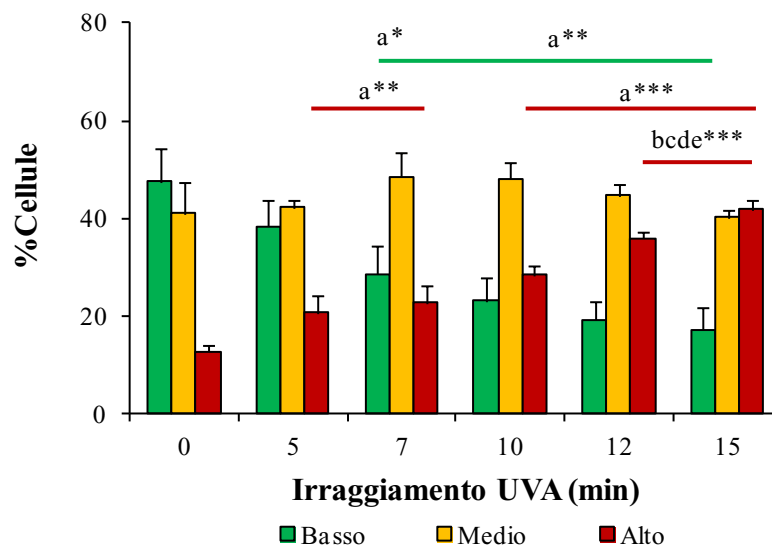


Figura 2. Livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio e alto contenuto di ROS, analizzati in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 5, 7, 10, 12 e 15 minuti. I dati sono espressi come media±SEM. a=0 minuti; b=5 minuti; c=7 minuti; d=10 minuti; e=12 minuti; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

E' stato altresì valutato, nelle medesime condizioni sperimentali, anche il danno ossidativo del DNA indotto dall'irraggiamento, mediante la metodica del Comet assay, al fine di individuare la dose (minuti di irraggiamento) di raggi UVA, necessaria per generare un aumento significativo del danno ossidativo a

carico del DNA. La **figura 3** mostra come in questo caso l'aumento del danno, espresso come percentuale di DNA contenuto nella coda della cometa (*tail intensity*), sia altamente significativo ($***p<0.001$) a partire da 18 minuti di esposizione ai raggi UVA, con un aumento del danno del 93.2% rispetto al campione di controllo non irraggiato. Questi dati si riferiscono al Comet assay alcalino condotto a pH 13 che è in grado di risolvere le rotture sul singolo, doppio filamento e siti alcali labili ma non le basi ossidate.

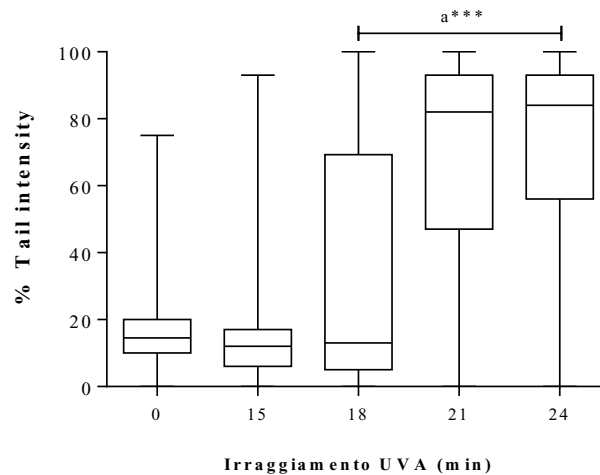


Figura 3. Livelli di danno ossidativo, espressi come percentuale (%) di tail intensity, analizzati in seguito a irraggiamento con lampada UV per 15, 18, 21 e 24 minuti. I dati sono espressi come distribuzione della popolazione sottoforma di Box Plot che individua i valori minimo, massimo, il 25%, il 75% percentile e la mediana. a=0 minuti; $***p<0.001$.

VITALITA' CELLULARE, LIVELLI INTRACELLULARI DI ROS E DANNO OSSIDATIVO AL DNA IN HDF, ANALIZZATI DOPO 24 ORE DALL'IRRAGGIAMENTO IN PRESENZA DI CREME SOLARI CONTENENTI FILTRI FISICI O CHIMICI CON SPF 10, 30 o 50

Nel presente lavoro di tesi è stata valutata l'efficacia, in termini di protezione dai danni indotti dall'esposizione ai raggi UVA, di due prodotti solari con un

differente meccanismo di protezione. In particolare, sono stati messi a confronto prodotti solari contenente filtri fisici o inorganici con quelli contenenti invece filtri chimici o organici. L'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare (**Figura 4**), eseguita 24 ore dopo l'esposizione ai raggi UVA dei fibroblasti di derma umano, schermati in assenza o in presenza di creme solari contenenti filtri fisici o filtri chimici con SPF di 10, 30 e 50, mostra come entrambi i prodotti solari, indipendentemente dal valore di SPF, siano in grado di preservare la vitalità cellulare (barre verdi), la quale non risulta significativamente diversa dal campione di controllo non irraggiato (Ctr) al contrario di quanto avviene per i campioni esposti a radiazione UVA per 15 minuti ma non protetti dalle creme solari.

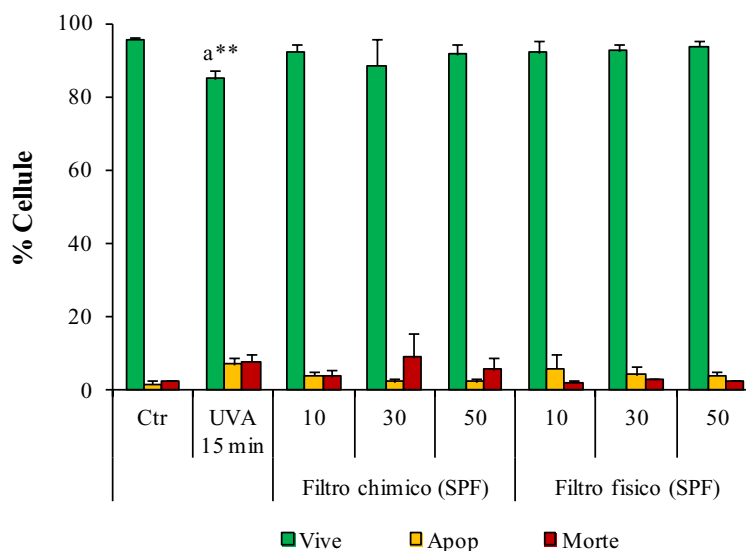


Figura 4. Vitalità cellulare espressa come percentuale (%) di cellule vive, apoptotiche e morte, analizzata in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 15 minuti, in presenza di due prodotti solari, contenenti filtri chimici o filtri fisici, ognuno con un fattore di protezione solare (SPF) di 10, 30 e 50. I dati sono espressi come media±SEM. a=Ctr; **p<0.01.

