

LAÍZA MAGALHÃES DE ARAÚJO

Avaliação da expressão gênica de colágeno em fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos.

BRASÍLIA, 2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LAÍZA MAGALHÃES DE ARAÚJO

Avaliação da expressão gênica de colágeno em fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

BRASÍLIA
2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1020883.

Araújo, Laíza Magalhães de.
A663a Avaliação da expressão gênica de colágeno em fibroblastos
tratados com extratos de fungos endofíticos / Laíza Magalhães
de Araújo. -- 2015.
xiii, 71 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,
Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, 2015.

Inclui bibliografia.

Orientação: Maria de Fátima Borin.

1. Pele - Envelhecimento. 2. Colágeno. 3. Fungos.
I. Borin, Maria de Fátima. II. Título.

CDU 615.32

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LAÍZA MAGALHÃES DE ARAÚJO

**Avaliação da expressão gênica de colágeno em fibroblastos tratados com
extratos de fungos endofíticos.**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Gustavo Barcellos Barra
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni (Suplente)
Universidade de Brasília

**Aos meus pais, Maria Helena e
Ridevaldo, e à minha avó Antônia.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e pelas graças concedidas todos os dias.

Aos meus amados pais, Maria Helena e Ridevaldo, pelos conselhos e incentivos em todos os momentos de minha vida.

À minha avó Antônia, pela cumplicidade e sabedoria transmitida.

A todos meus familiares que sempre me apoiaram em todas as necessidades.

À minha orientadora, Dra. Maria de Fátima Borin, pela paciência, dedicação, compreensão, e pela sabedoria transmitida.

À professora Dra. Michella Coelho pela paciência e dedicação na transmissão do conhecimento acerca do ensaio de RT-qPCR.

Aos meus amigos do laboratório Ádria do Padro Barros, Karina Costa, Natália Santos e Pedro Góes Mesquita, pelo conhecimento transmitido e pela ajuda em diversas etapas da pesquisa.

Às alunas de iniciação científica Ana Carolina Lima e Michelly Ribeiro pela dedicação e auxílio na realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Farmacologia Molecular.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto e pela bolsa de mestrado concedida durante o período da pós-graduação.

“Resplandecente é a sabedoria, e sua beleza é inalterável: os que a amam, descobrem-na facilmente. Os que a procuram encontram-na. Ela antecipa-se aos que a desejam”.

(Bíblia, Sabedoria, 6, 12-13)

RESUMO

Araújo, Laíza Magalhães de. Avaliação da expressão gênica de colágeno em fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos [dissertação]. 2015. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

O processo de envelhecimento da pele é bastante complexo e pode ser classificado como envelhecimento intrínseco, determinado primordialmente por fatores genéticos, e envelhecimento extrínseco, induzido por fatores como exposição crônica à radiação ultravioleta, consumo excessivo de álcool, tabagismo e fatores nutricionais. A pele envelhecida é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais que podem provocar o enrugamento, descamação, ressecamento, anormalidade de pigmentação e câncer de pele. Algumas das desordens que acometem a pele envelhecida se devem principalmente ao estresse oxidativo promovido por espécies reativas de oxigênio, que são capazes de alterar o equilíbrio entre síntese e degradação de componentes da matriz extracelular dérmica, favorecendo o segundo em detrimento do primeiro. Produtos naturais protegem a pele de danos induzidos pelo estresse oxidativo e podem atuar em vias importantes no processo de envelhecimento cutâneo. Dentre as possíveis fontes para obtenção de produtos naturais pode-se destacar os fungos endofíticos que são capazes de produzir uma grande diversidade de compostos. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tratamento com metabólitos de dois fungos endofíticos isolados de folhas de *Bauhinia variegata* na expressão gênica do colágeno do tipo I, metaloproteinase do tipo 1 e inibidor de metaloproteinase do tipo 1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo. Os resultados obtidos mostraram que ambos os fungos foram capazes de produzir compostos polifenólicos e, mais especificamente, flavonóides. O tratamento dos fibroblastos com o extrato produzido por um dos fungos endofíticos induziu o aumento da expressão gênica do colágeno do tipo I, diminuiu a expressão gênica da metaloproteinase do tipo 1 e inibiu a atividade da metaloproteinase do tipo 2, sugerindo que os metabólitos produzidos por este fungo podem ser benéficos na prevenção do envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: envelhecimento; pele; colágeno; polifenóis; metaloproteinase; fungos endofíticos.

ABSTRACT

Araújo, Laíza Magalhães de. Assessment of collagen gene expression in fibroblasts treated with endophytic fungi extracts [dissertation]. 2015. Faculty of Health Sciences. University of Brasilia.

Skin aging process is very complex and can be classified as intrinsic aging, primarily determined by genetic factors, and extrinsic aging, induced by nutritional and behavioral factors, such as chronic exposure to ultraviolet radiation, excessive alcohol consumption, smoking and nutritional disorders. Skin aging is characterized by morphological and functional changes, which can cause wrinkling, scaling, dryness, pigmentation abnormalities and skin cancer. Some of the disorders that affect the skin aging are mainly due to oxidative stress promoted by reactive oxygen species that are able to change the balance between synthesis and degradation of the dermal extracellular matrix components, favoring degradation rather than the synthesis process. Natural products protect skin from damage induced by oxidative stress and may act in important pathways in the skin aging. Among the possible sources for obtaining natural products it is possible to highlight the endophytic fungi, which are able to produce a great diversity of natural compounds. The objective of this study was to evaluate the influence of treatment with metabolites produced by two endophytic fungi isolated from *Bauhinia variegata* leaves on genic expression of collagen type I, metalloproteinase type 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase type 1 in human dermal fibroblasts exposed to oxidative stress. The results show that both fungi were able to produce polyphenolic compounds and, more specifically, flavonoids. Treatment of fibroblasts with the extract produced by one of the endophytic fungi increased the expression of collagen type I gene, reduced the expression of metalloproteinase type 1 gene and inhibited metalloproteinase type 2 activity, suggesting that metabolites produced by this fungus can be benefic in prevent skin aging.

Keywords: aging; skin; collagen; polyphenols; metalloproteinase; endophytic fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas da pele jovem, da pele envelhecida intrinsecamente e da pele envelhecida extrinsecamente.

Figura 2. Diferença do conteúdo de colágeno na pele jovem, na pele envelhecida intrinsecamente e na pele envelhecida extrinsecamente.

Figura 3. Mecanismos bioquímicos envolvidos no fotoenvelhecimento da pele.

Figura 4. Atividade antioxidante dos padrões e extratos dos metabólitos dos fungos endofíticos submetidos ao ensaio de redução do radical estável DPPH.

Figura 5. Viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados com os extratos produzidos pelos fungos endofíticos I e II.

Figura 6. Ensaio de avaliação da peroxidação lipídica.

Figura 7. Ensaio de avaliação da atividade da superóxido dismutase em fibroblastos tratados com os extratos produzidos pelos fungos I e II.

Figura 8. Ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase em fibroblastos tratados com extratos produzidos pelos fungos I e II.

Figura 9. Avaliação da integridade do RNA total extraído dos fibroblastos tratados com extratos e expostos ao estresse oxidativo.

Figura 10. Curva padrão do gene β -actina (Martini, 2013).

Figura 11. Curva padrão do gene COL1A1.

Figura 12. Curva padrão do gene MMP-1.

Figura 13. Curva padrão do gene TIMP-1.

Figura 14. Verificação da especificidade dos pares de *primers* a partir da curva de dissociação (curva de *melting*) dos produtos de amplificação.

Figura 15. Expressão gênica relativa do mRNA do COL1A1, da MMP-1 e TIMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo.

Figura 16. Expressão gênica relativa do mRNA do COL1A1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo e tratados com os extratos dos fungos I e II.

Figura 17. Expressão gênica relativa do mRNA do MMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo e tratados com os extratos dos fungos I e II.

Figura 18. Expressão gênica relativa do mRNA do TIMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo e tratados com extratos dos fungos I e II.

Figura 19. Avaliação da atividade de metaloproteinases.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primers* utilizados para a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR dos genes COL1A1, MMP-1 e TIMP-1

Tabela 2. Composição do gel de poliacrilamida.

Tabela 3. Rendimento dos extratos dos metabólitos dos fungos endofíticos

Tabela 4. Quantificação de polifenóis totais nos extratos.

Tabela 5. Quantificação de flavonóides totais nos extratos.

Tabela 6. Avaliação do teor de pureza e concentração do RNA total extraído dos fibroblastos expostos ao estresse oxidativo e tratados ou não com extratos.

Tabela 7. Parâmetros de validação obtidos no teste de eficiência dos *primers* COL1A1, MMP-1 e TIMP-1.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catalase
COL1A1	Colágeno do tipo I alfa-1
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DPPH·	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GR	Glutaciona redutase
GSH-px	Glutaciona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
JNK	Quinase c-Jun amino terminal
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases de matriz
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5- difenil-tetrazólio
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NO·	Óxido nítrico
¹ O ₂	Oxigênio singleto
O ₂ ^{-·}	Ânion radical superóxido

OH [·]	Radical hidroxila
ONOO	Peroxinitrito
PBS	Tampão fostato de sódio e potássio, 1M, pH 7,4, com 0,8% de NaCl e 0,02% de KCl
RO ₂ [·]	Radical peroxil
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TA	Temperatura ambiente
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TGF-β	Fator de transformação de crescimento β
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
UV	Radiação ultravioleta
UVB	Radiação ultravioleta na faixa B do espectro (280 a 320 nm)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
SUMÁRIO.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Envelhecimento Cutâneo	1
1.2. Estresse oxidativo e envelhecimento cutâneo.....	7
1.3. Produtos naturais antienvelhecimento	11
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Manutenção dos fungos e cultivo em cultura líquida submersa	16
3.2. Produção dos extratos brutos.....	16
3.3. Avaliação do teor de polifenóis totais nos extratos	17
3.4. Avaliação do teor de flavonóides totais nos extratos.....	17
3.5. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos pelo método do DPPH.....	17
3.6. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos	18
3.7. Cultura de fibroblastos dérmicos humanos	19
3.8. Ensaio de avaliação da peroxidação lipídica	19
3.9. Tratamento das culturas de fibroblastos com metabólitos dos fungos endofíticos 20	
3.9.1. Tratamento das culturas de fibroblastos expostos ao estresse oxidativo para o ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase	20
3.9.2. Tratamento das culturas de fibroblastos expostos ao estresse oxidativo para o ensaio de RT-qPCR	20
3.9.3. Tratamento das culturas de fibroblastos expostos ao estresse oxidativo para avaliação da atividade de metaloproteinase e superóxido dismutase.....	21

3.10.	Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase	21
3.11.	Avaliação da atividade da enzima catalase	22
3.12.	Quantificação da expressão gênica de colágeno, metaloproteinase de matriz e inibidor tecidual de metaloproteinase nos fibroblastos tratados com extratos por RT-qPCR.	23
3.12.1.	Extração de RNA.....	23
3.12.2.	Tratamento do RNA total com a enzima desoxirribonuclease I (DNase I)	24
3.12.3.	Desenho e teste dos <i>primers</i>	24
3.12.4.	Validação dos <i>primers</i>	25
3.12.5.	Transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativa	26
3.13.	Avaliação da atividade proteolítica de metaloproteinases	27
3.14.	Quantificação de proteína	29
3.15.	Análise estatística.....	29
4.	RESULTADOS.....	30
4.1.	Produção dos metabólitos dos fungos em cultura líquida submersa e avaliação do rendimento dos extratos brutos.	30
4.2.	Quantificação de polifenóis totais	30
4.3.	Quantificação de flavonóides totais.....	31
4.4.	Avaliação da atividade antioxidante	31
4.5.	Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos.	32
4.6.	Ensaio de peroxidação lipídica.....	34
4.7.	Ensaio de avaliação de atividade da enzima superóxido dismutase.	35
4.8.	Ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase.	36
4.9.	Extração de RNA.....	38
4.10.	Análise e validação dos <i>primers</i> COL1A1, MMP-1, TIMP-1 e β -actina.	39
4.11.	Quantificação relativa da expressão gênica.....	44
4.12.	Avaliação da atividade de metaloproteinases.....	48
5.	DISCUSSÃO	49
6.	CONCLUSÃO	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envelhecimento Cutâneo

A pele é um órgão complexo composto por diferentes camadas, que possuem estruturas especializadas denominadas de apêndices (folículos pilosos, glândulas sudoríparas, apócrinas e écrinas, e glândulas sebáceas) e consiste de tipos heterogêneos de células e componentes extracelulares. Este órgão funciona como uma barreira efetiva ao atuar na proteção do organismo contra os efeitos deletérios do meio ambiente, sejam eles físicos, químicos ou microbiológicos, e é essencial para a manutenção da temperatura e da homeostase dos fluidos e eletrólitos (Haake et al., 2001; Nichols e Katiyar, 2010; Zouboulis e Makrantonaki, 2011).

As camadas que compõem a pele são a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo. A epiderme, camada superficial da pele, é avascular e depende exclusivamente da derme para sua nutrição. Possui como função principal a proteção do corpo contra estímulos ambientais danosos e diminuição da perda de fluidos. A epiderme é primariamente formada por queratinócitos organizados em um epitélio pavimentoso estratificado, que é constantemente renovado para manutenção da homeostase desta camada da pele. Também fazem parte da constituição da epiderme os melanócitos, as células de Langerhans e células de Merkel. Os queratinócitos com alta taxa de proliferação residem na camada basal, que se apoia na membrana basal da junção dermo-epidérmica. A maturação dos queratinócitos envolve a perda da capacidade proliferativa e sua diferenciação em corneócitos. A diferenciação ocorre na medida em que os queratinócitos migram até a superfície da pele através do estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. O estrato córneo, camada externa da epiderme, é constituído por corneócitos ricos em proteína que são imersos em matriz extracelular rica em lipídeos (Haake et al., 2001; Hwang et al., 2011; Mancini et al., 2014; Rittié e Fisher, 2015; Yadav et al., 2015).

A derme, unida à epiderme por meio da junção dermo-epidérmica, é formada pela matriz extracelular do tecido conjuntivo, que é composta por colágeno, fibras elásticas, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (Hwang et al., 2011). O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular, correspondendo a cerca de 80% do peso seco da pele, e apresenta uma configuração característica de

tripla-hélice. Os complexos da tripla hélice se associam com pequenos proteoglicanos para formar estruturas fibrilares arranjadas de forma regular chamadas de feixes, que são responsáveis por conferir força e suporte à pele humana. As fibras elásticas, que constituem de 2 a 4% da matriz extracelular, formam uma rede de interconexão que provê elasticidade e resiliência para a pele normal. As macromoléculas de glicosaminoglicanos e proteoglicanos correspondem a 0,1-0,3% do peso seco da pele, e atuam na promoção da hidratação da pele, principalmente através da capacidade do ácido hialurônico de se ligar à água (Uitto e Bernstein, 1998; Hwang et al., 2011).

Processos que alteram as proporções relativas dos componentes da matriz extracelular da derme contribuem para mudanças estruturais na pele e manifestações clínicas do envelhecimento cutâneo. O envelhecimento está associado a mudanças que ocorrem em nível celular e que levam à perda progressiva da função dos tecidos, além da diminuição da resistência ao estresse, da eficiência metabólica e do potencial de adaptação. Estas mudanças prejudicam a função basal e a resposta a estímulos ambientais, resultando na diminuição da capacidade de reparar danos, predisposição do organismo a doenças e disfunção permanente (Yaar e Gilchrist, 1998; Tigges et al., 2014).

Fatores intrínsecos e extrínsecos atuam na modificação de propriedades da pele no processo de envelhecimento cutâneo, podendo este ser, assim, classificado como envelhecimento intrínseco ou extrínseco (Gilchrist, 1989; Uitto e Bernstein, 1998).

O envelhecimento cutâneo intrínseco ocorre como consequência natural de mudanças fisiológicas ao longo do tempo, que são relacionadas a fatores genéticos que desencadeiam a senescência celular, diminuição da capacidade de reparo do DNA, perda dos telômeros, mutações pontuais do DNA mitocondrial e aumento da frequência de anormalidades cromossômicas. Neste tipo de envelhecimento há a deterioração progressiva da função tecidual, com modificações que tendem a diminuir a capacidade de resposta adaptativa do tecido, culminando no aumento da suscetibilidade para desordens, que incluem diminuição da capacidade proliferativa das células da pele, diminuição da síntese de matriz extracelular na derme e aumento da expressão de enzimas que degradam a matriz extracelular (Jenkins, 2002; Mine et al., 2008; Zouboulis e Makrantonaki, 2011; Raut et al., 2012).

O envelhecimento cutâneo extrínseco está relacionado a fatores que estão intimamente associados com a qualidade de vida, com a capacidade do indivíduo de se adaptar aos desafios impostos pelas condições ambientais e aos mecanismos de resposta ao estresse. Os principais fatores extrínsecos envolvidos no envelhecimento cutâneo são a exposição crônica ao sol, consumo excessivo de álcool, tabagismo e fatores nutricionais. Dentre tais fatores a exposição ao sol é o que apresenta efeito deletério mais proeminente, sendo que a maior parte do envelhecimento extrínseco da pele ocorre devido à exposição solar crônica e este tipo de envelhecimento é denominado de fotoenvelhecimento (Baumann, 2007; Tigges et al., 2014; Zeng et al., 2014).