Parallelamente alla vitalità cellulare, è stata altresì valutata anche l'efficacia dei due prodotti solari nel prevenire l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS in seguito all'esposizione per 15 minuti ai raggi UVA, paragonando non solo il diverso meccanismo di protezione solare (chimico o fisico) ma anche il differente contenuto di filtri di ciascuno dei due prodotti solari sulla base del loro SPF. La **figura 5** mostra come 15 minuti di irraggiamento con una lampada UVA siano in grado di determinare un aumento altamente significativo (+188.7%; *** $p < 0.001$) della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS (barra rossa). Il grafico mostra anche come la presenza schermante delle creme solari con filtri fisici o chimici, indipendentemente dal valore SPF, nei tempi testati sia in grado di prevenire l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS (barre rosse), indotto dall'esposizione dei fibroblasti di derma umano ai raggi UVA, in maniera altamente significativa (** $p < 0.01$) rispetto al controllo positivo (UVA per 15 minuti).

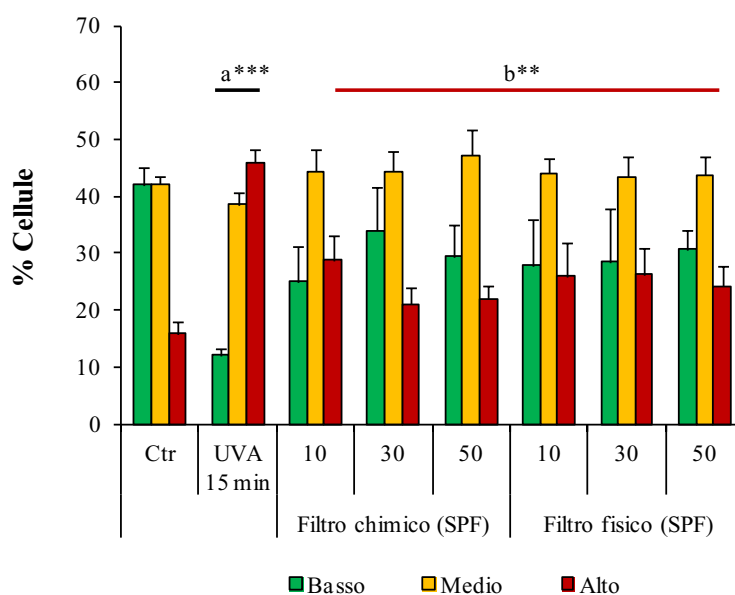
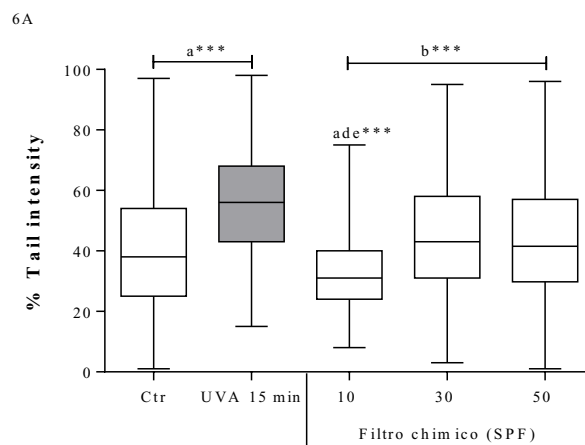


Figura 5. Livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio e alto contenuto di ROS, analizzati in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 15 minuti, in presenza di due prodotti solari, contenenti filtri chimici o filtri fisici, ognuna con un fattore di protezione solare (SPF) di 10, 30 e 50. I dati sono espressi come media \pm SEM. a=Ctr; b=UVA 15 minuti; ** p <0.01; *** p <0.001.

E' stata inoltre valutata la capacità dei diversi fattori di protezione solare (SPF), di entrambe le tipologie di creme solari, di proteggere le HDF dal danno ossidativo al DNA, indotto dall'esposizione delle stesse per 15 minuti ai raggi UVA, mediante la tecnica del Comet assay modificata mediante l'impiego dell'enzima FPG per la valutazione dei livelli di basi ossidate del DNA (**Figura 6**). I grafici di seguito riportati mostrano come l'aumento altamente significativo della percentuale di tail intensity (+35.9% (**6A**); +28.9% (**6B**); *** p <0.001) registrato nel controllo positivo (UVA 15 min), sia altrettanto significativamente (*** p <0:001) impedito da entrambi i prodotti solari e per

tutti e tre i fattori di protezione solare (SPF). In particolare, in entrambi i casi è stato osservato come il fattore di protezione solare 10 sia in grado di proteggere le cellule dal danno ossidativo al DNA in maniera altamente significativa rispetto anche ai fattori di protezione 30 e 50 per quanto riguarda la crema solare con filtri chimici (**6A**) e solo rispetto al fattore 30 della crema solare con filtri fisici (**6B**). Inoltre, in quest'ultimo caso, il fattore di protezione 50 sembra essere in grado di proteggere le HDF dal danno ossidativo indotto al DNA, in maniera altamente significativa rispetto non solo al campione di controllo positivo (UVA 15 min; -36.8%; *** $p < 0.001$) ma anche rispetto agli altri due fattori di protezione solare 10 e 30, rispettivamente con un -9.4% e -27.5% di tail intensity (** $p < 0.01$).