Alterações na pele envelhecida, tanto intrinsecamente quanto extrinsecamente, são resultado de mudanças morfológicas que comprometem a estrutura e função deste órgão, de modo que as alterações clínicas, fisiológicas e histológicas que ocorrem na pele afetam a taxa de renovação da epiderme, depuração de substâncias químicas da derme, espessura e densidade celular da derme, termorregulação, taxa de re-epitelização após cicatrização, proteção mecânica, resposta imune, percepção sensorial, e há um declínio progressivo na resposta dos queratinócitos e fibroblastos a fatores de crescimento com diminuição da sua capacidade proliferativa (Gilchrest, 1996; Bailey et al., 1998).

A pele envelhecida intrinsecamente é caracterizada principalmente por rugas finas, clareamento da pele, flacidez, ressecamento, afinamento da epiderme, achatamento da junção dermo-epidérmica, diminuição da atividade mitótica, redução da espessura da derme e diminuição dos fibroblastos; atrofia da matriz extracelular; redução e desintegração do colágeno e de fibras elásticas; deposição de substâncias exógenas; redução da microvasculatura cutânea; redução das terminações nervosas; e diminuição do número de glândulas sebáceas e sudoríparas (Gilchrest, 1996; Zouboulis e Makrantonaki, 2011).

As alterações observadas na pele envelhecida extrinsecamente resultam da sobreposição dos danos causados por fatores ambientais ao envelhecimento intrínseco. As principais características deste tipo de envelhecimento consistem em manchas, pele áspera, telangiectasia, rugas finas, elastose solar, ceratose actínica, distribuição esparsa das fibras de colágeno, aumento da degradação de colágeno, aumento dos níveis de disfunção de glicosaminoglicanos e proteoglicanos, redução

das fibrilas de ancoragem, diminuição da proliferação, diferenciação, descamação e apoptose de queratinócitos e espessamento da epiderme (Yaar e Gilchrest, 1998; Zouboulis e Makrantonaki, 2011; Raut et al.; 2012).

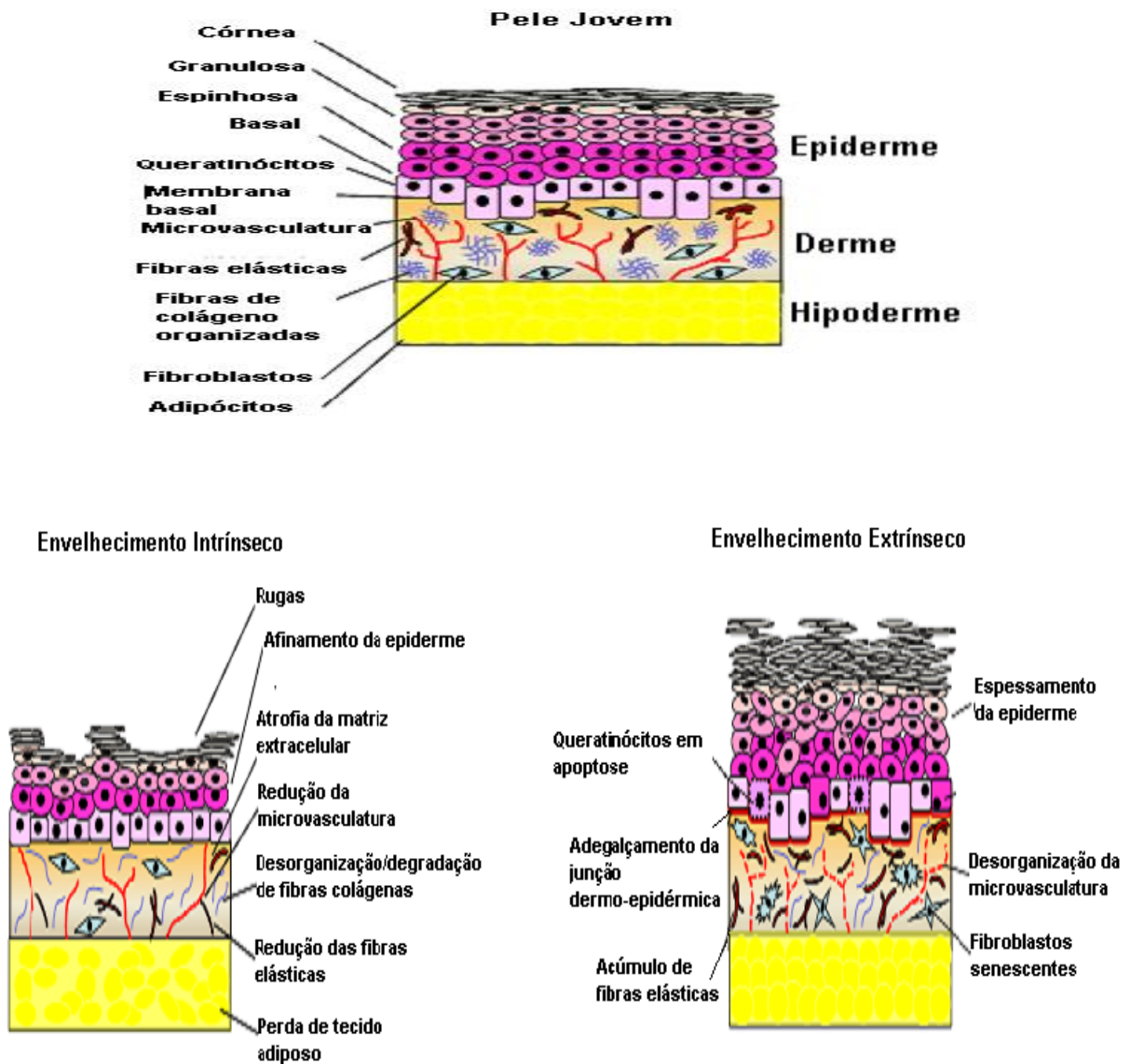


Figura 1. Características morfológicas da pele jovem, da pele envelhecida intrinsecamente e da pele envelhecida extrinsecamente.

Extraído de Mancini e colaboradores (2014).

Mudanças qualitativas e quantitativas em proteínas estruturais da derme apresentam-se como um mecanismo de ação central em ambos os tipos de envelhecimento cutâneo. Os fibroblastos da derme envelhecida apresentam redução

em sua capacidade biossintética, e há evidências de degradação dos componentes fibrosos da matriz extracelular, que incluem a elastina, fibras oxitalânicas e colágeno do tipo I, III e IV. Além disso, há perda da fração de oligossacarídeos que exerce impacto sobre a capacidade de retenção hídrica da pele (El-Domyati et al., 2002; Jenkins, 2002; Naylor et al., 2011).

A quantidade de colágeno do tipo I, o principal tipo de colágeno da matriz e um marcador para a síntese de colágeno, é 68% menor na pele de idosos do que na pele de jovens, e esta diminuição é acompanhada por alterações na organização e estrutura desta proteína. Alterações também são observadas na morfologia e na quantidade de fibras elásticas da pele de indivíduos de idades diferentes. A alta longevidade dessas moléculas, quando comparadas com proteínas intracelulares, expõe suas estruturas a um dano cumulativo que, por sua vez, exerce um impacto na sua habilidade de conferir tanto propriedades mecânicas quanto de mediar a homeostase tecidual (Gilchrest, 1996; Bailey et al., 1998; Uitto e Bernstein, 1998; El-Domyati et al., 2002; Varani et al., 2006; Mine et al., 2008; Hwang et al., 2011; Rittié e Fisher, 2015).

Há um desequilíbrio entre a síntese e degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) na pele envelhecida. A fragmentação do colágeno da MEC na derme altera a homeostase do colágeno por influenciar na função de fibroblastos dérmicos, células de meia-vida longa que estão submetidas ao acúmulo de danos promovidos por fatores relacionados ao envelhecimento. Na pele de jovens (20 a 30 anos), as fibras de colágeno intactas são abundantes e organizadas. Em contraste, na pele envelhecida (> 80 anos), as fibras de colágeno são fragmentadas e desorganizadas (Uitto e Bernstein, 1998; Quan et al., 2013; Tigges et al., 2014).

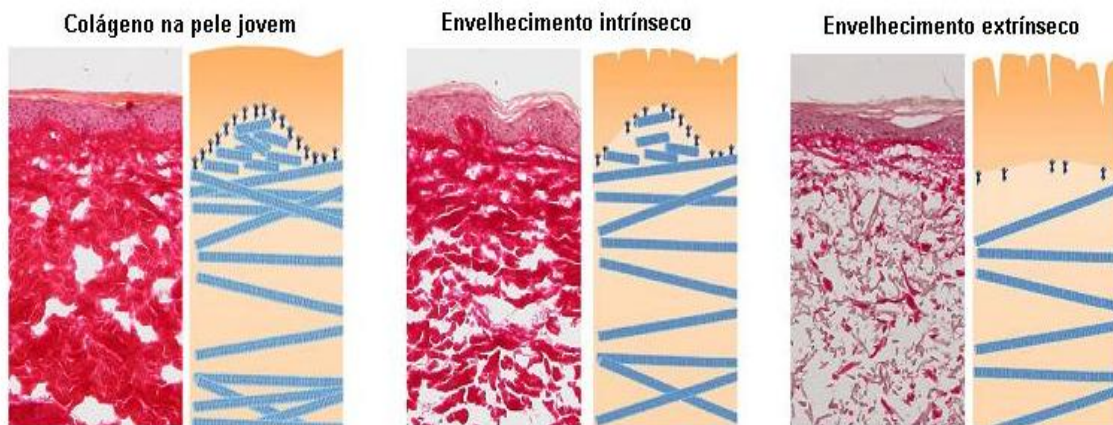


Figura 2. Diferença do conteúdo de colágeno na pele jovem, na pele envelhecida intrinsecamente e na pele envelhecida extrinsecamente.

Extraído de Naylor e colaboradores (2011).

Os danos observados nas proteínas estruturais da derme resultam principalmente da ação de metaloproteinases de matriz (MMP), que são produzidas em maior quantidade por fibroblastos de pessoas idosas do que por fibroblastos de pessoas jovens (Mine et al., 2008; Fisher et al., 2009). As MMP estão envolvidas em diversos processos fisiológicos da pele como apoptose, angiogênese, cicatrização e inativação de citocinas (Sárdy, 2009). Estas enzimas são subdivididas em grupos de acordo com a sua especificidade para determinado substrato, sendo classificadas como colagenases, gelatinases, estromelisinases e metaloproteinases de membrana (Clark et al., 2008). Na pele humana, a MMP-1 (colagenase) é a principal protease capaz de iniciar a fragmentação das fibras de colágeno fibrilar, predominantemente o tipo I e III, sua ação aliada à ação das gelatinases, MMP-2 e MMP-9, e da estromelisinase, MMP-3, é capaz de degradar completamente o colágeno e fibras elásticas. O acúmulo de colágeno fragmentado induzido pela ação das metaloproteinases contribui de forma significativa para o fenótipo da pele humana envelhecida (Jenkins, 2002; Fisher et al., 2009).

Em condições fisiológicas, a expressão das metaloproteinases é baixa e regulada para manter a homeostase da matriz extracelular, porém o aumento da atividade destas enzimas é responsável por provocar a desorganização estrutural da matriz extracelular na pele envelhecida (Sárdy, 2009; Bartling et al., 2014; Quan e Fisher, 2015). Aliado ao aumento da atividade das MMP está a diminuição da produção de seus inibidores, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), o

que contribui para a desregulação crônica da síntese e degradação de componentes da matriz extracelular, que se constitui como a maior característica do envelhecimento cutâneo (Fisher et al., 2009; Sárdy, 2009).

1.2. Estresse oxidativo e envelhecimento cutâneo

O estresse oxidativo, definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e sua eliminação, atua como elemento chave no processo de envelhecimento. Os processos químicos e biológicos básicos envolvidos no envelhecimento podem ser explicados, em parte, pela teoria do estresse oxidativo, que propõe que a reação de espécies reativas de oxigênio, geradas tanto fisiologicamente quanto pela exposição a agentes exógenos, com constituintes celulares inicia as mudanças associadas ao envelhecimento e é determinante para a longevidade máxima dos indivíduos (Harman, 1955; Pamplona, 2008).

ERO possuem meia-vida curta e são constantemente geradas em baixos níveis pelo metabolismo aeróbico. Os aumentos dos níveis de ERO associados à idade estão relacionados ao aumento da sua produção devido à disfunção mitocondrial, inativação de sistemas antioxidantes e exposição à radiação ionizante, radiação ultravioleta (UV) e a xenobióticos (Bickers e Athar, 2006). ERO de importância para os organismos vivos são o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), o peroxil ($\text{RO}_2\cdot$), o peroxinitrito (ONOO), o ácido hipocloroso (HOCl), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Os processos de degeneração promovidos por esses agentes na derme são associados com a diminuição da capacidade de fibroblastos dérmicos responderem ao estresse, que em conjunto com as interações com a matriz extracelular contribuem de forma significativa para o fenômeno do envelhecimento cutâneo (Aruoma, 1998; Fisher et al., 2002; Tigges et al., 2014).

O estresse foto-oxidativo, ocasionado pela exposição à radiação UV, é um dos principais determinantes exógenos do envelhecimento da pele humana, atuando na iniciação e direcionamento de eventos de sinalização que levam a respostas celulares após a exposição (Fisher et al., 2002; Tigges et al., 2014). Na superfície da

pele irradiada, a energia da luz UV é absorvida por cromóforos endógenos, como o NADP⁺/NADPH, triptofano, riboflavina e ácido urocânico. A energia absorvida por estes cromóforos é transferida para o oxigênio molecular, que é convertido em ânion radical superóxido, que por sua vez pode ser convertido pela enzima superóxido dismutase a H₂O₂ que, na presença de metais de transição como o ferro e o cobre, é convertido ao radical hidroxila, altamente reativo, sendo este o mecanismo de produção de diversos produtos de oxidação e espécies reativas de oxigênio (Masaki, 2010; Rittié e Fisher, 2015).

O aumento dos níveis intracelulares de espécies reativas possui dois efeitos potencialmente importantes, os danos a vários componentes celulares e o desencadeamento e ativação de vias de sinalização específicas. Ambos os efeitos podem influenciar diversos processos celulares relacionados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças relacionadas à idade (Finkel e Holbrook, 2000).

Espécies reativas do oxigênio ativam vias de transdução de sinal citoplasmáticas nos fibroblastos que estão relacionadas ao crescimento, diferenciação, senescência e degradação do tecido conectivo (Fisher et al., 2002). As ERO geradas fotoquimicamente oxidam e inibem fosfatases específicas da tirosina-quinase, aumentando o nível de fosforilação de receptores. Entre as principais vias de sinalização ativadas em resposta ao desequilíbrio redox estão a da quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), quinase c-Jun amino terminal (JNK) e a cascata de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK). Um efeito comum da ativação dessas vias é a mudança no padrão de expressão gênica mediado pela modulação da atividade de fatores de transcrição. A ativação de quinases induz a expressão e ativação do complexo de transcrição nuclear AP-1, composto pelas proteínas c-Jun e c-Fos. A transcrição do AP-1 pode ser induzida mesmo por pequenas doses, sub-eritematosas, de UVB (Finkel e Holbrook, 2000; Rittié e Fisher, 2015).

AP-1 regula a expressão de diversos genes envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular. A transcrição de diversos membros da família das metaloproteinases de matriz (MMP) é fortemente regulada pelo AP-1. As MMP são uma ampla família de endoproteases dependentes de zinco, cujos substratos são componentes da matriz extracelular. Estas enzimas são produzidas pelas células como zimogênios inativos (pró-enzimas) e a clivagem proteolítica do seu pró-

domínio resulta na expressão da sua atividade catalítica. A atividade das MMP pode ser regulada em três níveis distintos, na síntese (transcrição), na ativação do zimogênio e na inibição da atividade proteolítica por proteínas inibitórias específicas denominadas de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP). Diversas MMP são reguladas positivamente pelo AP-1, incluindo a MMP-1 (colagenase), que inicia a degradação dos colágenos fibrilares do tipo I e III, MMP-9 (gelatinase), que degradam os fragmentos de colágeno gerados pelas colagenases, e MMP-3 (estromelina), que degrada o colágeno do tipo IV da membrana basal e ativa a pró-MMP-1 (Fisher et al., 2002).

Um aumento do fator de transcrição AP-1 é observado na pele de idosos quando comparado com a pele de indivíduos jovens, com consequente aumento da expressão das metaloproteinases. Em paralelo, é observada a redução da expressão de inibidores das MMP. Aumento da transcrição do AP-1 e da sua atividade também interfere na síntese dos principais tipos de colágeno da derme, os colágenos do tipo I e III, por bloqueio dos efeitos do TGF- β , citocina que está envolvida em processos celulares como proliferação, diferenciação, desenvolvimento, homeostase e reparo de diversos tecidos. O TGF- β aumenta a transcrição gênica de componentes da matriz extracelular e regula negativamente a expressão de enzimas que degradam esta matriz. Os efeitos do TGF- β são mediados pela ativação das proteínas de sinalização intracelular SMAD2 e SMAD3, e são antagonizados pela sinalização intracelular da proteína SMAD7. A radiação UV induz a expressão de SMAD7 na pele humana, interferindo com a sinalização do TGF- β /SMAD2-3, o que desencadeia a proliferação de queratinócitos, com consequente hiperplasia epidermal, e diminui a produção do pró-colágeno do tipo I, levando, assim, à perda de colágeno. O AP-1 também diminui o nível de receptores do TGF- β , inibindo ainda mais a transcrição de colágeno (Massagué, 1998; Verrecchia et al., 2001; Fisher et al., 2002; Yaar e Gilchrist, 2007).

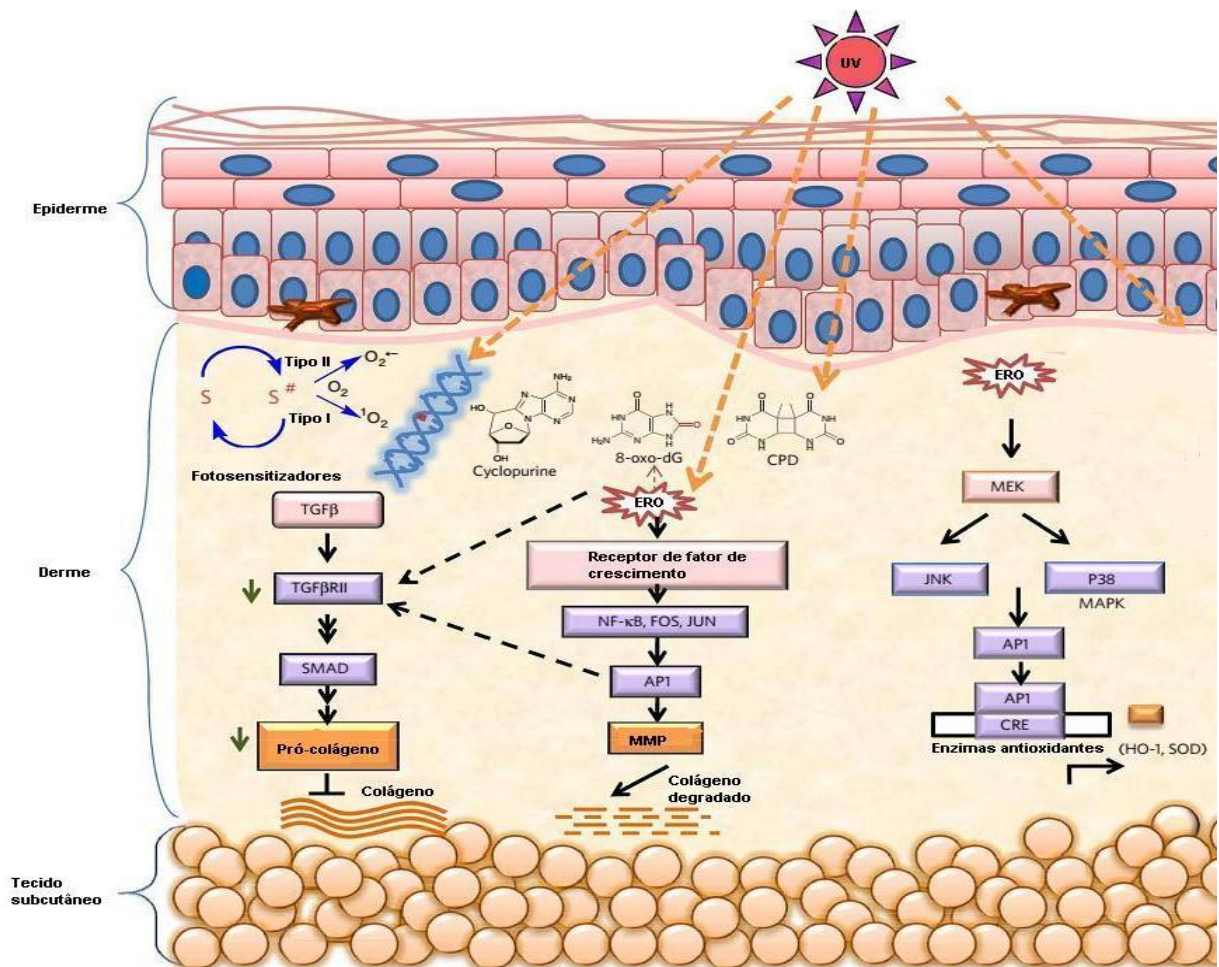


Figura 3. Mecanismos bioquímicos envolvidos no fotoenvelhecimento da pele.

A interação da luz ultravioleta com fotossensibilizadores na pele, como as porfirinas, melanina, nicotinamida e flavinas, resultam no acúmulo de ERO. Estas, por sua vez, modulam cascatas de sinalização, levando à diminuição da síntese de colágeno e aumento da produção de enzimas que degradam esta proteína. Extraído de Natarajan e colaboradores (2014).

A pele é equipada com seu próprio arsenal de moléculas de defesa contra o estresse oxidativo. As moléculas antioxidantes da pele interagem com as ERO ou seus subprodutos para eliminá-los ou minimizar seus efeitos deletérios (Kohen e Gati, 2000). O sistema antioxidante da pele consiste de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Entre os antioxidantes enzimáticos, as enzimas glutationa peroxidase, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) desempenham um papel fundamental. Antioxidantes não-enzimáticos presentes nas células são o α -tocoferol, a ubiquinona, o β -caroteno, o ascorbato e a glutationa (Finkel e Holbrook, 2000; Briganti e Picardo, 2003; Bickers e Athar, 2006).

As espécies reativas de oxigênio geradas nos fibroblastos são rapidamente removidas pelos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos para manutenção do

equilíbrio redox intracelular, resultando assim na homeostase da célula e do tecido. Contudo, a exposição da pele a fatores que aumentam o estresse oxidativo, e provocam danos a proteínas, ao DNA e a outras macromoléculas, faz com que estes se acumulem durante toda a vida dos organismos aeróbios e seja capaz de exceder a capacidade antioxidante da pele (Svobodová et al., 2003; Bickers e Athar, 2006). Assim, faz-se necessária a utilização de abordagens que auxiliem a pele no combate aos danos provocados pelas espécies reativas do oxigênio.

1.3. Produtos naturais antienvelhecimento

Produtos naturais representam uma fonte rica de compostos biologicamente ativos que apresentam diversidade molecular com potencial reconhecido para o desenvolvimento de cosméticos e cosmeceúticos (Barroso et al., 2014). A aplicação destes compostos no desenvolvimento de produtos antienvelhecimento tem sido amplamente estudada, com destaque para os produtos que apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, indutora da síntese de colágeno ou inibitória das MMP (Chiang et al., 2012).

Atividades biológicas diversas já foram atribuídas a produtos naturais isolados de plantas, e estes são explorados como agentes capazes de atuar contra o envelhecimento extrínseco (Bae et al., 2008; Chiang et al., 2011). Estudos em animais mostraram a eficácia dos antioxidantes como o α -tocoferol, ascorbato e β -caroteno na inibição de reações induzidas na pele pela radiação UV ou outros estímulos que desencadeiam a apoptose, peroxidação lipídica, formação de produtos de oxidação do DNA e imunossupressão (Briganti e Picardo, 2003).

Ensaio *in vitro* que avaliaram a ação de produtos naturais sobre fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação UVB mostraram que estes são capazes de inibir de forma significativa a expressão e atividade de metaloproteinases de matriz, como a MMP-1, MMP-3 e MMP-9, e de inibir a fosforilação de mensageiros secundários que participam de vias de sinalização intracelular envolvidas na produção dessas enzimas. Outras atividades atribuídas aos produtos naturais neste tipo de célula são a diminuição do estresse oxidativo, a diminuição da produção de mediadores da inflamação, o aumento na produção de pró-colágeno do tipo I e o

aumento da viabilidade celular (Bae et al., 2008; Choi et al., 2010; Wen et al., 2010; Chiang et al., 2011).

Parte dos efeitos apresentados por produtos naturais em cultura de células é atribuída à sua ação antioxidante, e é este tipo de atividade biológica que é encontrada na maioria dos produtos naturais utilizados em formulações cosméticas (Singh e Agarwal, 2009; Cronin e Draelos, 2010).

Os polifenóis constituem-se como um grupo de substâncias que podem atuar como agentes quimiopreventivos em diversas desordens da pele, pois apresentam atividade anti-inflamatória, imunomodulatória e propriedades antioxidantes (Nichols e Katiyar, 2010).

Uma das características químicas dos polifenóis, que contribui para a sua atividade antioxidante, é a habilidade que estes compostos têm de quelar íons metálicos como o Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} . Esta habilidade é relevante no sentido de limitar a atividade de enzimas cujas reações dependem de íons metálicos como co-fatores, especialmente as metaloproteinases de matriz, enzimas cuja atividade é dependente de zinco. Compostos fenólicos têm mostrado papel significativo na atividade destas enzimas, seja pelo sequestro de íons metálicos ou pelo seu efeito na expressão de inibidores teciduais endógenos de metaloproteinases (TIMP), especialmente TIMP-1 e TIMP-2. Os polifenóis são capazes de inibir a ação das enzimas colagenase e elastase e, assim, podem contribuir para a redução de modificações na pele provocadas por enzimas envolvidas na remodelação do tecido conjuntivo (Aslam et al., 2006; Thring et al., 2009; Chiang et al., 2012; Ratz-Lyko et al., 2015).

Há diversos estudos que mostram que compostos naturais protegem a pele de danos induzidos por radiação UV e podem aumentar a biossíntese de colágeno através da modificação de sinais relacionados à síntese desta proteína, além de atuar nas vias envolvidas na produção de MMP e inibir o fotoenvelhecimento através da prevenção da produção destas enzimas (Baumann, 2007; Choi et al., 2007).

Em modelos animais, a aplicação tópica ou a suplementação oral com polifenóis diminuíram a rugosidade e flacidez induzida pela radiação UVA, atenuaram o eritema induzido pela radiação UVB e inibiram a oxidação de proteínas da derme induzidas por esta radiação (Kohl et al., 2011). Além disso, Vayalil e

colaboradores (2004) mostraram que os polifenóis diminuem a expressão de metaloproteinases *in vitro* e *in vivo*.

Assim, a busca de novos compostos que apresentam atividade antioxidante pode levar à descoberta de substâncias úteis no tratamento ou prevenção do fotoenvelhecimento (Barroso et al., 2014). Entre as fontes de produtos naturais, os microrganismos endofíticos representam uma importante alternativa para produção de metabólitos biologicamente ativos, e dentre tais microrganismos os fungos apresentam-se como os produtores mais prolíficos de metabólitos secundários (Gunatilaka, 2006).

Os fungos endofíticos são um grupo diverso de microrganismos que podem se desenvolver de forma assintomática nos espaços intercelular ou intracelular dos tecidos de plantas, e estabelecem uma associação simbiótica em que a planta hospedeira protege e nutre o endófito e este, em contrapartida, produz metabólitos bioativos para melhorar o crescimento e proteger a planta hospedeira do ataque de patógenos (Tan e Zou, 2001; Gunatilaka, 2006; Kusari et al., 2012).

Neste contexto, a bioprospecção de fungos endofíticos apresenta-se promissora devido à capacidade que estes possuem de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários que variam amplamente quanto à sua classe química e quanto à sua complexidade, tendo sido demonstrada a produção de alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides, peptídeos e polifenóis por estes microrganismos (Tan e Zou, 2001; Strobel, 2014).

Estudos mostram que fungos endofíticos são capazes de produzir compostos que apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória (Huang et al., 2007; Tianpanich et al., 2010; de Barros et al., 2011). A avaliação de extratos produzidos por fungos endofíticos isolados de 29 espécies de plantas medicinais da China mostrou que estes apresentam atividade antioxidante pronunciada, que foi atribuída à presença de polifenóis e de compostos como o ácido clorogênico, quercetina-3-rutonosídeo, quercetina-3-ramnosídeo e antraquinona (Huang et al., 2007). O extrato metanólico do fungo endofítico *Rhizoctonia* sp., isolado da semente de *Schinus terebinthi folius*, apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica em modelos animais (de Barros et al., 2011).

O fungo endofítico *Fusarium oxysporum*, isolado do rizoma de *Curcuma amada*, mostrou-se capaz de produzir o metabólito 2,3-pentanodiol, o qual apresenta

atividade antioxidante e é capaz de reduzir a concentração intracelular de espécies reativas do oxigênio em *Caenorhabditis elegans*, além de aumentar o tempo de vida destes nematóides, que são utilizados como modelos experimentais em estudos sobre o envelhecimento (Klass, 1977; Tiwari et al., 2014).

A produção do ácido cajaninstilbeno, um estilbeno que apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e analgésica, foi demonstrada em estudo realizado com um fungo endofítico isolado de *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (Zhao et al., 2012). A capacidade de produção de compostos com atividade antioxidante também foi demonstrada em estudos realizados com fungos endofíticos isolados da planta *Emblica officinalis*; com o fungo endofítico *Xylaria* sp., isolado de *Ginko biloba*; e com o fungo endofítico *A. fumigates*, isolado da raiz de *Pigeon pea*, sendo que o extrato deste último foi capaz de estimular a atividade de enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione redutase (GR) (Liu et al., 2009; Nath et al., 2012; Zhao et al., 2014).

C. globosum, fungo endofítico extraído de *Ginko biloba*, foi capaz de produzir a flavipina, que é capaz de aumentar a expressão da SOD e da glutathione peroxidase (GSH-Px) e de diminuir a concentração de malondialdeído no plasma e no fígado de camundongos envelhecidos. Além disso, o ensaio do DDPH· mostrou que flavipina produzida por fungos endofíticos apresentava atividade antioxidante pronunciada quando comparada com os controles butilhidroxitolueno (BHT) e Trolox (Ye et al., 2013).

Estes estudos demonstram que os fungos endofíticos podem ser explorados como fonte de compostos com atividade antioxidante, e a vantagem da utilização de tais microrganismos consiste na possibilidade de cultivá-los em cultura líquida submersa, onde mudanças diretas nas condições de cultura podem ser exploradas como um método de otimização de várias vias biossintéticas que levam à produção de derivados e análogos de compostos biologicamente ativos novos (Strobel et al., 2004; Kaul et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência exercida por extratos produzidos por dois fungos endofíticos na expressão gênica do colágeno do tipo I, MMP-1 e TIMP-1, e sua ação sobre a atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante e de metaloproteinases em fibroblastos dérmicos humanos.

2.2. Objetivos Específicos

- Obtenção dos extratos por cultivo dos fungos em cultura líquida submersa.
- Avaliação do teor de polifenóis e flavonóides dos extratos produzidos.
- Avaliação da atividade antioxidante dos extratos.
- Avaliação da viabilidade celular dos fibroblastos tratados com os extratos.
- Avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase das culturas de fibroblastos tratados com os extratos e submetidos ao estresse oxidativo.
- Quantificação da expressão gênica da metaloproteinase de matriz 1, TIMP-1 e colágeno do tipo I em fibroblastos submetidos ao estresse oxidativo, tratados ou não com os extratos, por RT-qPCR.
- Avaliação da atividade de metaloproteinases das culturas de fibroblastos submetidos ao estresse oxidativo, tratados ou não com os extratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção dos fungos e cultivo em cultura líquida submersa

Foram utilizados neste estudo dois fungos endofíticos, ambos do gênero *Phomopsis* sp., previamente isolados de folhas da planta *Bauhinia variegata* (Mesquita, 2012). Os fungos foram mantidos em estoque por repiques periódicos dos mesmos em ágar Sabouraud dextrose e armazenamento a 4°C, após período de incubação de 7 dias a 28°C. Para a produção de extratos, os fungos em estoque foram repicados em tubos de ensaio contendo meio inclinado de ágar Sabouraud dextrose (*slants*) e incubados por 7 dias a 28°C. Após este período de incubação, a massa micelial e esporos dos fungos produzidos em 5 *slants* foram inoculados em um Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio pré-fermentativo descrito por Jackson e colaboradores (1993) e incubado por 48 h com agitação orbital de 150 rpm, a 28°C. Após este período de incubação, a cultura resultante foi transferida para um Erlenmeyer de 2000 mL de capacidade contendo 1000 mL de meio fermentativo (Jackson et al., 1993) e incubado em condições semelhantes de agitação e temperatura pelo período de 72 h.

3.2. Produção dos extratos brutos

Após o cultivo dos fungos em cultura líquida submersa, o meio de cultura resultante foi submetido à filtração sob vácuo para separar a massa micelial produzida do fluido de cultura. A massa dos micélios foi pesada em balança de precisão e o fluido de cultura foi submetido à extração por partição líquido-líquido com acetato de etila. A fração orgânica obtida foi submetida à evaporação sob vácuo em evaporador rotativo, a 40°C, para eliminação do solvente orgânico e obtenção dos extratos brutos secos, os quais foram solubilizados em um volume específico de metanol e utilizados nos experimentos seguintes.

3.3. Avaliação do teor de polifenóis totais nos extratos

A quantificação de polifenóis totais nos extratos produzidos foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu, como descrito previamente (Singleton e Rossi, 1965). Neste ensaio, 100 μL de solução metanólica de extrato (1 mg.mL^{-1}) foram adicionados a 250 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 250 μL de solução aquosa de carbonato de sódio a 10%, e o volume final do meio reacional foi completado para 2,5 mL com água destilada. O meio reacional foi agitado em vórtex e incubado à temperatura ambiente por 60 minutos. Após o período de incubação foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 760 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico por massa de extrato ($\mu\text{g EAG.mg de extrato}^{-1}$).