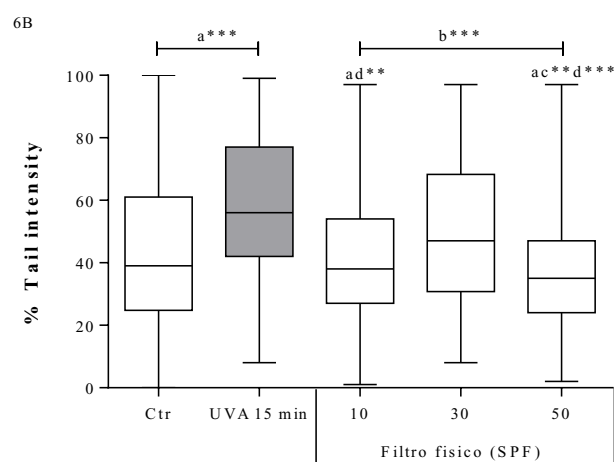


Figura 6. Livelli di danno ossidativo, espressi come percentuale (%) di tail intensity, analizzati in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 15 minuti, in presenza del prodotto solare contenente filtri chimici (6A) o filtri fisici (6B) entrambi con un fattore di protezione solare di 10, 30 o 50 SPF. I dati sono espressi come distribuzione della popolazione sottoforma di Box Plot che individua i valori minimo, massimo, il 25%, il 75% e la mediana. a=Ctr; b=UVA 15 minuti; c=10 SPF; d=30 SPF; e=50 SPF; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

VITALITA' CELLULARE, LIVELLI INTRACELLULARI DI ROS E DANNO OSSIDATIVO AL DNA, ANALIZZATI DOPO 24 ORE DALL'IRRAGGIAMENTO, IN PRESENZA DI CREME SOLARI CONTENENTI FILTRI FISICI O CHIMICI CON SPF 50, SPALMATE IN QUANTITA' DIVERSE.

Nel presente lavoro di tesi, le due tipologie di filtri solari, fisico e chimico, sono state messe a confronto, rispetto al solo fattore di protezione solare 50, anche in termini di quantità di prodotto presente sulla superficie unitaria della pelle (mg/cm^2). Secondo la Raccomandazione della Commissione Europea (2006/647/CE), il livello di protezione indicato dal fattore di protezione solare si riferisce ai prodotti quando sono applicati in quantitativi analoghi a quelli utilizzati in sede di prova, vale a dire $2 \text{ mg}/\text{cm}^2$ di pelle. Nella stessa raccomandazione si afferma però che tale quantitativo è superiore a quello solitamente applicato dai consumatori e che l'applicazione di un quantitativo

inferiore di prodotto riduce in misura rilevante la protezione. A tal proposito, sono stati messi a confronto tre quantitativi di crema spalmati su un vetrino in quarzo, pari a 0.5, 1 e 2 mg/cm², del solo fattore di protezione solare massimo utilizzato (50 SPF) e di entrambi i filtri testati.

L'analisi della vitalità cellulare (**figura 7**), eseguita 24 ore dopo l'esposizione per 15 minuti delle HDF ai raggi UVA, ha messo in evidenza come nel controllo positivo (UVA 15 min) sia stato registrato un aumento significativo della percentuale di cellule apoptotiche (barra gialla) (**p<0.01) e una riduzione significativa di quella delle cellule vitali (barra verde) (-13.8%; *p<0.05). I risultati riguardanti l'esposizione delle cellule ai raggi UVA schermati dai due prodotti solari, con lo stesso SPF (50) ma spalmati in tre quantità diverse (0.5, 1 e 2 mg/cm²), ha invece sottolineato come quello con filtri fisici sia stato in grado di contrastare in maniera significativa (*p<0.05) l'aumento della percentuale di cellule apoptotiche indotte dall'irraggiamento, per tutte e tre le dosi di crema spalmate, e che non risultano quindi significativamente diverse tra loro. Al contrario, nel caso della crema solare con filtri chimici, nonostante sia stato osservato un trend in diminuzione della percentuale di cellule apoptotiche (barre gialle) all'aumentare della quantità di crema spalmata, le tre differenti quantità non sono risultate significativamente

diverse dal campione di controllo positivo (UVA 15 min), pur preservando una vitalità cellulare intorno all'80%.

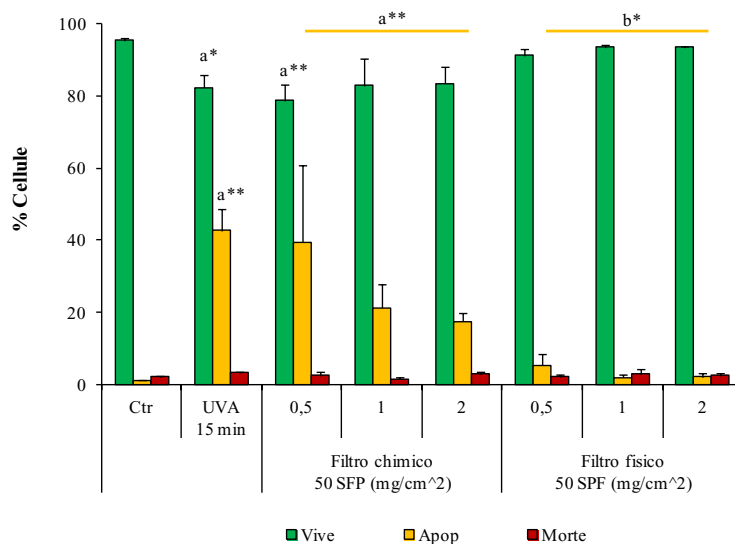


Figura 7. Vitalità cellulare espressa come percentuale (%) di cellule vive, apoptotiche e morte, analizzata in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 15 minuti, in presenza di due prodotti solari, contenenti filtri chimici o filtri fisici (SPF 50), alle quantità di 0,5, 1 e 2 mg/cm². I dati sono espressi come media±SEM. a=Ctrl; b=UVA 15 minuti; *p<0.05; **p<0.01.

Simultaneamente all'analisi al citofluorimento della vitalità cellulare è stata effettuata anche l'analisi dei livelli intracellulari di ROS, sempre in termini di percentuale di cellule con un basso, medio e alto contenuto di ROS. I risultati illustrati nella **figura 8** mostrano come ad un aumento altamente significativo della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS (barra rossa) del controllo positivo (UVA 15 min) rispetto a quello del controllo negativo (Ctrl) (+86%; ***p<0.001), si contrapponga, per entrambe le creme, un trend in diminuzione dello stesso parametro all'aumentare della quantità di crema

spalmata, pur risultando significativo ($*p<0.05$) solo in corrispondenza di 1 e 2 mg/cm^2 del prodotto solare con filtro fisico rispetto al campione irraggiato in assenza di creme (UVA 15 min).