3.4. Avaliação do teor de flavonóides totais nos extratos

A quantificação de flavonóides foi realizada através do método do cloreto de alumínio, de acordo com o descrito por Chang e colaboradores (2002). Neste ensaio, 300 μL de solução metanólica de extrato (4 mg.mL^{-1}) foram adicionadas a 500 μL de solução metanólica de AlCl_3 a 5%, e o volume final do meio de reação foi completado para 2,5 mL com metanol. O meio reacional foi agitado em vórtex e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período de incubação foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 425 nm. A quercetina foi utilizada como padrão e os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina por massa de extrato ($\mu\text{g EQ.mg de extrato}^{-1}$).

3.5. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos pelo método do DPPH·

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada através do método do sequestro do radical estável DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com o método descrito por Chiang e colaboradores (2012). Neste ensaio foram utilizadas 12 diferentes concentrações dos extratos, entre $20.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $9,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$. 100

μL de cada diluição da solução metanólica dos extratos e 100 μL de solução metanólica do radical estável DPPH \cdot a 200 μM foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos na ausência de luz. A absorbância foi medida em leitor de microplacas (Beckman DTX 800) ajustado no comprimento de onda de 492 nm. O ácido ascórbico, a quercetina e o butilhidroxitolueno (BHT) foram utilizados como padrões. A porcentagem de redução do radical estável DPPH \cdot foi calculada e os resultados foram expressos pelo valor do IC_{50} .

3.6. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos

A viabilidade celular de fibroblastos tratados com extratos foi avaliada através do ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio], descrito por Mosmann (1993). Fibroblastos dérmicos humanos foram inoculados na concentração de 1×10^5 células em cada poço de uma placa de 96 poços. O tratamento dos fibroblastos foi realizado com soluções dos extratos de dois fungos endofíticos em diferentes concentrações, variando de 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após incubação por 72 h em atmosfera de 5% de CO_2 , umidade de 95% e temperatura de 37°C, o meio com tratamento foi removido e foram adicionados 100 μL de DMEM e 10 μL de solução de MTT (5 mg.mL^{-1}) em cada poço. A placa foi incubada por 4 horas e, posteriormente, foram adicionados 100 μL de solução ácida de isopropanol (HCl 0,04M em isopropanol) e a placa foi mantida em agitação circular por 15 minutos para dissolução dos cristais de formazan produzidos. A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas (Beckman DTX 800).

3.7. Cultura de fibroblastos dérmicos humanos

Fibroblastos dérmicos humanos foram cultivados em placas para cultura de células (Corning®) de 100 x 20 mm, com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina. As placas com as células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 95% e temperatura de 37°C.

3.8. Ensaio de avaliação da peroxidação lipídica

A capacidade do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) induzir a peroxidação lipídica nos fibroblastos foi avaliada de acordo com o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979). Fibroblastos foram inoculados na concentração de 3 x 10⁵ células em cada poço de uma placa de 6 poços, que foi incubada por 24 h para permitir a adesão celular. Posteriormente, foi realizado tratamento com H₂O₂ por 1h nas concentrações de 300 µM, 500 µM ou 1000 µM. Ao término do período de tratamento o meio de cultura contendo H₂O₂ foi removido e os poços foram lavados com PBS. A seguir, 1 mL de KCl 1,15% foi adicionado aos poços, as células foram recolhidas e submetidas a ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 0°C para obtenção do lisado celular. O lisado foi submetido ao ensaio de quantificação de proteínas e o volume necessário para obtenção do equivalente a 40 µg de proteínas foi adicionado a 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS), 750 µL de ácido acético 20%, 750 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA), e o volume de reação foi completado para 4mL com água deionizada. O meio reacional foi incubado por 1h em estufa a 95°C e, após este período, a reação foi resfriada em banho de água gelada. As amostras foram então submetidas à extração por partição líquido-líquido com o solvente 1-butanol e centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm. A fluorescência do sobrenadante foi medida em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação de 520 nm e emissão de 550 nm. O 1,1,3,3-tetrahidroxipropano (Sigma-Aldrich) foi utilizado na construção da curva padrão e os resultados foram expressos como nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg de proteína.

3.9. Tratamento das culturas de fibroblastos com metabólitos dos fungos endofíticos

Os fibroblastos cultivados foram tratados com diferentes concentrações dos extratos dos fungos endofíticos I e II, ou com 0,1% de metanol, veículo de diluição dos extratos, e foram submetidos ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com H₂O₂ na concentração de 300 µM, para os diferentes ensaios como descrito a seguir.

3.9.1. Tratamento das culturas de fibroblastos expostos ao estresse oxidativo para o ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase

Fibroblastos foram inoculados na concentração de 3×10^5 células em cada poço de uma placa de 6 poços, que foi incubada por 24 h para permitir a adesão celular. As células foram tratadas por 48h com extrato. As concentrações dos extratos do fungo I utilizadas no tratamento foram 2,5 µg.mL⁻¹; 5 µg.mL⁻¹ e 10 µg.mL⁻¹, e as concentrações do extrato do fungo II foram 25 µg.mL⁻¹; 50 µg.mL⁻¹ e 100 µg.mL⁻¹. A indução do estresse oxidativo foi obtida através do tratamento por 1 hora com H₂O₂ na concentração de 300 µM em meio DMEM sem SFB. Após este período, o meio com H₂O₂ foi removido e as placas foram lavadas com PBS; 2 mL de meio DMEM com SFB foram adicionados às placas e estas foram incubadas por 48 h em atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 95% e temperatura de 37°C. Ao término deste período, as células foram recolhidas para o ensaio de avaliação da atividade da enzima catalase.

3.9.2. Tratamento das culturas de fibroblastos expostos ao estresse oxidativo para o ensaio de RT-qPCR

O tratamento das células com os extratos dos fungos foi realizado em placas de cultura de 100 x 20 mm com 80 a 90% de confluência. As células foram tratadas por 48h com um dos extratos. As concentrações dos extratos do fungo I utilizadas no tratamento foram 2,5 µg.mL⁻¹; 5 µg.mL⁻¹ e 10 µg.mL⁻¹, e as concentrações do extrato do fungo II foram 25 µg.mL⁻¹; 50 µg.mL⁻¹ e 100 µg.mL⁻¹. Após 48 h, o meio com tratamento foi removido e as placas foram lavadas com 5 mL de PBS. A indução do estresse oxidativo foi realizada pelo tratamento das células com H₂O₂ na

concentração de 300 μM em meio DMEM sem SFB por 1 hora. Após este período, o meio contendo H_2O_2 foi removido e as placas foram lavadas com 5 mL de PBS. 10 mL de meio DMEM com SFB foram adicionados às placas e estas foram incubadas por 48 h em atmosfera de 5% de CO_2 , umidade de 95% e temperatura de 37°C. Ao término deste período, as células foram recolhidas para extração do RNA total.

3.9.3. Tratamento das culturas de fibroblastos expostos ao estresse oxidativo para avaliação da atividade de metaloproteinase e superóxido dismutase.

O tratamento das células com os extratos dos fungos foi realizado em placas de cultura de 100 x 20 mm com 80 a 90% de confluência. As células foram tratadas por 48h com um dos extratos. As concentrações dos extratos utilizadas no tratamento foram 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o fungo I, e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o fungo II. O controle consistiu de células tratadas com 0,1% de metanol, veículo de diluição dos extratos. Posteriormente, o meio com tratamento foi removido e as placas foram lavadas com 5 mL de PBS. A indução do estresse oxidativo foi conseguida por tratamento das células com H_2O_2 na concentração de 300 μM em meio DMEM sem SFB por 1 hora. Após este período, o meio com H_2O_2 foi removido e as placas foram lavadas com 5 mL de PBS. 10 mL de meio DMEM sem SFB foram adicionados às placas e estas foram incubadas por 48h em atmosfera de 5% de CO_2 , umidade de 95% e temperatura de 37°C. Ao término deste período, o meio de cultura foi recolhido para avaliação da atividade de metaloproteinases de matriz pelo ensaio de zimografia, e as células foram recolhidas para o ensaio de atividade da enzima superóxido dismutase.

3.10. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase

A avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), responsável por converter o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), foi realizada pelo método bioquímico que utiliza o sistema xantina/xantina oxidase como fonte de $\text{O}_2^{\cdot-}$. A redução do reagente *Nitroblue Tetrazolium* (NBT), com a consequente formação de cristais de formazan, foi

utilizada para medir a formação do ânion radical superóxido. A enzima SOD compete com o NBT pelo $O_2^{\cdot-}$, desta forma, a quantidade de SOD presente na amostra é medida pela porcentagem de inibição da redução do NBT.

Fibroblastos dérmicos humanos tratados como descrito anteriormente, foram recolhidos e submetidos a três ciclos de congelamento a $-80^{\circ}C$ e descongelamento a $0^{\circ}C$ para obtenção do lisado celular. A concentração de proteínas das amostras foi medida pelo ensaio descrito por Lowry e colaboradores (1951).

Uma solução de NBT na concentração de $60 \mu M$ e xantina na concentração de $100 \mu M$ foi preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM , pH 7,8, contendo $0,1 \text{ mM}$ de EDTA. Quantidade de amostra do lisado celular correspondente a $100 \mu g$ de proteína foi adicionada a $700 \mu L$ da solução de NBT $60 \mu M$ e xantina $100 \mu M$. O volume foi completado para $950 \mu L$ com tampão fosfato de potássio. A enzima xantina oxidase ($0,075 \text{ U.mL}^{-1}$) foi adicionada às amostras no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro, que foi realizada no modo cinético, por 5 minutos, no comprimento de onda de 560 nm .

3.11. Avaliação da atividade da enzima catalase

A conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular pela enzima catalase foi medida por acompanhamento da diminuição da absorbância do H_2O_2 no comprimento de onda de 240 nm (Aebi, 1984).

Fibroblastos dérmicos humanos tratados como descrito anteriormente, foram recolhidos e submetidos a três ciclos de congelamento a $-80^{\circ}C$ e descongelamento a $0^{\circ}C$ para obtenção do lisado celular. A concentração de proteínas das amostras foi medida pelo ensaio descrito por Lowry e colaboradores (1951). Uma solução 10 mM de H_2O_2 foi preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM , pH 7. Quantidade de amostra correspondente a $100 \mu g$ de proteína foi adicionada à solução de H_2O_2 no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro, que foi realizada no modo cinético, por 2 minutos, no comprimento de onda de 240 nm .

3.12. Quantificação da expressão gênica de colágeno, metaloproteinase de matriz e inibidor tecidual de metaloproteinase nos fibroblastos tratados com extratos por RT-qPCR.

3.12.1. Extração de RNA

A extração do RNA total das amostras de fibroblastos foi realizada utilizando o reagente TRIzol[®] (*Invitrogen*), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após o tratamento das culturas de fibroblastos com os extratos, o meio de cultura foi removido das placas, estas foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e transferidas para um banho de gelo. Foram adicionados 2 mL do reagente TRIzol[®] em cada placa e as células foram recolhidas com auxílio de um raspador de células em um microtubo. Às células recolhidas, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio, a mistura foi agitada em vórtex e foi mantida por 3 minutos em temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após este processo, a mistura foi separada em três fases: a fase fenólica (inferior), uma interface proteica e uma fase aquosa superior, onde se encontrava o RNA. A fase superior foi transferida para um microtubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol para promover a precipitação do RNA. As amostras foram agitadas em vórtex e mantidas por 10 minutos em TA. Após este período foi realizada uma centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C e o isopropanol foi descartado. 1mL de álcool etílico a 75% gelado foi adicionado, para lavagem do *pellet*, e as amostras foram novamente centrifugadas a 9000 rpm por 5 minutos a 4°C. O álcool etílico 75% foi descartado e os microtubos foram mais uma vez centrifugados a 9000 rpm por 1 minuto a 4°C para a retirada do restante de álcool etílico 75%. O RNA extraído foi dissolvido em água tratada com inibidor de RNase, dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1%.

A concentração e pureza do RNA total extraído foram avaliadas com auxílio do espectrofotômetro NanoVueTMPlus (*GE Healthcare Life Sciences, UK*). A quantificação foi realizada por medida das absorvâncias das amostras obtidas nos comprimentos de onda de 260 nm, específico para quantificação de ácidos ribonucleicos, e 280 nm, específico para quantificação de proteínas, e a contaminação das amostras por proteína foi avaliada através da razão das

absorbâncias a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}). As amostras foram consideradas apropriadas quando o valor obtido para a razão A_{260}/A_{280} estava entre 1,7 e 2,2.

A integridade do RNA extraído foi avaliada através do ensaio de eletroforese em gel de agarose a 1%, para visualização das bandas 18S e 28S do RNA ribossômico. O tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,1 M, pH 8, foi utilizado na corrida e a tensão aplicada foi de 90 V. Ao término da eletroforese, as bandas do gel foram visualizadas em transiluminador sob luz UV.

3.12.2. Tratamento do RNA total com a enzima desoxirribonuclease I (DNase I)

As amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNase I (Sigma-Aldrich) com o objetivo de remover contaminação por DNA genômico. Alíquotas das amostras de RNA_t, contendo 0,09 µg de RNA, foram diluídas em um volume final de 8 µL de água deionizada tratada com DEPC, ao qual foram adicionados 1 µL de tampão de reação (Tris/HCl 200 mM, pH 8,3, contendo 20 mM de MgCl₂) e 1 µL de DNase I. As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. A enzima DNase I foi inativada através da adição de 1 µL de tampão de inativação (50 mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA) e por aquecimento a 70°C por 10 minutos.

3.12.3. Desenho e teste dos *primers*

As sequências dos *primers*, *forward*(F) e *reverse* (R), dos genes do colágeno tipo I, alfa-1 (COL1A1), metaloproteinase de matriz tipo 1 (MMP-1) e inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz tipo 1 (TIMP-1) foram obtidas a partir do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o programa *BLAST*. Os seguintes critérios foram adotados para a escolha das sequências dos *primers*: i) tamanho em torno de 20 nucleotídeos, ii) conteúdo de guanina e citosina (GC) entre 50 e 60%, iii) temperatura de anelamento dos pares próxima e em torno de 60°C, e iv) tamanho do produto de amplificação menor que 200 pares de base (bp). A especificidade dos *primers* foi avaliada por simulação computacional no *site* do *UCSC Genome Browser Home* (genome.ucsc.edu/)

usando o programa *In-Silico PCR*. Os *primers* foram produzidos pela *Integrated DNA Technologies* (IDT, USA).

Tabela 1. *Primers* utilizados para a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR dos genes COL1A1, MMP-1 e TIMP-1

Gene alvo	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto de amplificação
COL1A1 (F)	CCCCGAGGCTCTGAAGGTC	61,73	131
COL1A1 (R)	GGAGCACCATTTGGCACCTTT	61,19	
MMP-1 (F)	GGGGTATCCGTGTAGCACAT	56,7	76
MMP-1 (R)	CAGAGATGAAGTCCGGTTTTTC	53,7	
TIMP-1 (F)	GAATGCACAGTGTTCCTGTTT	60,18	72
TIMP-1 (R)	GTCCGTCCACAAGCAATGAG	59,20	

3.12.4. Validação dos *primers*

A curva de eficiência relativa dos *primers* foi construída com o objetivo de validar a eficiência de cada par de *primers* para a reação de RT-qPCR (*Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*), e estabelecer a concentração adequada de RNA total a ser utilizada nas reações. A quantidade inicial de RNA total utilizada foi de 20 ng para os *primers* dos genes de MMP-1 e TIMP-1, e de 10 ng para os *primers* do gene de COL1A1. As amostras foram diluídas com fator de diluição 5 para construção da curva dos *primers* dos genes de MPP-1 e TIMP-1; 4,5 µL das diluições foram utilizados nas reações, o que correspondeu a quantidades de RNA de 20 ng; 4 ng; 0,8 ng; 0,16 ng e 0,032 ng. As diluições para construção da curva dos *primers* do COL1A1 foram realizadas com fator de diluição 2; 4,5 µL das diluições foram utilizados nas reações, o que correspondeu a quantidades de RNA de 10 ng; 5 ng; 2,5 ng; 1,25 ng e 0,625ng. As amostras foram submetidas ao ensaio de transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativa no equipamento *Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR Systems*.

As eficiências dos *primers* dos genes de COL1A1, MMP-1 e TIMP-1 foram comparadas com a eficiência dos *primers* do gene constitutivo, β -actina, a fim de estabelecer o método adequado de quantificação da expressão gênica. A inclinação angular da reta (*slope*), obtida através da equação de regressão linear, foi utilizada para calcular a eficiência dos *primers*, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})-1} \times 100$$

A avaliação da especificidade dos *primers* foi feita através da curva de dissociação dos produtos de amplificação de cada par de *primers*.

3.12.5. Transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativa

O ensaio de transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativa foi realizado em um único passo com a utilização do kit Power SYBR[®]Green RNA-to-C_T[™]1-Step (Applied Biosystems, EUA), com o objetivo de quantificar a expressão dos genes COL1A1, MMP-1, TIMP-1 e β -actina nas amostras submetidas ao estresse oxidativo e tratadas ou não com os extratos produzidos pelos fungos endofíticos.

As reações foram realizadas com volume final de reação de 20 μ L, sendo 15,5 μ L de uma mistura composta por Power SYBR[®]Green, enzima transcriptase reversa (RT), *primers forward* e *reverse* (5 pMol. μ L⁻¹), e 4,5 μ L da amostra de RNA, que continham 5 ng de amostra. As condições de reação utilizadas nos experimentos foram: 30 minutos a 48°C para realização da reação de transcrição reversa; 10 minutos a 95°C para ativação da enzima DNA polimerase; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento do *primer* e extensão. A curva de dissociação foi construída através de ciclos de dissociação, 15 segundos a 95°C; anelamento, 15 segundos a 60°C; e dissociação, 15 segundos a 95°C.