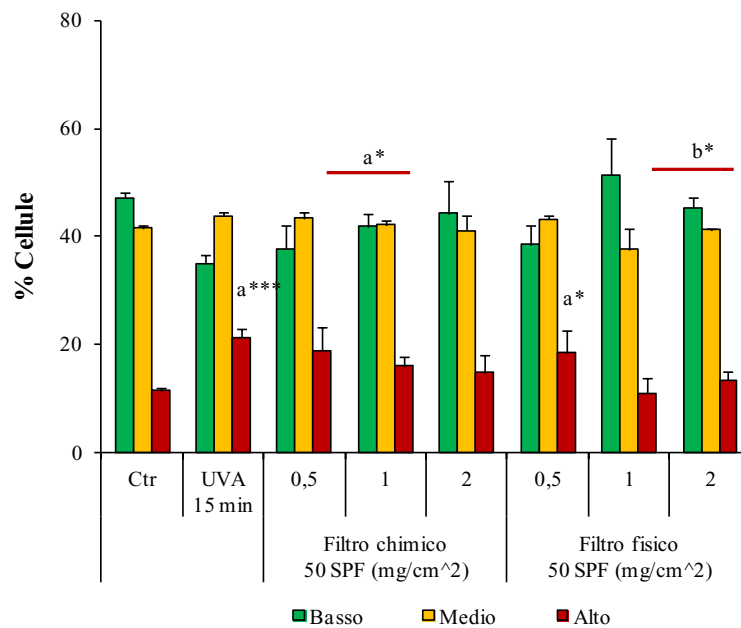


Figura 8. Livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio e alto contenuto di ROS, analizzati in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 15 minuti, in presenza di due prodotti solari, contenenti filtri chimici o filtri chimici (SPF 50), alle quantità di 0.5, 1 e 2 mg/cm^2 . I dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$. a=Ctrl; b=UVA 15 minuti; $*p<0.01$; $***p<0.001$.

E' stata infine valutata l'eventuale differenza nel grado di protezione dal danno ossidativo indotto al DNA dall'esposizione per 15 minuti ai raggi UVA, prodotto da diverse quantità di crema con SPF 50 (0.5, 1 e 2 mg/cm^2) confrontando entrambe le tipologie oggetto di studio. In analogia all'analisi condotta comparando i diversi SPF, è stata impiegata la versione modificata del Comet assay in presenza di FPG, un enzima sensibile anche alle basi ossidate,

dal momento che la versione alcalina standard non era stata in grado di mettere in evidenza differenze significative in termini di rotture sul filamento del DNA, tra campioni non irraggiati e quelli irraggiati per 15 min con UVA. I risultati descritti nella **figura 9** mostrano come tutte e tre le quantità impiegate, per entrambe le creme, siano in grado di proteggere il DNA dal danno ossidativo indotto dall'irraggiamento, riducendo la percentuale di tail intensity in maniera significativa nel caso della 0.5 mg/cm² del prodotto solare con filtro fisico (**9B**) (-8.5%, *p<0.05) e altamente significativa (**p<0.001) rispettivamente per tutte e tre le quantità testate del prodotto solare con filtri chimici (**9A**) (-44.1%, -36.5% e -46.1%) e per le altre due del prodotto solare con filtri fisici (**9B**) (-17.8%, -24.8%) rispetto al campione irraggiato (UVA 15 minuti). In particolare, nel caso del prodotto solare con filtro fisico (**9B**), è stata osservata una differenza significativa tra le quantità di crema spalmate, registrando in corrispondenza di 2 mg/cm² una diminuzione altamente significativa del danno ossidativo al DNA rispetto alla stessa crema spalmata 0.5 mg/cm² (-17.9%, **p<0.01).

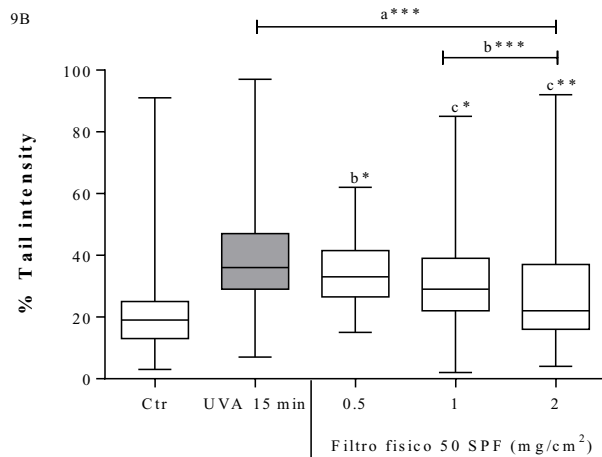
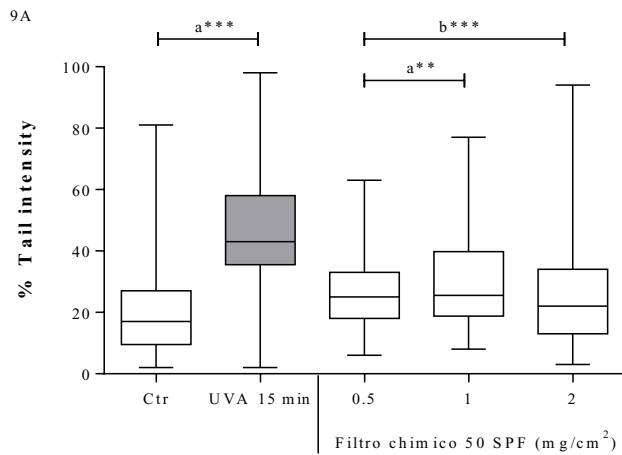


Figura 9. Livelli di danno ossidativo, espressi come percentuale (%) di tail intensity, analizzati in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 15 minuti, in presenza di due prodotti solari, contenenti filtri chimici (**9A**) o filtri fisici (**9B**) (SPF 50), alle quantità di 0.5, 1 e 2 mg/cm^2 . I dati sono espressi come distribuzione della popolazione sottoforma di Box Plot che individua i valori minimo, massimo, il 25%, il 75% percentile e la mediana. a=Ctr; b=UVA 15 minuti; c=0.5 mg/cm^2 ; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