Os valores de C_t (*threshold cycle*), ciclo no qual o sinal de fluorescência ultrapassa a linha de base, obtidos ao final da RT-qPCR, foram utilizados no cálculo da quantificação relativa da expressão gênica, utilizando a seguinte fórmula:

$$QR = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Onde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{controle}$$

$$\Delta Ct_{amostra} = Ct_{gene\ alvo}^a - Ct_{\beta-Actina}^a$$

$$\Delta Ct_{controle} = Ct_{gene\ alvo}^c - Ct_{\beta-Actina}^c$$

$Ct_{amostra}$: amostra de RNA_t extraída de fibroblastos tratados com extratos produzidos por fungos.

$Ct_{controle}$: amostra de RNA_t extraída de fibroblatos tratados com 0,1% de metanol.

As amostras de RNA_t utilizadas nos ensaio de RT-qPCR foram também submetidas a este ensaio sem utilização da enzima transcriptase reversa com o objetivo de identificar contaminação das amostras por DNA genômico.

3.13. Avaliação da atividade proteolítica de metaloproteinases

A avaliação da atividade proteolítica das metaloproteinases foi realizada através do ensaio de zimografia. O meio de cultivo das células tratadas com os extratos foi recolhido e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm para remoção de restos celulares. A concentração de proteínas no meio de cultivo foi determinada pelo método de quantificação de proteínas descrito por Lowry e colaboradores (1951). Quantidades de amostra correspondentes a 4µg de proteína foram utilizadas no ensaio.

O gel de eletroforese consistiu de um gel de concentração (5%) e um gel de separação (10%) cujas composições são descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição do gel de poliacrilamida.

Gel de concentração	Gel de Separação
Água destilada	Água destilada
Acrilamida 30% :Bisacrilamida 0,8% - 5%	Acrilamida 30% :Bisacrilamida 0,8% - 10%
Tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo 0,4% de SDS	Tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, contendo 0,4% de SDS
Solução de persulfato de amônio a 10%	Solução de persulfato de amônio a 10%
TEMED	TEMED
	Gelatina 1%

A eletroforese foi realizada com tampão de corrida Tris/Glicina 25 mM, pH 8,3, contendo 0,1% de SDS. O gel foi submetido a uma pré-corrida de 15 minutos com tensão de 100 V antes da aplicação das amostras. Estas foram diluídas na razão de 1:1 em tampão Tris/HCl 0,1M, pH 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, e 0,001% de azul de bromofenol e foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada com tensão de 100 V até as amostras ultrapassarem o gel de concentração, a tensão foi então alterada para 150 V.

Após a corrida o gel foi lavado com água destilada e incubado com solução de Triton X100 a 2% por 1 hora. Posteriormente, a solução de Triton X100 foi removida, o gel foi lavado com água destilada e incubado com tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, contendo CaCl_2 10 mM, a 37°C por 24 horas. No término do período de incubação, o gel foi corado com o corante Comassie Blue R350 diluído em ácido acético 20% na proporção de 1:1. O excesso de corante foi removido por lavagem do gel com ácido acético 20%. O marcador de proteínas de massa molecular conhecidas *SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard* (LifeTechnologies) foi utilizado no ensaio como padrão.

3.14. Quantificação de proteína

A quantificação de proteínas das amostras foi realizada pelo ensaio de Lowry (1951). A albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão.

3.15. Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios foram avaliados estatisticamente. Para verificar se testes paramétricos ou não-paramétricos deveriam ser empregados, foram realizados testes preliminares de normalidade da distribuição amostral e, quando pertinentes, o teste t de *Student* ou a análise de variância (*one-way ANOVA*) seguida por um teste de múltiplas comparações foram utilizados.

4. RESULTADOS

4.1. Produção dos metabólitos dos fungos em cultura líquida submersa e avaliação do rendimento dos extratos brutos.

Fungos endofíticos extraídos de folhas da planta *Bauhinia variegata* foram submetidos a um processo de cultivo em cultura líquida submersa. A massa micelial produzida foi separada do fluido de cultura através de filtração a vácuo. O fluido de cultura foi submetido à extração por partição líquido-líquido com acetato de etila para obtenção dos metabólitos de interesse produzidos pelos fungos. O rendimento dos extratos foi calculado com relação à massa micelial e estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento dos extratos dos metabólitos dos fungos endofíticos

Fungos	Massa micelial (peso úmido, g)	Massa do extrato obtido do fluido de cultura (mg)	Rendimento (% p/p)
I	40,4	93,5	0,231
II	37,9	51,6	0,136

4.2. Quantificação de polifenóis totais

A quantidade de polifenóis totais dos extratos dos fluidos de cultura foi medida através do ensaio de Folin-Ciocalteu, com utilização do ácido gálico como padrão para a construção da curva de calibração. Os resultados obtidos foram expressos como $\mu\text{g EAG.mg de extrato}^{-1}$ e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Quantificação de polifenóis totais nos extratos.

Extratos	Polifenóis totais (μg EAG.mg de extrato ⁻¹)
I	84,24 \pm 6,20
II	92,69 \pm 5,31

4.3. Quantificação de flavonóides totais

A quantidade de flavonóides totais dos extratos dos fluidos de cultura foi medida através do ensaio do cloreto de alumínio, com utilização da quercetina como padrão para a construção da curva de calibração. Os resultados obtidos foram expressos como μg EQ.mg de extrato⁻¹ e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Quantificação de flavonóides totais nos extratos.

Extratos	Flavonóides totais (μg EQ.mg de extrato ⁻¹)
I	4,83 \pm 0,22
II	2,46 \pm 0,30

Pode-se observar que, apesar do extrato do fungo II apresentar cerca de 10% a mais de polifenóis, o extrato do fungo I apresentou um teor de flavonóides cerca de 96% maior que o do extrato do fungo II.

4.4. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada através do ensaio de seqüestro do radical estável DPPH.

O cálculo da porcentagem de redução do DPPH· foi feito considerando a absorbância do controle negativo como 100%. Os resultados foram expressos pelo valor do IC₅₀, concentração necessária para reduzir 50% do DPPH·.

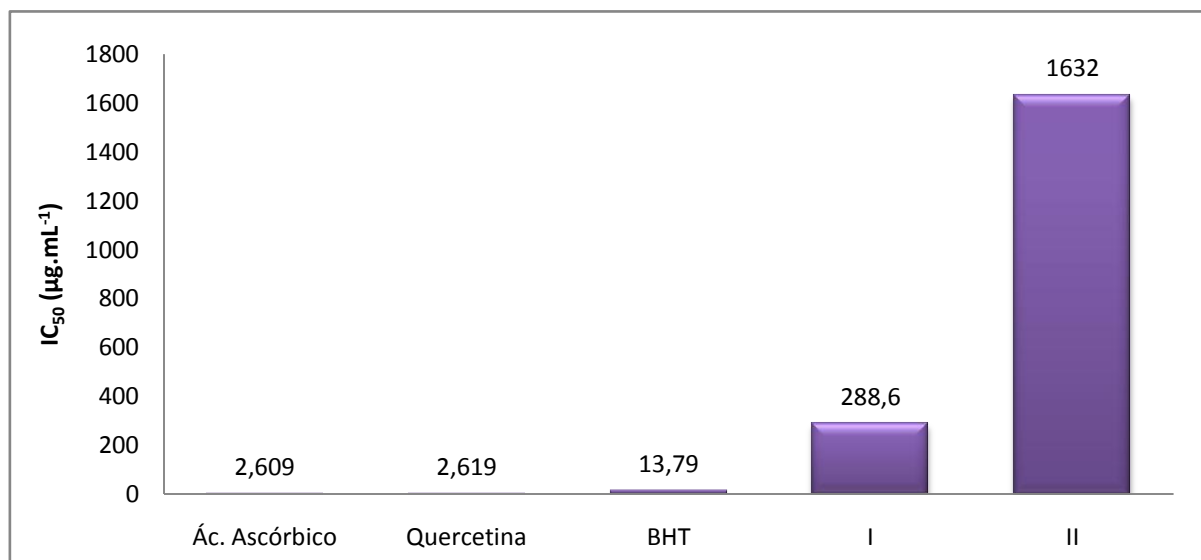


Figura 4. Atividade antioxidante dos padrões e extratos dos metabólitos dos fungos endofíticos submetidos ao ensaio de redução do radical estável DPPH·.

4.5. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos.

A influência que os metabólitos dos fungos endofíticos exerciam sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos foi avaliada através do ensaio do MTT. Neste ensaio, a viabilidade das células é determinada pela medida da formação de cristais de formazan, produzidos através da clivagem do anel tetrazólio presente no sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria. A viabilidade celular dos fibroblastos tratados foi expressa em porcentagem, sendo a viabilidade do controle considerada 100%.

O tratamento dos fibroblastos com o extrato produzido pelo fungo I provocou diminuição da viabilidade celular de forma dose dependente. As células tratadas com metanol 0,1% e as concentrações de 6,25 µg.mL⁻¹, 12,5 µg.mL⁻¹ e 25 µg.mL⁻¹, apresentaram viabilidade celular maior que 80%. As células tratadas com as

concentrações de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram viabilidade celular de 74,63% e 64,33%, respectivamente. Apesar do tratamento com a concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato do fungo I não ter diminuído a viabilidade celular quando comparado com concentrações menores, houve alterações na morfologia celular que indicavam a toxicidade deste extrato a partir desta concentração. Assim as concentrações escolhidas para realização dos demais ensaios com o extrato do fungo I foram: $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As células tratadas com o extrato do fungo II apresentaram viabilidade celular maior de 80% para todas as concentrações testadas (Figura 5). Assim as concentrações para realização dos demais ensaios com o extrato do fungo II foram: $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

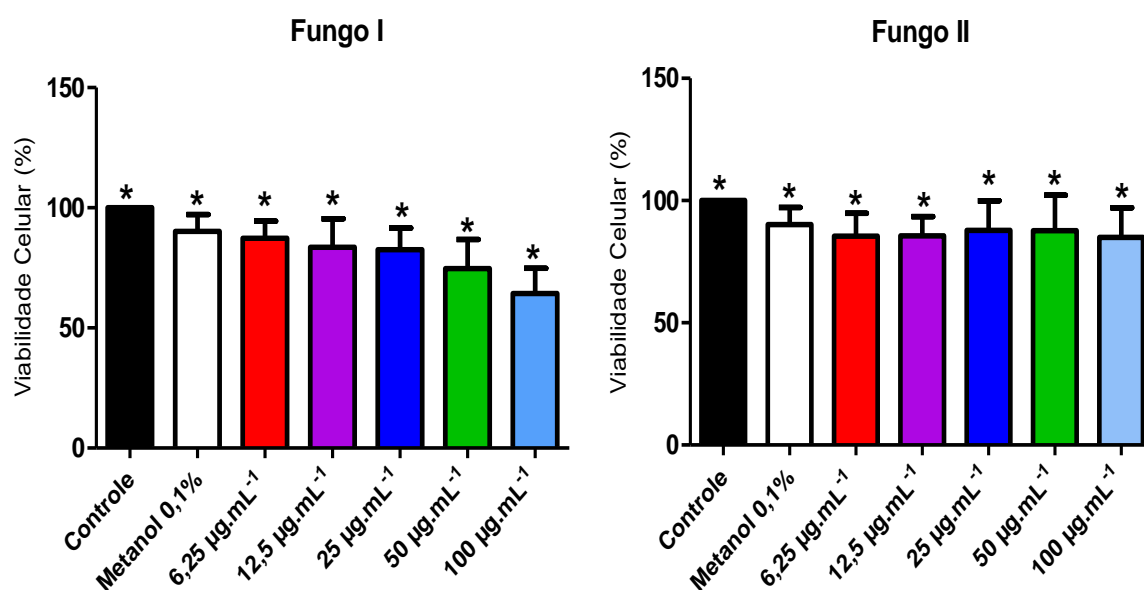


Figura 5. Viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados com os extratos produzidos pelos fungos endofíticos I e II.

A viabilidade celular de fibroblastos foi avaliada pelo ensaio do MTT após 72h de tratamento com diferentes concentrações dos extratos produzidos pelos fungos I e II. Os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão da porcentagem de células viáveis. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,5$).

4.6. Ensaio de peroxidação lipídica

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada com o intuito de estabelecer a dose de H_2O_2 adequada para indução do estresse oxidativo nas células. Os fibroblastos foram tratados por 1 h com as concentrações de 300 μM , 500 μM ou 1000 μM de H_2O_2 . A formação de produtos da peroxidação lipídica foi avaliada pela reação dos mesmos com o ácido tiobarbitúrico e quantificada pela medida da fluorescência emitida pelo complexo formado em comparação com os valores obtidos para a curva padrão construída com o 1,1,3,3-tetrahidroxipropano. O ensaio de avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) quantifica hidroperóxidos de lipídeos e aldeídos, como o malondialdeído (MDA), nos meios de cultura de células e no lisado celular. Este ensaio é baseado na reação do cromógeno, ácido 2-tiobarbitúrico, com o MDA. Uma molécula de MDA reage com duas moléculas do ácido 2-tiobarbitúrico, via condensação tipo Knoevenagel para gerar cromóforos, que podem ser medidos por leitura de absorvância ou fluorescência.

O tratamento dos fibroblastos com H_2O_2 foi capaz de induzir a peroxidação lipídica (Figura 6) e, conseqüentemente, instalar o estresse oxidativo nas células para todas as concentrações avaliadas. O aumento dos produtos indicadores da peroxidação lipídica nas células tratadas, quando comparadas ao controle cultivado com DMEM, foi estatisticamente significativo, porém a comparação entre a peroxidação lipídica induzida pelas diferentes concentrações de H_2O_2 não foi estatisticamente significativa. Devido a isto, a concentração de peróxido de hidrogênio escolhida para indução do estresse oxidativo nas células nos demais ensaios foi a de 300 μM .

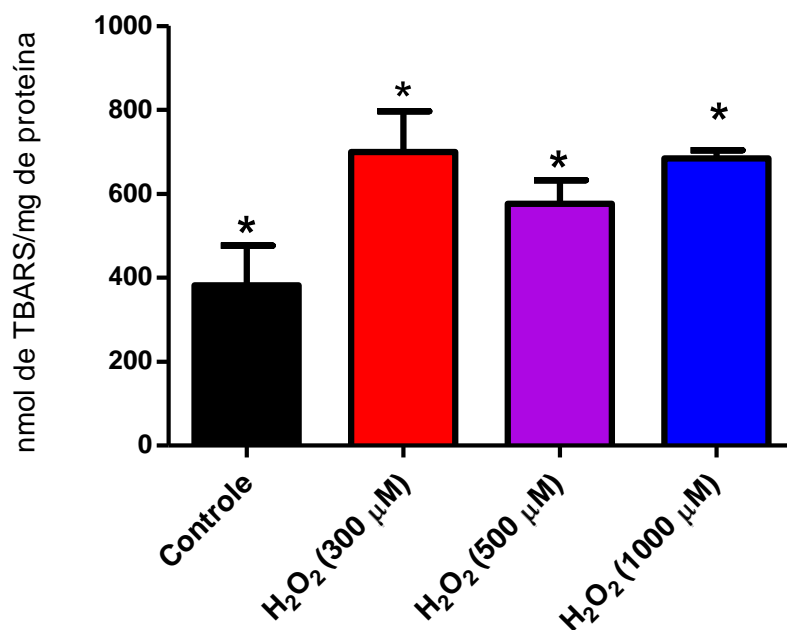


Figura 6. Ensaio de avaliação da peroxidação lipídica.

Fibroblastos foram tratados com três concentrações diferentes de H₂O₂ (300 μM, 500 μM e 1000 μM) e a quantidade de produtos da peroxidação lipídica capaz de se complexar com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medida em espectrofluorímetro. Os resultados representam a média ± desvio padrão dos resultados obtidos. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls (*, p < 0,05).

4.7. Ensaio de avaliação de atividade da enzima superóxido dismutase.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada pela medida da inibição da redução do NBT. Os resultados estão representados como porcentagem de atividade da SOD das amostras tratadas em relação ao controle, sendo a atividade da SOD no controle considerada 100%. O tratamento com o peróxido de hidrogênio diminuiu a atividade da SOD para 91,16% ± 0,83%. As células tratadas com extrato do fungo I nas concentrações de 2,5 μg.mL⁻¹, 5 μg.mL⁻¹ e 10 μg.mL⁻¹ deste extrato apresentaram 58,24% ± 3,13%, 82,60% ± 1,07, e 83,82% ± 0,45% de atividade de SOD, respectivamente. Assim, o tratamento com o extrato do fungo I em todas as concentrações provocou mudanças significativas da atividade da SOD nas células quando comparadas ao controle ou às células submetidas ao estresse oxidativo, sem tratamento.

A atividade da SOD para as células tratadas com o extrato do fungo II foi de $35,90\% \pm 1,68$; $45,32\% \pm 0,41\%$, e $53,78\% \pm 0,57\%$, para as concentrações de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma que no tratamento com o extrato do fungo I, houve diminuição significativa nos valores quando comparados ao controle ou às células induzidas ao estresse oxidativo, sem tratamento.