DISCUSSIONE

Uno dei maggiori fattori di rischio nell'insorgenza e nello sviluppo di patologie cutanee è l'esposizione alla radiazione ultravioletta, che costituisce circa il 5% delle radiazioni solari che raggiungono la superficie terrestre. A causa dell'aumento delle attività umane all'esterno e della riduzione dello strato di ozono che assorbe la maggior parte della radiazione UV, il numero di tumori alla pelle è notevolmente incrementato negli ultimi anni (*Moehrle M, 2008*). Sebbene la radiazione UVC sia quella potenzialmente più dannosa per i sistemi biologici, questa viene tuttavia efficacemente filtrata dallo strato di ozono. Lo stesso non è invece in grado di filtrare i raggi UVA e UVB e di conseguenza l'intensa o eccessiva esposizione agli stessi porta a ustioni solari, eritema, infiammazione, iperpigmentazione, rughe, iperplasia, fotoinvecchiamento e fotocarcinogenesi). La correlazione tra l'esposizione alla luce solare e l'insorgenza di tumori cutanei ha portato nel 2009 l'International Agency for Research on Cancer (IARC) a classificare le radiazioni solari tra i cancerogeni di Classe I. Infatti, i raggi UVA sono in grado di penetrare nel derma dove risiedono i fibroblasti e di indurre il danno cellulare attraverso la generazione di ROS, e attraverso la fotoeccitazione di fotosensibilizzatori endogeni .

Per di più i ROS sono i mediatori chiave di molti degli effetti biologici indotti dai raggi UVA, inclusa l'apoptosi, un processo fisiologico di morte cellulare, che si verifica in una varietà di condizioni fisiologiche e di sviluppo e in risposta a molti agenti citotossici. L'induzione dell'apoptosi in seguito all'esposizione ai raggi UV sembra essere un meccanismo protettivo, perché consente di eliminare le cellule gravemente danneggiate che comportano il rischio di trasformazione maligna. L'apoptosi mediata dai raggi UV è un processo estremamente complesso in cui sono coinvolti diversi percorsi molecolari. Questi includono danni al DNA, attivazione del gene soppressore del tumore p53, attivazione dei recettori della morte cellulare direttamente tramite UV o mediante rilascio autocrino di ligandi di morte, danno mitocondriale e rilascio di citocromo C (*Han Bit Kim e Byung Sun Yoo, 2016*). Inoltre, il danno ossidativo indotto dai raggi UVA mediato dall'aumentata formazione di ROS ha conseguenze sia a livello molecolare che cellulare (*Wondrak GT et al. 2003*). La vitalità cellulare e la funzione mitocondriale può essere compromessa, la genotossicità può insorgere attraverso la formazione di rotture a doppio e singolo filamento e purine ossidate e l'espressione di importanti geni coinvolti nella matrice extracellulare della pelle viene modificata (*Bickers DR, Athar M 2006*).

Alla luce di queste evidenze, l'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di confrontare *in vitro*, utilizzando fibroblasti di derma umano neonatali, l'efficacia nella protezione dal fotodanno di due tipologie di prodotti per la protezione solare, contenenti uno filtri chimici e l'altro filtri fisici, rispetto a tre diversi fattori di protezione (10, 30 e 50 SPF) e a tre diverse quantità spalmate (0.5, 1 e 2 mg/cm²). I due prodotti solari sono stati messi a confronto rispetto al meccanismo con cui proteggono la pelle dai danni da foto esposizione ai raggi UV in quanto i filtri fisici sono costituiti da piccole particelle metalliche (ZnO e TiO₂) in grado di riflettere e disperdere i raggi UV solari, mentre quelli chimici sono composti da sostanze di sintesi in grado di assorbire l'energia delle radiazioni UV, rilasciandola principalmente sottoforma di calore. In entrambi i casi, l'obiettivo finale è quello di impedire che le radiazioni UV raggiungano gli strati profondi della pelle danneggiando le cellule dell'epidermide e del derma. La valutazione dell'efficacia con cui i filtri solari proteggono dal fotodanno, *in vitro* si basa sul loro fattore di protezione solare (SPF) che è una misura di protezione contro scottature o eritema, una risposta biologica dovuta principalmente a UVA2 (320–340 nm) e UVB. Invece, *in vivo*, la protezione UVA si basa sui cambiamenti di pigmentazione immediati (secondi) o persistenti (2-24 h) o sulla minima risposta eritematosa e pigmentazione persistente della pelle causata da UVA, Per essere

efficace, quindi, una crema solare dovrebbe schermare il più possibile i raggi UV che raggiungono la pelle, la maggior parte dei quali sono UVA (> 95%) (Scharffetter-Kochanek K et al. 1997). L'efficienza con cui i filtri solari proteggono dal fotodanno potrebbe però cambiare considerevolmente in funzione del fattore di protezione e della quantità spalmata. Alcune sostanze non proteggano adeguatamente dagli ultravioletti (soprattutto se applicate in modo scorretto). In alcuni casi (anche se rari) queste protezioni solari causano addirittura reazioni irritanti e allergiche per questo Negli ultimi anni sono stati introdotti filtri di nuova generazione che proteggono da entrambi i tipi di raggi e sono più stabili (Lautenschlage S et al, 2007; Svobodová A et al, 2010). L'efficacia di queste creme è ancora argomento di discussione. Proprio per questo motivo, i due protettivi solari sono stati messi a confronto sia rispetto al fattore di protezione solare sia rispetto alla diversa quantità di crema spalmata. In quest'ultimo caso infatti, secondo la raccomandazione europea del 2006, per raggiungere il livello di protezione indicato dal fattore di protezione solare, i prodotti devono essere applicati in quantitativi analoghi a quelli utilizzati in sede di prova, vale a dire 2 mg/cm².

Nel presente lavoro di tesi il fotodanno è stato quantificato in termini di vitalità cellulare, di livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e del danno ossidativo al DNA, 24 ore dopo l'esposizione delle cellule ai raggi UVA

per 15 minuti, equivalente a 45 J/cm^2 , dose ottimale per favorire un aumento significativo dei livelli. Considerando il dato citofluorimetrico della vitalità cellulare, che ha messo in evidenza una diminuzione della percentuale di cellule vitali dall'86% del campione di controllo (0 minuti di irraggiamento) al 60% di quello irraggiato per 15 minuti, l'induzione di un danno ossidativo al DNA significativo, è stato valutato adottando la stessa tempistica ma incrementando la sensibilità del comet assay mediante l'utilizzo di particolari endonucleasi in grado di mettere in evidenza specifici siti di danno ossidativo del DNA. Il riconoscimento di specifici siti di danno da parte di questi enzimi, consente di convertire le lesioni a carico del DNA in vere e proprie rotture, aumentando di conseguenza la quantità di frammenti dello stesso presenti nella coda della cometa e quindi la percentuale di tail intensity, ossia il parametro più rappresentativo con cui viene espresso il danno ossidativo al DNA. Le specie reattive dell'ossigeno alterano le strutture cellulari provocando reazioni a catena (come la perossidazione lipidica) e ossidando le basi del DNA (*Ikehata H and Ono T, 2011*). Il danno ossidativo più frequente alle basi del DNA è quello che porta alla formazione di 8-idrossiguanina (8-oxo-G) (*Dizdaroglu M et al, 2002*). Inoltre, una varietà di forme di danno al DNA può essere indotta dall'UVR, inclusi dimeri di bipyrimidina, basi ossidate, legami crociati DNA-proteina e reazioni di cicloadizione con prodotti di decomposizione di

perossidi lipidici (*Cadet et al, 2011*). Inoltre, i radicali idrossilici generati da processi fotoossidativi possono attaccare il DNA per generare rotture a singolo filamento e possono formarsi rotture a doppio filamento in risposta a intermedi di riparazione di DNA aberranti (*Wakasugi et al., 2014*) o come conseguenza della rottura della forcella di replica. Ad esempio, l'assorbimento dei fotoni UV della luce da parte dei nucleotidi pirimidinici adiacenti nel DNA genera due principali fotoprodotti, il pirimidina (6-4) pirimidone fotoprodotto [(6-4) PP] e il dimero ciclobutano pirimidina (CPD). Queste lesioni, se non riparate, portano alla formazione di mutazioni puntiformi ed in particolare a transizioni del tipo C→T. (*Ayala F et al, 2013*).

Quindi, essendo ormai noto che le radiazioni UV (UVR) generano fotoprodotti nel DNA genomico, che promuovono mutazioni genetiche che guidano la carcinogenesi cutanea, possiamo ben capire come la fotoprotezione dall'esposizione ripetuta ai raggi del sole che raggiungono la superficie della pelle sia una misura preventiva e terapeutica essenziale contro il fotoinvecchiamento e la fotocarcinogenesi.

Se i raggi UVA sono schermati da uno strato di crema solare presente sopra le cellule, ma non a contatto con esse, come nel modello sperimentale qui utilizzato, i parametri relativi al danno saranno influenzati positivamente. In effetti, i risultati ottenuti nel nostro studio dimostrano che entrambe le tipologie

di creme, indipendentemente dal fattore di protezione solare, sono in grado di preservare la vitalità cellulare contrastando la diminuzione della percentuale di cellule vitali indotta invece dall'esposizione ai raggi UVA in assenza di crema solare.

Allo stesso modo, indipendentemente dal fattore di protezione solare, entrambi tipologie di creme sono in grado di contrastare l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS, mostrando un moderato effetto dose-dipendente all'aumentare del fattore di protezione solare, anche se statisticamente non significativo.

Infine, anche per quanto riguarda la protezione del DNA dal danno ossidativo indotto da 15 minuti di esposizione ai raggi UVA, analizzato mediante l'impiego del Comet assay e delle endonucleasi (FPG), entrambi i protettivi solari sono in grado di prevenire in maniera altamente significativa il danno al DNA indotto dagli UVA. In particolare, nel caso del prodotto solare con filtri chimici, il fattore di protezione solare più basso (10 SPF) sembra proteggere, in maniera statisticamente significativa, di più rispetto ai fattori più alti (30 e 50 SPF); al contrario, nel caso del prodotto solare con filtri fisici, il fattore di protezione solare più alto (50 SPF) sembra proteggere, in modo altamente più significativo, il DNA rispetto ai fattori di protezione più bassi (10 e 30 SPF), testati nel presente lavoro di tesi Utilizzando lo stesso impianto sperimentale,

ma impiegando solo il fattore di protezione solare più alto (50 SPF), i due tipi di prodotti solari sono stati confrontati valutando gli stessi parametri di fotodanno appena discussi, in rapporto però a tre diverse quantità di creme comunemente impiegate dal consumatore finale. Partendo da quella raccomandata dalla normativa CE 647 del 2006, ossia 2 mg/cm², sono state testate altre due quantità, ossia 1 e 0.5 mg/cm², essendo queste ultime due dosi più realistiche in quanto vicine alle quantità realmente utilizzate dai consumatori. . Infatti, diversi studi hanno dimostrato che le persone applicano circa un quarto della dose raccomandata di crema solare, che è una quantità inadeguata rispetto alla quantità raccomandata di agente per la protezione solare per ottenere il beneficio dichiarato (cioè, 2 mg/cm²).

(*MS Latha et al ,2012*). In termini di vitalità cellulare, è stato osservato come il prodotto solare contenente i filtri fisici TiO₂ e ZnO, sia stato in grado di prevenire l'aumento della percentuale di cellule apoptotiche, preservando la popolazione di cellule vitali, in maniera significativa e indipendentemente dalla quantità di crema impiegata anche se con un leggero trend in diminuzione passando da 0.5 a 2 mg/cm². Al contrario, il prodotto solare con filtri chimici non è stato in grado di impedire l'aumento della popolazione di cellule apoptotiche, anche se è stato possibile osservare un trend in diminuzione della stessa popolazione all'aumentare della quantità di crema spalmata. Lo stesso

andamento è stato riscontrato in termini di livelli intracellulari di ROS. Anche in questo caso infatti, il prodotto solare con filtri fisici si è dimostrato capace di contrastare l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS, ed in particolare, in maniera significativa in corrispondenza di 1 e 2 mg/cm²; come per la vitalità cellulare, anche nel caso della produzione di ROS, il prodotto solare con filtri chimici non si è dimostrato in grado di prevenire l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS, pur mostrando un andamento in diminuzione non significativo, all'aumentare della quantità di crema spalmata. Infine, l'analisi del danno ossidativo al DNA ha confermato quanto già visto in precedenza, ossia che a parità di fattore di protezione solare, in questo caso 50 SPF, i filtri sono entrambi in grado di proteggere il DNA dal danno indotto dai raggi UVA. In particolare, nel caso del prodotto solare con filtri fisici, il danno, in termini di percentuale di tail intensity, diminuisce in maniera statisticamente significativa all'aumentare della quantità spalmata rispetto al controllo positivo; al contrario, nel caso del prodotto solare con filtri chimici, non sembrano esserci differenze significative tra le diverse quantità di crema testate, anche se è stato possibile osservare unadiminuzione della percentuale di tail intensity rispetto al controllo positivo (UVA per 15 minuti) all'aumentare della quantità di crema spalmata.