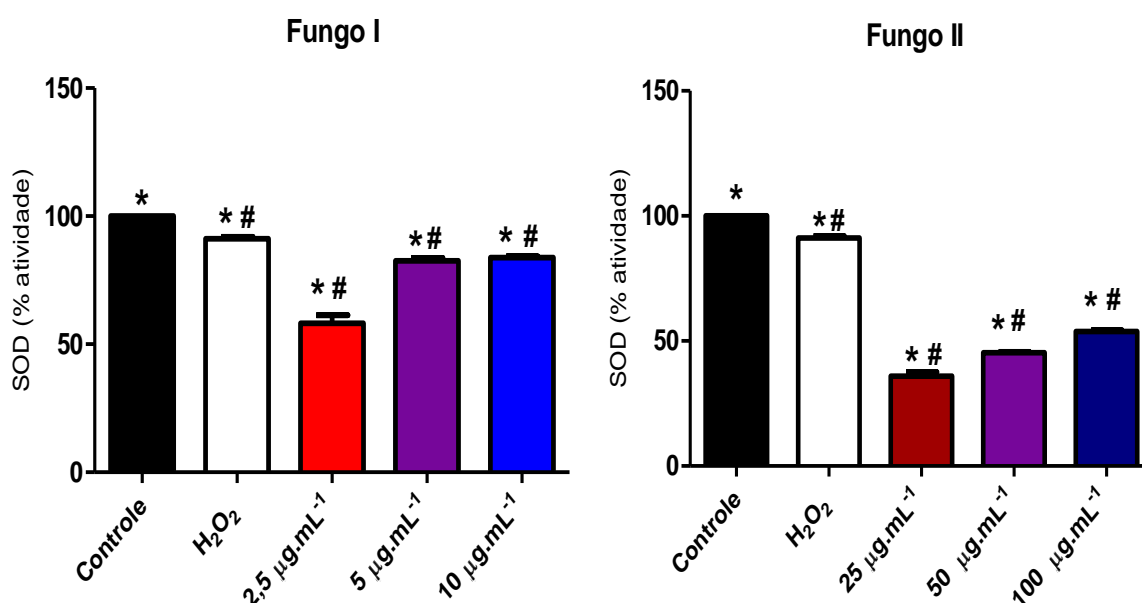


Figura 7. Ensaio de avaliação da atividade da superóxido dismutase em fibroblastos tratados com os extratos produzidos pelos fungos I e II.

Fibroblastos dérmicos foram tratados como descrito no item 3.9.3 e o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase. Os resultados apresentados representam média \pm erro médio de três experimentos. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*,#, $p < 0,0001$). *, diferença em relação ao controle; #, diferença em relação ao H₂O₂.

4.8. Ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase.

A influência do tratamento com os extratos sobre atividade da enzima catalase, responsável por catalisar a conversão do H₂O₂ em oxigênio molecular e moléculas de água, foi determinada através do monitoramento por espectrofotometria da taxa de decomposição do H₂O₂ no comprimento de onda de 240 nm, sendo considerada uma unidade internacional de catalase como a

quantidade de catalase necessária para decompor 1 μM de H_2O_2 por minuto no pH 7 e temperatura de 25°C (Weydert e Cullen, 2010). Os resultados estão representados como porcentagem de atividade da catalase, sendo a atividade de 100% atribuída ao controle. O tratamento com o peróxido de hidrogênio diminuiu a atividade da catalase para $55,39\% \pm 6,33\%$. O tratamento com o extrato do fungo I provocou aumento na atividade da catalase quando comparado com as células expostas ao estresse oxidativo e não tratadas com extrato. As células tratadas com as concentrações de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ deste extrato apresentaram $71,52\% \pm 4,83\%$, $68,41\% \pm 12,56$, e $81,68\% \pm 7,13\%$ da atividade da enzima, respectivamente.

A atividade da catalase para as células tratadas com o extrato do fungo II, foram $73,16\% \pm 10,64$, $59,16\% \pm 5,67\%$, e $63,59\% \pm 8,72\%$, para as concentrações de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

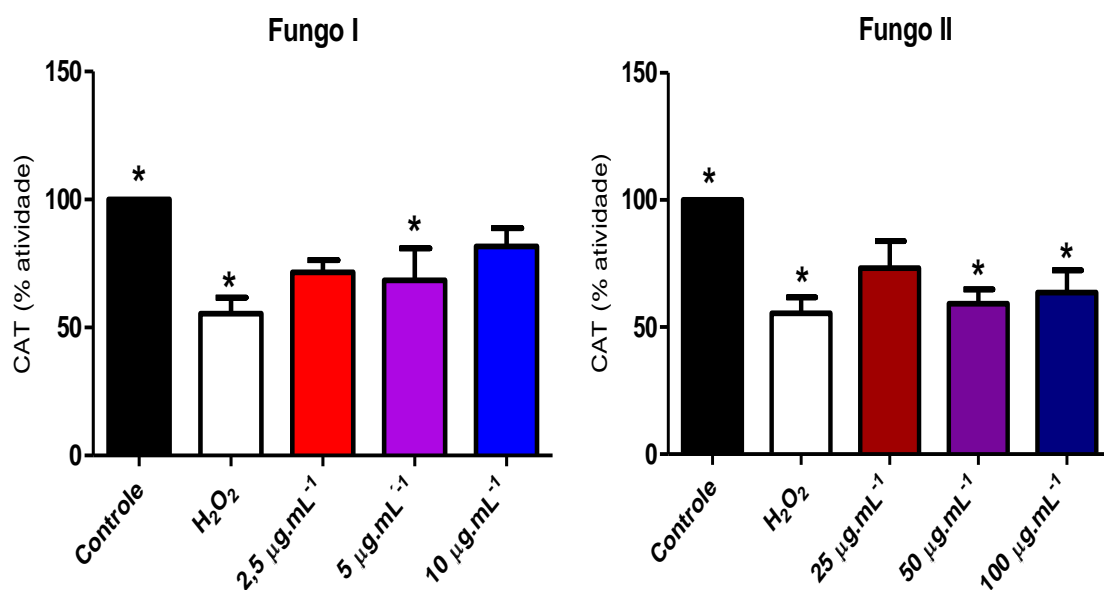


Figura 8. Ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase em fibroblastos tratados com extratos produzidos pelos fungos I e II.

Fibroblastos dérmicos foram tratados como descrito no item 3.9.1, e o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima catalase através do monitoramento do consumo de H_2O_2 10 mM em espectrofotômetro. Os resultados apresentados representam a média \pm erro médio ($n=3$). Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,5$).

4.9. Extração de RNA

A quantificação do RNA extraído dos fibroblastos dérmicos humanos foi realizada em espectrofotômetro através da medida das absorbâncias das amostras obtidas nos comprimentos de onda de 260 nm, específico para quantificação de ácidos ribonucleicos, e 280 nm, específico para quantificação de proteínas, e a contaminação das amostras por proteína foi avaliada através da razão das leituras de absorbância em 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}). As amostras foram consideradas apropriadas quando o valor obtido para a razão A_{260}/A_{280} estava entre 1,7 e 2,2 (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliação do teor de pureza e concentração do RNA total extraído dos fibroblastos expostos ao estresse oxidativo e tratados ou não com extratos.

Amostras	Absorbância (260nm)	Absorbância (280nm)	Razão dos valores de absorbâncias (A_{260}/A_{280})	Concentração final ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
Controle	23,22 ± 2,77	13,01 ± 1,68	1,842 ± 0,021	0,893 ± 0,115
H ₂ O ₂	13,07 ± 1,81	7,32 ± 1,25	1,839 ± 0,017	0,502 ± 0,072
I (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	9,38 ± 1,22	5,42 ± 0,88	1,791 ± 0,043	0,368 ± 0,039
I (5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	8,33 ± 0,17	5,12 ± 0,28	1,770 ± 0,043	0,295 ± 0,018
I (2,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	8,94 ± 0,27	5,23 ± 0,21	1,787 ± 0,001	0,337 ± 0,004
II (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	14,91 ± 1,33	8,86 ± 0,76	1,772 ± 0,038	0,556 ± 0,042
II (50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	14,56 ± 0,49	8,80 ± 0,63	1,752 ± 0,049	0,537 ± 0,009
II (25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	14,40 ± 2,00	8,44 ± 0,92	1,818 ± 0,003	0,529 ± 0,094

A integridade do RNA total extraído dos fibroblastos tratados ou não com os extratos e expostos ao estresse oxidativo foi avaliada através do ensaio de eletroforese em gel de agarose e visualização das bandas 18S e 28S do RNA ribossômico (Figura 9). As amostras de RNA total que apresentaram ambas as bandas no gel foram utilizadas nos demais ensaios, sendo excluída somente a amostra 8a (fibroblastos tratados com 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ do extrato produzido pelo fungo II), pois não apresentou integridade satisfatória.

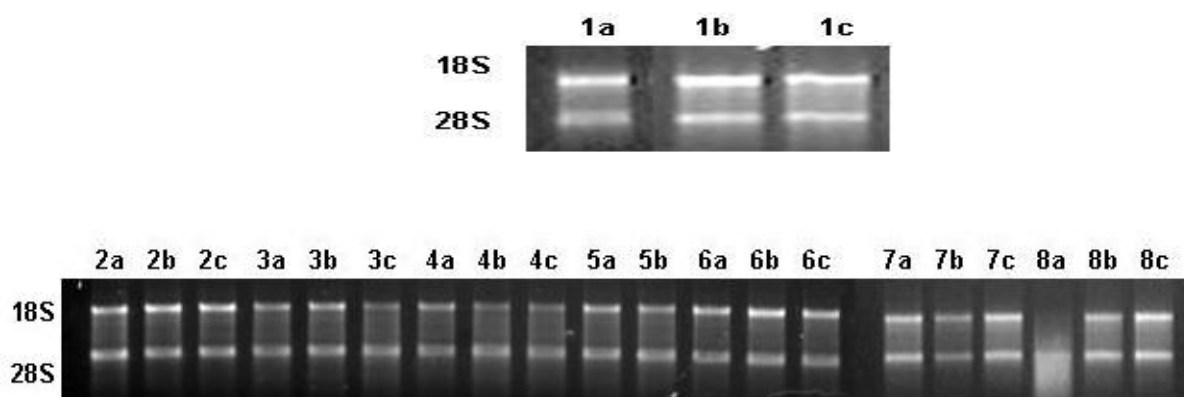


Figura 9. Avaliação da integridade do RNA total extraído dos fibroblastos tratados com extratos e expostos ao estresse oxidativo.

As amostras de RNA total extraídas da cultura de fibroblastos tratados ou não com os extratos e expostos ao estresse oxidativo foram aplicadas em gel de agarose 1% em quantidade equivalente a 1 µg de RNA. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,1 M, pH 8, com tensão aplicada de 90 V. As bandas 18S e 28S foram visualizadas em transiluminador sob luz UV. As amostras correspondem às amostras de RNA tratadas de acordo com o descrito no item 3.8.2. Na figura, a numeração das colunas indica as amostras: 1a, 1b e 1c: controle; 2a, 2b e 2c: tratamento com H₂O₂; 3a, 3b e 3c: tratamento com extrato do fungo I (10 µg.mL⁻¹); 4a, 4b e 4c: tratamento com extrato do fungo I (5 µg.mL⁻¹); 5a, 5b: tratamento com extrato do fungo I (2,5 µg.mL⁻¹); 6a, 6b e 6c: tratamento com extrato do fungo II (100 µg.mL⁻¹); 7a, 7b e 7c: tratamento com extrato do fungo II (50 µg.mL⁻¹); 8a, 8b e 8c: tratamento com extrato do fungo II (25 µg.mL⁻¹).

4.10. Análise e validação dos *primers* COL1A1, MMP-1, TIMP-1 e β-actina.

A validação dos *primers* de COL1A1, MMP-1 e TIMP-1 foi realizada através da construção da curva de eficiência relativa com diferentes concentrações do RNA total extraído de fibroblastos dérmicos humanos. O *primer* da β-actina foi validado por outro grupo do Laboratório de Farmacologia Molecular (Martini, 2013), Figura 10. As curvas obtidas estão representadas nas Figuras 11, 12 e 13.

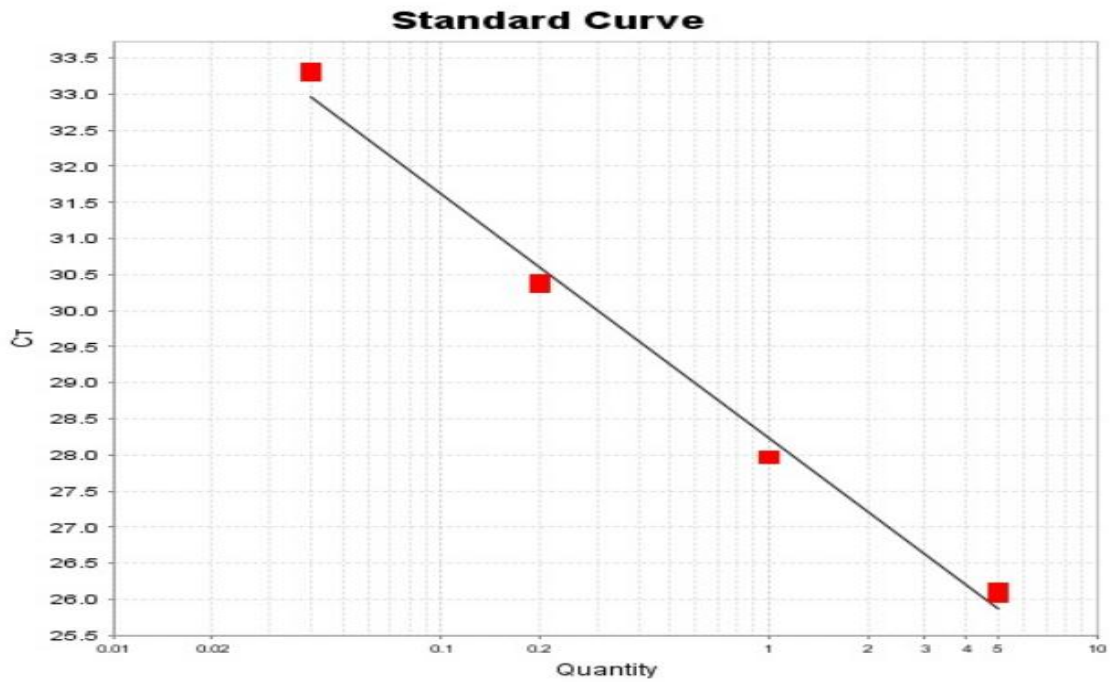


Figura 10. Curva padrão do gene β -actina (Martini, 2013).

Curva padrão do gene β -actina construída a partir da diluição em série de um pool de RNAt de células mesangiais humanas imortalizadas.

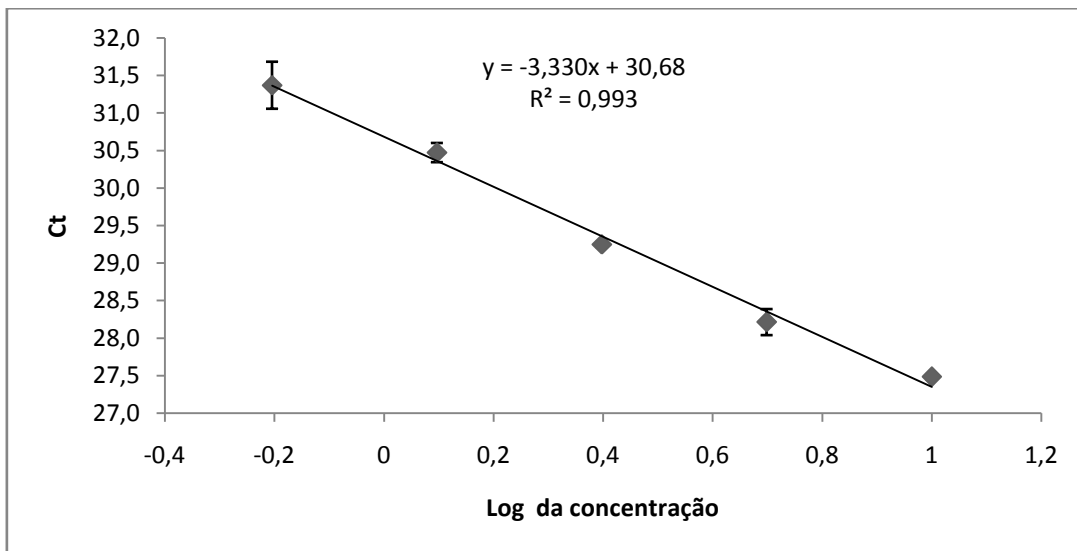


Figura 11. Curva padrão do gene COL1A1.

Curva padrão do gene COL1A1 construída a partir da diluição em série de um *pool* de RNAt de fibroblastos dérmicos humanos.