CONCLUSIONI

In conclusione è possibile affermare l'indice SPF non dimostra delle significative differenze in relazione ai livelli di radicali, danno ossidativo e conseguente vitalità delle cellule almeno nelle condizioni di irraggiamento testato, che comunque erano in grado di produrre una significativa diminuzione della vitalità. E' possibile che tempi più lunghi di irraggiamento siano in grado di mettere in evidenza differenze maggiori fra le tipologie di formulati. Al contrario lo spessore di applicazione delle creme risulta essere un fattore che influenza significativamente tutti i parametri considerati, questo assume particolare rilievo perché a differenza del fattore SPF e dei tempi di applicazione e ri-applicazione delle creme questo rappresenta probabilmente il parametro più difficilmente controllabile da parte dell'utilizzatore. I dati nel loro insieme rafforzano il concetto che le creme solari vanno applicate ripetutamente ma particolare attenzione va posta anche nella quantità di crema applicata. Inoltre è possibile affermare che il Comet assay è un metodo molto sensibile per mettere in rilievo le differenze in termini protettivi tra le diverse creme/SPF/e quantità, più di quello della vitalità e produzione di ROS e che sarebbe un test utile da adottare per le case cosmetiche durante lo sviluppo delle creme solari.

BIBLIOGRAFIA

- Aitken GP Henderson JR, Chang SC, McNeil CJ, Birch-Machin MA. (2007). Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT
- Ambrosi et al.,2004. Anatomia dell'uomo. Edi-Ermes). Ambrosi et al (2004).
- Anatomia dell'uomo. Edi-Ermes. Parte seconda. Capitolo 17. Pag 429-436.
- Ayala F et al (2013). The Role of Optical Radiations in Skin Cancer. ISRN Dermatol., 1–8.
- Azzi et al (2002). The role of a-tocopherol in preventing disease: from epidemiology to molecular events. Mol Aspects Med, 24(6) :3 25-36.
- Baumann L (2007). Skin ageing and its treatment. J Pathol, 211: 241–251
- Bickers DR, Athar M (2006) Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. J Invest Dermatol 126: 2565–2575
- Cadet J and Douki T (2011). Oxidatively Generated Damage to DNA by UVA Radiation in Cells and Human Skin. J. Invest. Dermatol. 131, 1005–1007
- Castano P., 2006 castano P., Donato R.F, anatomia dell'uomo Edi.Ermes 2006, pag. 433-435, 436-440
- Celotti F e Veraldi S. Patologia generale e fisiopatologia. Capitolo 18. Edises
- Cheng, J. Z., S. S. Singhal, M. Saini, J. Singhal, J. T. Piper, F. J. Van Kuijk, P. Zimniak, Y. C. Awasthi, and S. Awasthi(1999) Effects of mGST A4 transfection on 4-hydroxynonenal-mediated apoptosis and differentiation of K562 human erythroleukemia cells. Arch Biochem Biophys 372 (1):29-36.
- Choi W Miyamura Y, Wolber R, Smuda C, Reinhold W, Liu H, Kolbe L, Hearing VJ. (2010). Regulation of human skin pigmentation in situ by repetitive UV exposure: molecular characterization of responses to UVA and/or UVB. J Invest Dermatol, 130 (6) : 1685-1696.
- Colombo R et al (2007). Biologia dei tessuti. Edi-ermes, Milano
- Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? Environ Health Perspect 104: 465–469
- Cribier B, Grosshans E.Histologie de le peau normale et lèsion histopathologiques lémentaires. In: Encycl Mèd Chir (dermatologie)(2002), E'ditions Techniques (Paris), 98-085 A10,;16p.
- Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. J Biol Chem 262 (20):9895-9901.
- D'Errico M Lemma T, Calcagnile A, Proietti De Santis L, Dogliotti E. (2006). Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to

- environmental agents. *Mutat Res*, 614 (1-2) : 37-47.
- Dizdaroglu M et al (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement^{1, 2}. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1102–1115.
- El Ghissassi F Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. (2009). A review of human carcinogens-part D: radiation. *Lancet Oncol*, 10 (8) :751-752.
- Galli CL et al. *Tossicologia. Piccin. II edizione.*
- Gambichler T Armin Bader, Mirjana Vojvodic, Falk G Bechara, Kirsten Sauermann, Peter Altmeyer, and Klaus Hoffmann¹ (2002.) Impact of UVA exposure on psychological parameters and circulating serotonin and melatonin. *BMC Dermatol*, 12; 2:6
- Gutteridge, J. M., and J. V. Bannister.(1986) Copper zinc and manganese superoxide dismutases inhibit deoxyribose degradation by the superoxide-driven Fenton reaction at two different stages. Implications for the redox states of copper and manganese. *Biochem J* 234 (1):225-228.
- Han Bit Kim and Byung Sun Yoo(2016) Propolis Inhibits UVA-Induced Apoptosis of Human Keratinocyte HaCaT Cells by Scavenging ROS *Oxicol Res.*32(4): 345–351.
- Ikehata H¹, Ono T(2011) The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res.* 2011;52(2):115-25.
- Harrison GI and Young AR (2002). Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin. *Methods*, 28: 14-19.
- Hermes-Lima M et al (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, 319-368.
- He YY et al (2005). Role of phagocyte oxidase in UVA-induced oxidative stress and apoptosis in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, (125) 3 : 560-566.
- Hseu Y-C et al (2012). Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1245–1255.
- Hussein MR (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol*,