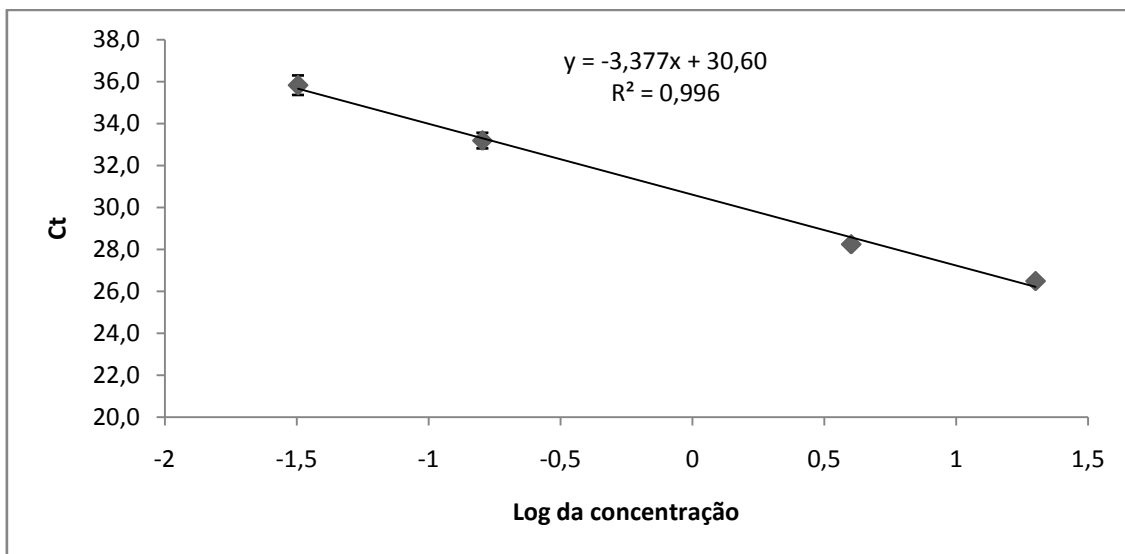


Figura 12. Curva padrão do gene MMP-1.

Curva padrão do gene MMP-1 construída a partir da diluição em série de um *pool* de RNAt de fibroblastos dérmicos humanos.

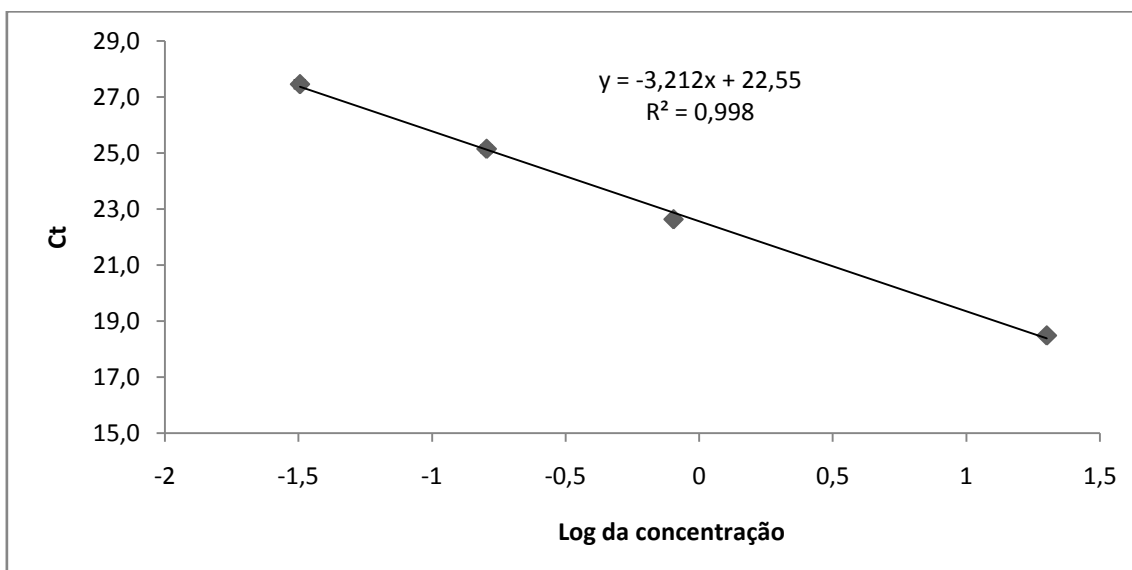


Figura 13. Curva padrão do gene TIMP-1.

Curva padrão do gene TIMP-1 construída a partir da diluição em série de um *pool* de RNAt de fibroblastos dérmicos humanos.

Os valores obtidos para a inclinação angular da reta (*slope*), para o ponto de intersecção do eixo y (*y-intercept*), que reflete o limite de detecção teórica da reação, para o coeficiente de correlação linear (*r*) e a eficiência estão representados na Tabela 7. O valor do *slope* foi utilizado para calcular a eficiência dos *primers*. Os *primers* em estudo apresentaram eficiência entre 90 e 110%, adequando-se aos

critérios estabelecidos para a qualidade da reação. As eficiências dos *primers* COL1A1, MMP-1 e TIMP-1 foram comparadas com a eficiência do *primer* da β -actina e, como a variação obtida entre as eficiências dos *primers* dos genes alvo e do gene constitutivo foi menor que 10%, o método de quantificação relativa pelo cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi escolhido para realizar a análise da expressão relativa dos genes em estudo.

Tabela 7. Parâmetros de validação obtidos no teste de eficiência dos primers COL1A1, MMP-1 e TIMP-1.

Parâmetros analisados ($y = ax + b$)	Genes			
	β -actina (Martini, 2013)	COL1A1	MMP-1	TIMP-1
Inclinação da reta (<i>slope</i> , x)	- 3,384	- 3,330	- 3,377	- 3,212
<i>y</i> –intercept (b)	28,227	30,68	30,60	22,55
Coefficiente de correlação linear (r)	0,997	0,993	0,996	0,998
Eficiência (%)	97,48	99,66	97,75	104,80

A especificidade da formação do produto de amplificação de cada um dos *primers* foi avaliada através da curva de dissociação destes produtos (Figura 14). A curva de dissociação dos produtos de amplificação reflete a mudança na fluorescência quando há dissociação da dupla fita de DNA devido ao aumento na temperatura. A partir desta curva é determinada a temperatura de *melting* (T_m), que é a temperatura na qual 50% do produto de amplificação apresentam-se como fita dupla e os outros 50% apresentam-se como fita simples. Cada produto de amplificação apresenta uma T_m específica, desta forma, a especificidade dos *primers* para os produtos de amplificação dos genes em estudo é indicada pela formação de um único pico na curva de dissociação, o que pode ser observado para todos os *primers* testados.

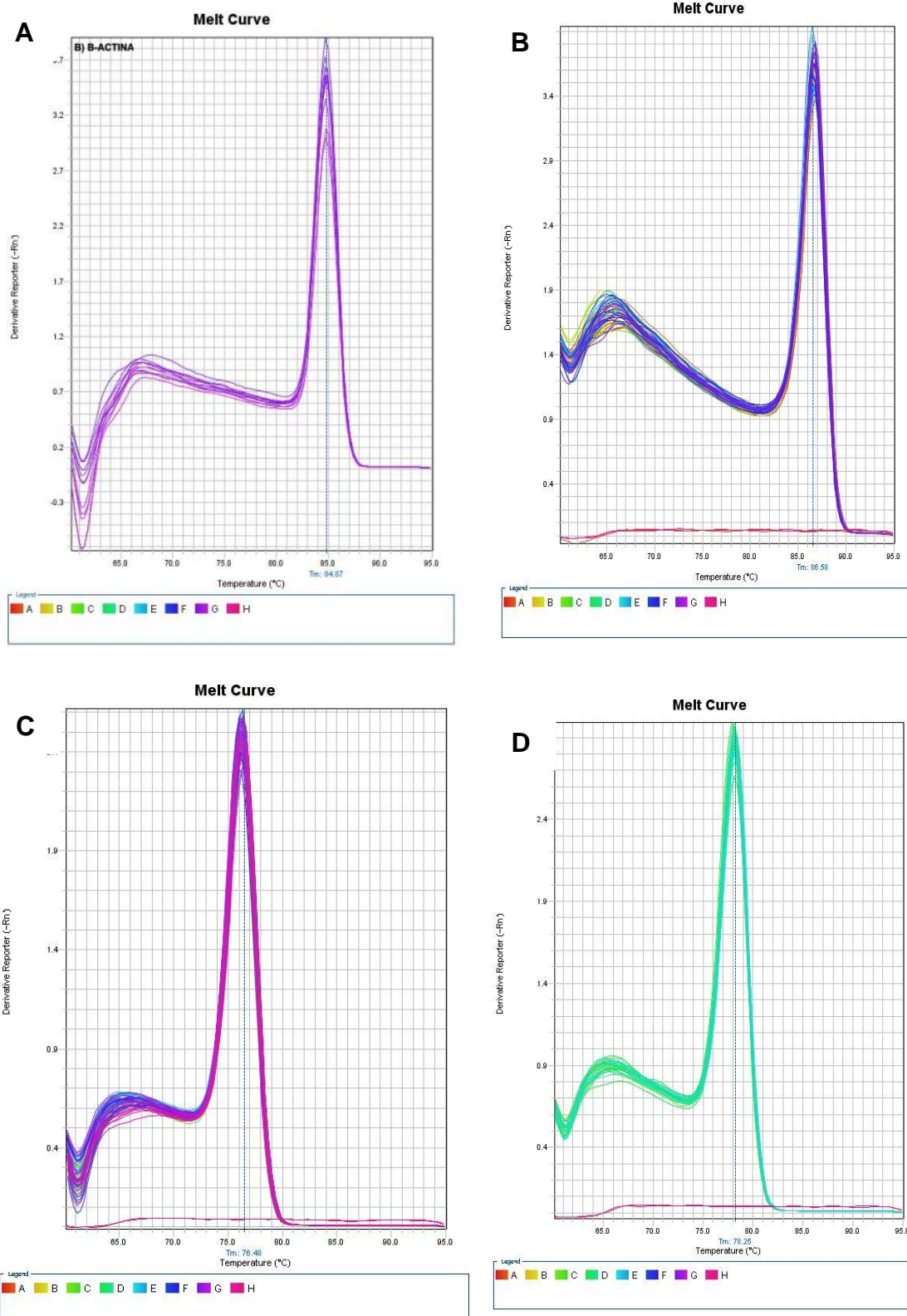


Figura 14. Verificação da especificidade dos pares de *primers* partir da curva de dissociação (curva de *melting*) dos produtos de amplificação.

Ao final da reação em cadeia da polimerase, os produtos da amplificação foram submetidos a um aumento gradativo da temperatura, de 60°C a 95°C, a fim de verificar a Tm. A) pares de *primers* da β -actina; B) pares de *primers* do COL1A1; C) pares de *primers* da MMP-1 e D) pares de *primers* do TIMP-1.

4.11. Quantificação relativa da expressão gênica

A expressão gênica do colágeno do tipo I, da metaloproteinase do tipo I e do inibidor tecidual da metaloproteinase do tipo I foi avaliada em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo e tratados com extratos produzidos por fungos endofíticos.

A expressão relativa do COL1A1, MMP-1 e TIMP-1 nos fibroblastos tratados com 300 μ M de H_2O_2 foi avaliada com relação à expressão destes genes nos fibroblastos que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento, sendo cultivados somente em DMEM. Após o tratamento com peróxido de hidrogênio a expressão relativa do RNA mensageiro do gene do colágeno do tipo I diminuiu em 88,04%, houve aumento de 233,5% na expressão do mRNA do gene da MMP-1 e não houve diferença significativa na expressão do mRNA do gene do TIMP-1, sendo observada uma tendência de aumento de 6,8% (Figura 15).

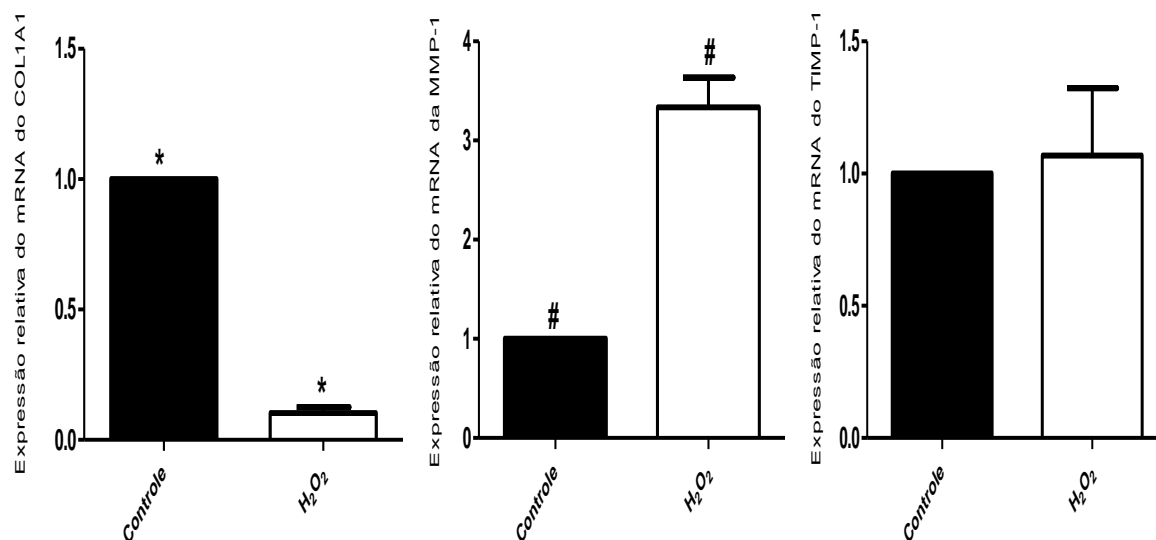


Figura 15. Expressão gênica relativa do mRNA do COL1A1, da MMP-1 e TIMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados com H_2O_2 na concentração de 300 μ M e o RNA extraído das amostras foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. A expressão do mRNA dos genes do COL1A1, da MMP-1 e do TIMP-1, foram normalizadas pela expressão do mRNA do gene da β -actina. Os resultados foram apresentados como expressão gênica relativa do mRNA dos genes do COL1A1, da MMP-1 e do TIMP-1 das amostras tratadas comparados com o controle. Os dados representam a média \pm erro médio de três experimentos. Os resultados foram avaliados pelo teste t pareado (*, $p < 0,0001$; #, $p < 0,05$).

A expressão gênica relativa do mRNA dos genes de COL1A1, MMP-1 e TIMP-1 nos fibroblastos expostos ao estresse oxidativo e tratados com os extratos foi avaliada com relação à expressão destes genes nos fibroblastos expostos ao estresse oxidativo e não tratados com os extratos.

Os resultados obtidos para a expressão gênica relativa do COL1A1 mostraram que houve tendência de aumento na expressão do COL1A1 tanto nos fibroblastos tratados com o extrato do fungo I quanto com os tratados com o extrato do fungo II, porém os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa. O tratamento com a concentração de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato do fungo I levou a um aumento médio de 123% na expressão do COL1A1 e as concentrações de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do mesmo extrato promoveram um aumento na expressão do COL1A1 de 59,3% e 103,4%, respectivamente. Em relação ao tratamento com o extrato do fungo II, para as concentrações de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, houve aumento de 58,80%, 147,00% e 70,10%, respectivamente (Figura 16).

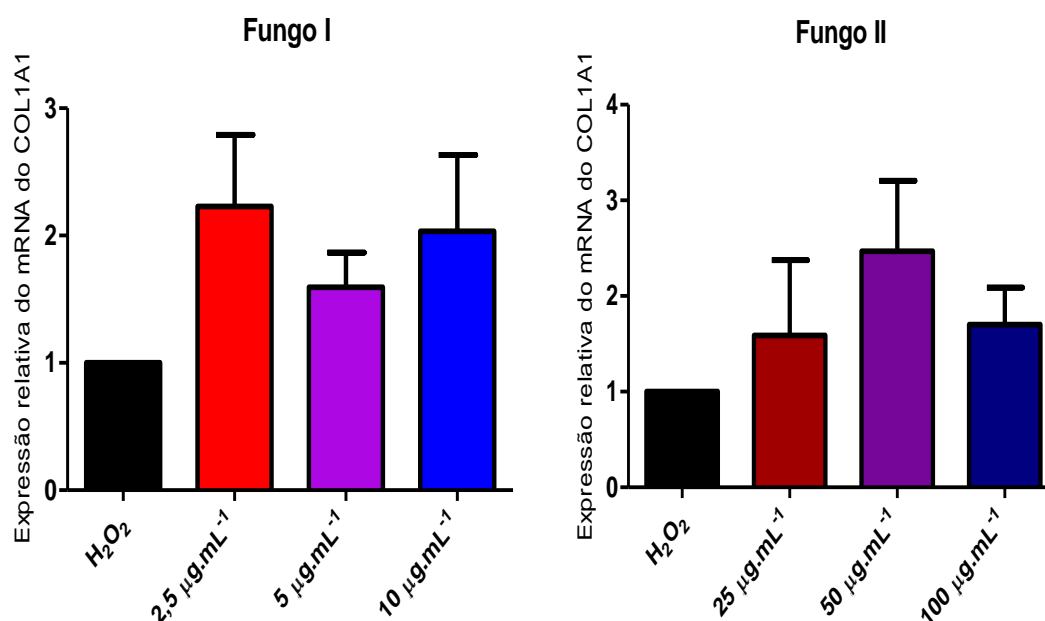


Figura 16. Expressão gênica relativa do mRNA do COL1A1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo e tratados com os extratos dos fungos I e II.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 3.9.2. e o RNA_t extraído das amostras foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. A expressão do mRNA do gene do COL1A1 foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da β -actina. Os resultados são apresentados como expressão gênica relativa do mRNA do COL1A1 das amostras tratadas comparada com a do controle tratado somente com H₂O₂. Os dados representam a média \pm erro médio de três experimentos. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Diminuição na expressão gênica relativa do mRNA da MMP-1 foi observada nos fibroblastos que foram tratados com as concentrações de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato do fungo I; a primeira ocasionou diminuição média de 65,87% e a última levou a uma diminuição média de 78,8% da expressão gênica. A expressão gênica relativa do mRNA da MMP-1 nos fibroblastos tratados com a concentração de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do mesmo extrato apresentou tendência de diminuição média de 29,24%, porém não houve diferença significativa com relação ao controle para este resultado. Em relação ao tratamento com o extrato do fungo II, houve tendência de aumento na expressão gênica relativa do mRNA da MMP-1 para todas as concentrações utilizadas. As concentrações de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ provocaram aumento médio de 18,8%, 35,2% e 24,3%, respectivamente (Figura 17).