- Iona M. Balmus, Ciobica A. et al. (2016) The Implications of Oxidative Stress and Antioxidant Therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical Aspects and Animal Models Jan-Feb; 22(1): 3–17.
- Jandova J et al (2012). Cyclophilin 40 alters UVA-induced apoptosis and mitochondrial ROS generation in keratinocytes. *Exp Cell Res*, 10;319 (5) : 750-760.
- Juzeniene A and Johan Moan (2012). Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. *Dermatoendocrinol*, 4 (2) : 109-117.
- Jurja S¹, Coman M, Hîncu MC The ultraviolet influence upon soft eye tissues. *Rom J Morphol Embryol*. 2017;58(1):45-52.
- Kadaja M Keyes BE, Lin M, Pasolli HA, Genander M, Polak L, Stokes N, Zheng D, Fuchs E SOX9: a stem cell transcriptional regulator of secreted niche signaling factors. (2014) *Genes Dev*. 28, 328–341
- Kehrer JP Free radical as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol*. 1993;23,21-48
- Kostyuk V Potapovich A, Suhan T, De Luca C, Pressi G, Dal Toso R, Korkina L. (2008). Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. *Planta Med*, 74 (5) : 509-514.
- Kowaltowsky AJ, Vercesi AE Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free radical Biol Med*. 1999;26,463-471
- Kuppusamy, P., and J. L. Zweier. (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 264 (17):9880-9884.
- Lautenschlager S et al (2007). Photoprotection. *Lancet*, 370 (9586) : 528-537.
- Mardaryev AN Gdula MR, Yarker JL, Emelianov VU, Poterlowicz K, Sharov AA, Sharova TY, Scarpa JA, Joffe B, Solovei I, Chambon P, Botchkarev VA, Fessing MY. (2014). p63 and Brg1 control developmentally regulated higher-order chromatin remodelling at the epidermal differentiation complex locus in epidermal progenitor cells. *Development* 141, 101–111.
- McKee P. *Pathology of the skin* (2nd edition) .London: Mosby-Wolfe, 1996
- Moehrle M (2008). Outdoor sports and skin cancer. *Clin dermatol*, 26 (1) : 12-15.
- M.S. Latha, MD,^a Jacintha Martis, MD,^b V Shobha, MD,^b Rutuja Sham Shinde et al., (2013) Sunscreening Agents *J Clin Aesthet Dermatol*. 2013 Jan; 6(1): 16–26.

- Narayanapillai S , Agarwal C, Tilley C, Agarwal R (2012). Silibinin is a potent sensitizer of UVA radiation-induced oxidative stress and apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells. *Photochem Photobiol*, 88 (5) : 1135-1140
- Nichols JA and Katiyar SK (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: antiinflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* 302, 71–83.
- Nedergaard, M., and U. Dirnagl. 2005. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 50 (4):281-286
- Pastor N., Weinstein H. , Jamison E. and Brenowitz M. (2000) A Detailed Interpretation of OH Radical Footprints in a TBP-DNA Complex Reveals the Role of Dynamics in the Mechanism of Sequence-specific Binding **J. Mol. Biol.* 304, 55±68
- Pinnel SR.2003. Cutaneous photodamage, oxidative stress,and topical antioxidantn protection. *Journal of American Accademy of Dermatology* 48:1-19
- Rivett J.(1986) Regulation of Intracellular Protein Turnover: Covalent Modification as a Mechanism of Marking Proteins for Degradation *Volume 28, , Pages 291-337*
- Routaboul C, Denis A, Vinche A(1999) Immediate pigment darkening: Description ,kinetic and biological function. *European Journal of Dermatology* 9:95-99
- Runger TM and Kappes UP. (2007). Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 24 (1) : 2-10.
- Syed DN Afaq F, Mukhtar H.(2011). Differential activation of signaling Ppthways by UVA and UVB radiation in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol*, 88: 1184–1190.
- Sies H et al (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, 62(6 Suppl):1315S-1321S.
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blandschun R, et al. (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem* 378: 1247–1257
- Seraufstatter I.,Hypslop P.A., Jackson J.H and Cochrane C.G:Oxidant induced DNA damage of target cells.*J Clin Inves.*1988.82:1040-1050
- Schalka,S , SteinerD, et al.(2014) *An Bras Dermatol*: 89(6 Suppl 1): 1–74.
- Svobodová A , ZdařilováJitka Vostálová A. (2009). *Lonicera cerulea* and *Vaccinium myrtillus* fruit poliphenols protect HaCaT keratinocytes against

UVB-induced phototoxic stress and DNA damage. *J Dermatol Sci*, 56 (3) : 196-204.

-Terra VA Souza-Neto FP, Pereira RC, Silva TN, Costa AC, Luiz RC, Cecchini R, Cecchini AL (2012). Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation. *J Photochem Photobiol B*, 2;109:34-41.

-Valko M et al (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.

Review. *Chem Biol Interact*.160 (1) : 1-40.

-Valko M Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. (2004). Role of oxygen free radicals in DNA damage and incidence. *Mol Cell Biochem*, 266:37-56.

-VanLoon GW et al (2000). Environmental chemistry. Oxford University Press, Oxford

-Verschooten LS, Claerhout S, Van Laethem A, Adostins P, Garmyn M.2006. New strategies of photoprotection, *Photochemistry and Photobiology* 82:1016-1023

--Viola G ortunato E, Ceconet L, Del Giudice L, Dall'Acqua F, Basso G (2008). Central role of mitochondria and p53 in PUVA-induced apoptosis in human keratinocytes cell line NCTC-2544. *Toxicol Appl Pharmacol*, 227 84-96.

-Wakasugi M et al. (2011) The mechanisms of UV mutagenesis.

Ikehata H¹, Ono T. *J Radiat Res*.52(2):115-25 Association between Combined Lifestyle Factors and Non-Restorative Sleep in Japan: A Cross-Sectional Study Based on a Japanese Health Published:

-Wang CC et al (2013). Phototoxicity of zinc oxide nanoparticles in HaCaT keratinocytes-generation

of oxidative DNA damage during UVA and visible light irradiation. *J Nanosci Nanotechnol*, 13 (6): 3880-3888.

-Wondrak GT, Roberts MJ, Cervantes-Laurean D, Jacobson MK, Jacobson EL (2003) Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells. *J Invest Dermatol* 121: 578–586.

-Wischer K (2008). UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene*, 27 (31) : 4269-4280.

-Wolber R Kathrin Schlenz, Kazumasa Wakamatsu, Christoph Smuda, Yukiko Nakanishi, Vincent J. Hearing, and Shosuke Ito (2008). Pigmentation effects of solar-simulated radiation as compared with UVA and UVB radiation. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21 (4) : 487-491.

- Yam JC et al (2013). Ultraviolet light and ocular diseases. *Int Ophthalmol*, 24 (4) : 288-290.
- Zile MH (1998). Vitamin A and embryonic development: an overview. *J Nutr*, 128(2 Suppl):455S- 458S.