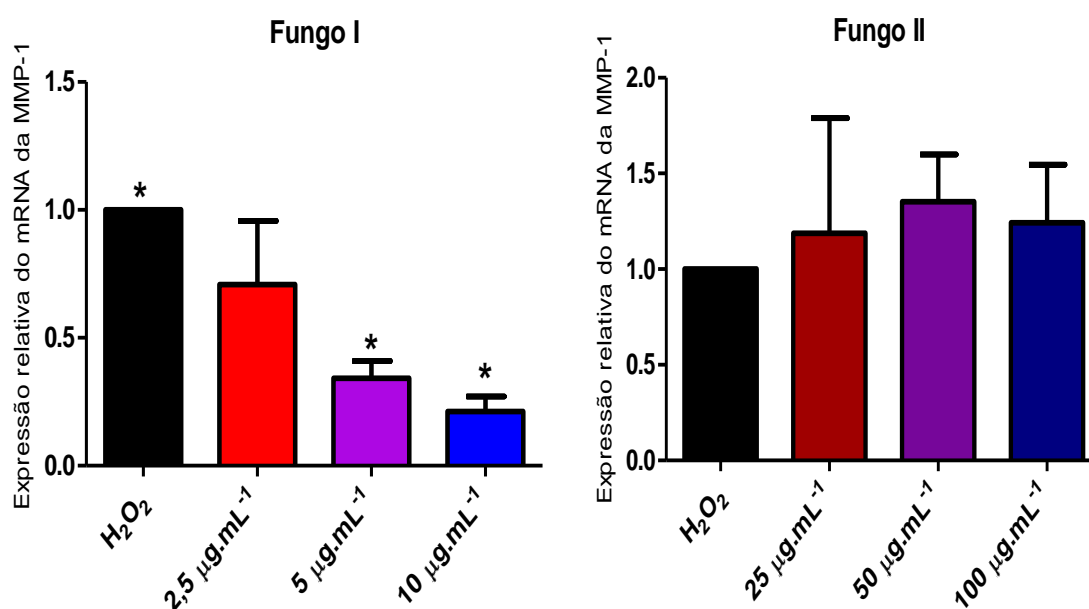


Figura 17. Expressão gênica relativa do mRNA do MMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo e tratados com os extratos dos fungos I e II.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 3.9.2. e o RNA extraído das amostras foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. A expressão do mRNA do gene da MMP-1 foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da β -actina. Os resultados são apresentados como expressão gênica relativa do mRNA da MMP-1 das amostras tratadas comparada com a do controle, tratado somente com H₂O₂. Os dados representam a média \pm erro médio de três experimentos. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,0001$).

As alterações observadas na expressão relativa do mRNA do TIMP-1 não apresentaram diferença significativa tanto para os fibroblastos que foram tratados com o extrato do fungo I quanto para os que foram tratados com extrato do fungo II. O tratamento com as concentrações de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato do fungo I ocasionou uma tendência de decréscimo médio na expressão deste gene de 4,91%, 52,59% e 25,63%, respectivamente. O tratamento com as concentrações de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato do fungo II, ocasionou uma tendência de aumento médio na expressão do mRNA do TIMP-1 de 4,9%, 12,2% e 69,7%, respectivamente (Figura 18).

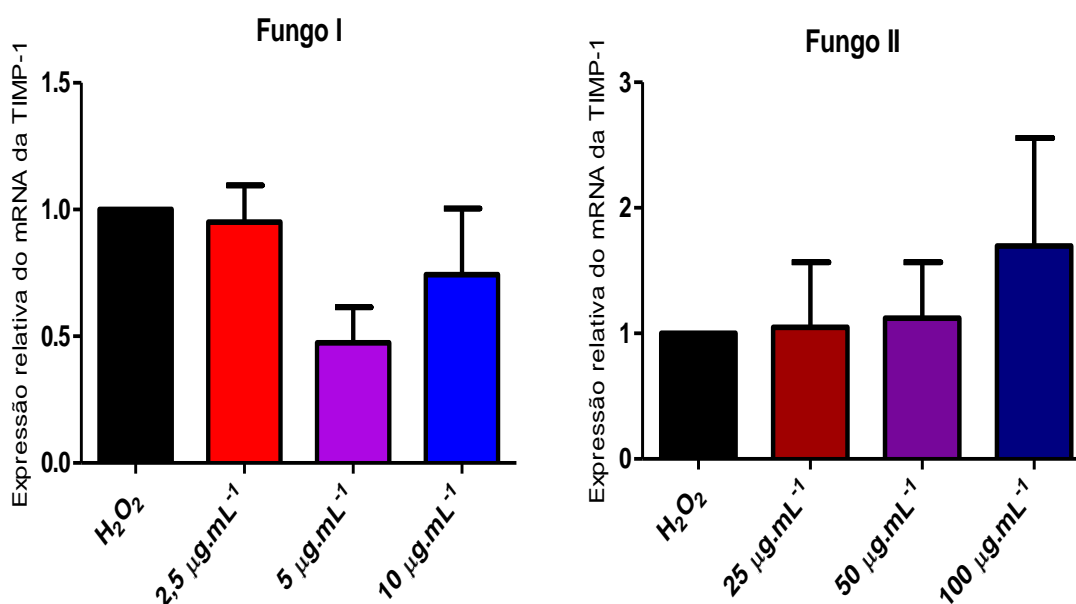


Figura 18. Expressão gênica relativa do mRNA do TIMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo e tratados com extratos dos fungos I e II.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 3.9.2. e o RNA_t extraído das amostras foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. A expressão do mRNA do gene do TIMP-1 foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da β -actina. Os resultados são apresentados como expressão gênica relativa do mRNA do TIMP-1 das amostras tratadas comparada com a do controle, tratado somente com H_2O_2 . Os dados representam a média \pm erro médio de três experimentos. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.12. Avaliação da atividade de metaloproteinases

A avaliação da atividade de metaloproteinases foi realizada através da visualização da atividade proteolítica destas no gel de poliacrilamida contendo 1% de gelatina. O ensaio de zimografia que utiliza a gelatina como substrato é utilizado para avaliação da atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9. No zimograma apresentado na Figura 19 é possível observar bandas de atividade proteolítica com massas moleculares de 70 kDa e 66 kDa, que correspondem, respectivamente, à forma pró-ativa da metaloproteinase do tipo 2 (MMP-2) e à forma ativa desta mesma enzima. Bandas correspondentes à MMP-9 não foram visualizadas nas amostras.

É possível notar que o tratamento com o peróxido de hidrogênio causou um aumento na atividade da MMP-2 e que o tratamento com os extratos dos fungos I e II promoveram uma diminuição desta atividade proteolítica. Os tratamentos com os extratos do fungo I nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, assim como o tratamento com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do fungo II, provocaram as maiores diminuições na atividade desta enzima.

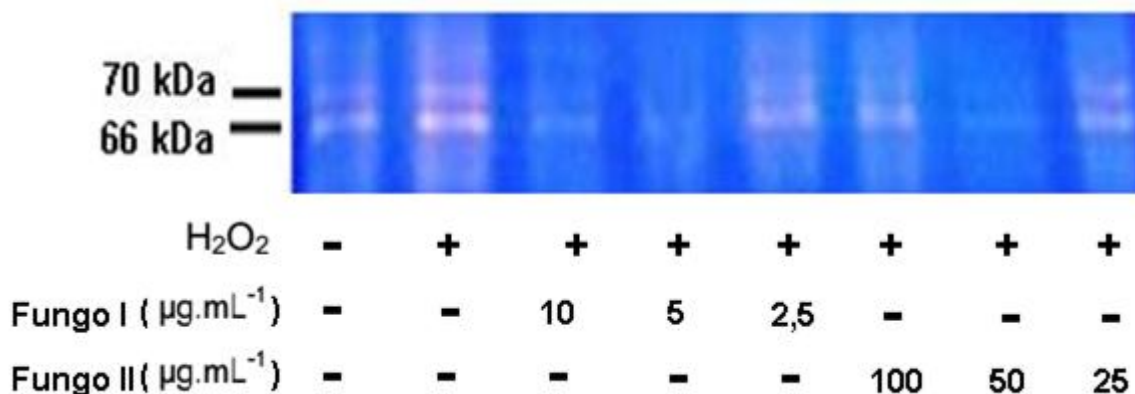


Figura 19. Avaliação da atividade de metaloproteinases.

Os meios de cultivo das células expostas ao estresse oxidativo e tratadas com os extratos dos fungos I e II foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com 1% de gelatina.

5. DISCUSSÃO

O envelhecimento provoca diversos efeitos deletérios no organismo em todas as espécies animais, causando diminuição da capacidade funcional máxima e aumento na probabilidade de ocorrência de processos degenerativos (Pamplona, 2008). O envelhecimento cutâneo é um processo biológico complexo, progressivo e inevitável. Apesar de ser primariamente um processo fisiológico (envelhecimento intrínseco), dependente das características genéticas do indivíduo, este também pode ser um processo patológico (envelhecimento extrínseco). Ambos os processos atuam de forma sinérgica na promoção de alterações morfológicas e funcionais que se manifestam pela indução acelerada da formação de rugas, descamação, aspereza, ressecamento, flacidez, bem como anormalidades de pigmentação (Naval et al., 2014).

A exposição da pele a fatores ambientais e comportamentais, como a exposição à radiação ultravioleta, a poluição, o tabagismo, o etilismo e a má nutrição, estão entre os principais responsáveis pelo envelhecimento cutâneo extrínseco. Apesar de serem diferentes, os fatores ambientais envolvidos no envelhecimento extrínseco apresentam mecanismo de ação predominantemente similar, pois atuam principalmente através do estímulo da produção de espécies reativas de oxigênio, que são responsáveis por desencadear respostas moleculares que favorecem a produção de enzimas que degradam componentes da matriz extracelular e ainda interferem em vias fundamentais para a produção desses componentes (Fisher et al., 2002; Sárdy, 2009).

Uma proposta estabelecida para se contrapor aos efeitos das espécies reativas de oxigênio consiste na utilização de substâncias capazes de combater o estresse oxidativo e auxiliar no restabelecimento do estado redox normal das células. Com este intuito, os compostos que apresentam atividade antioxidante são amplamente estudados para avaliar sua possível aplicação em formulações cosméticas (Singh e Agarwal, 2009; Barroso et al., 2014).

Os compostos polifenólicos estão entre os compostos mais estudados para esta finalidade, por apresentarem uma considerável atividade antioxidante decorrente de suas estruturas químicas. As principais fontes de polifenóis utilizadas nos diversos estudos são as plantas, porém a descoberta de que microrganismos

são capazes de produzir compostos similares aos da planta hospedeira (Stierle et al., 1993) enseja a pesquisa dos compostos produzidos por estes microrganismos, que são fonte potencial de metabólitos secundários ativos similares aos das plantas, e ainda com grande possibilidade de descoberta de novos compostos.

Neste estudo, foram produzidos extratos brutos de metabólitos de dois fungos endofíticos isolados das folhas da planta *Bauhinia variegata*, sendo ambos pertencentes ao gênero *Phomopsis* sp. Fungos endofíticos pertencentes a este gênero são comumente encontrados em diversos tipos de plantas e são capazes de produzir uma ampla diversidade de metabólitos secundários, aos quais já foram atribuídas atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória (Weber et al., 2004; Huang et al., 2008; Rukachaisirikul et al., 2008; Adelin et al., 2011; Huang et al., 2014).

Os fungos endofíticos foram cultivados em cultura líquida submersa feita em duas etapas para a produção de metabólitos secundários. O rendimento obtido para os extratos brutos em relação à massa micelial produzida foi de 0,231% para o fungo I, e de 0,136% para o fungo II (Tabela 3). Apesar da obtenção de baixo rendimento, a versatilidade apresentada pelos processos de cultivo dos fungos permitem a exploração de alterações nas condições em que este é realizado, com alterações em parâmetros como a composição e o tipo de meio utilizado, aeração, pO₂, pCO₂, pH e temperatura, com possibilidade de otimização da produção de compostos biologicamente ativos (Kusari et al., 2012).

Os extratos brutos produzidos foram submetidos à avaliação para determinação do teor de compostos polifenólicos e, especificamente, de flavonóides. O teor de polifenóis dos extratos produzidos pelo fungo I foi menor que o encontrado para o fungo II. O teor obtido para o primeiro fungo foi de 84,24 ± 6,20 µg EAG.mg de extrato⁻¹ e de 92,69 ± 5,31 µg EAG.mg de extrato⁻¹ para o segundo (Tabela 4). Contudo, no que se refere ao teor de flavonóides, o extrato produzido pelo fungo I apresentou teor cerca de 2 vezes maior que o extrato produzido pelo fungo II (Tabela 5).

Os resultados obtidos mostram que os fungos endofíticos do gênero *Phomopsis* sp. isolados das folhas de *Bauhinia variegata* são capazes de produzir compostos polifenólicos e flavonóides, que são uma classe de compostos que já foi descrita como capaz de induzir a redução da produção de MMP-1 levando à

diminuição da degradação do colágeno fibrilar (Leu et al., 2006). Quando comparado com o teor de polifenóis do extrato da planta *Calendula officinalis* (28 $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$), capaz de proteger queratinócitos humanos do dano oxidativo promovido pelo tratamento com peróxido de hidrogênio (Alnuqaydan et al., 2015), o teor de polifenóis encontrado nos extratos de ambos os fungos foi cerca de 3 vezes maior que a do extrato da planta. Além disso, o teor de polifenóis dos extratos dos fungos foi maior que o apresentado pelos extratos das plantas *Coffea arabica* (26,7 $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$) e *Michelia alba* (2,7 $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$), que apresentaram atividade protetora em fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação ultravioleta, promovendo recuperação da síntese de colágeno (Chiang et al., 2011; Chiang et al. 2012). O teor de polifenóis encontrado nos extratos avaliados neste estudo também foi maior que o apresentado pelo extrato etanólico produzido pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da planta *Emblica officinalis*, que apresentou teor de polifenóis totais de 9,53 $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ (Nath et al., 2012).

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio de sequestro do radical estável DPPH·, e os resultados obtidos mostram que os extratos produzidos pelos fungos em estudo diferem quanto à sua capacidade antioxidante, sendo a atividade antioxidante apresentada pelo fungo I maior que a apresentada pelo extrato do fungo II. O extrato do primeiro fungo apresentou IC_{50} de 288,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto o IC_{50} do segundo fungo foi de 1632 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 4). O fato destes extratos apresentarem atividade antioxidante torna-os candidatos plausíveis para avaliação de sua possível ação protetora em células expostas ao estresse oxidativo.

O valor de IC_{50} obtido para o extrato produzido pelo fungo I foi menor que o apresentado pelo extrato da planta *Michelia alba* (IC_{50} : > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e pelo extrato da planta *Eclipta prostrata* L. (IC_{50} de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), os quais apresentaram ação protetora em células expostas ao UVB, sendo o primeiro capaz de diminuir a expressão de metaloproteinases e aumentar a produção de colágeno, e o segundo de diminuir a toxicidade induzida pelo UVB em queratinócitos e fibroblastos (Chiang et al., 2012; Chan et al., 2014). Contudo, o valor de IC_{50} obtido para o extrato produzido pelo fungo II foi maior que o apresentado por estas plantas, assim a atividade antioxidante apresentada por um dos fungos em estudo, o fungo I, foi maior que o apresentado por extratos de plantas capazes de atuar em variáveis importantes para o envelhecimento cutâneo.

Os fibroblastos são o principal tipo de célula da derme humana e constituem uma população de células de longa-vida que está submetida ao acúmulo de danos contínuos e perda da capacidade de proliferação ao longo do tempo. Estes são processos típicos associados ao envelhecimento cutâneo, sendo a disfunção dos fibroblastos dérmicos determinante para as mudanças fenotípicas apresentadas na pele envelhecida (Uitto e Bernstein, 1998; Jenkins, 2002; Tigges et al., 2014).

O impacto exercido pelo tratamento com os extratos sobre a viabilidade celular dos fibroblastos foi avaliado pelo ensaio do MTT. Este ensaio demonstrou que o tratamento com os extratos não foi capaz de aumentar a viabilidade celular dos fibroblastos e, que para todas as concentrações utilizadas, houve diminuição da viabilidade celular. Apesar da diminuição, a viabilidade celular dos fibroblastos permaneceu acima de 80% para as concentrações de 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato do fungo I e para todas as concentrações testadas para o extrato do fungo II (Figura 5). Somente o tratamento com as concentrações de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do fungo I diminuíram a viabilidade celular para valores menores que 80%. Por se tratar de extratos brutos, há a possibilidade dos mesmos reunirem tanto substâncias tóxicas quanto substâncias capazes de aumentar a viabilidade celular dos fibroblastos. Assim, o fracionamento desses extratos seguido de uma nova avaliação de citotoxicidade com as frações obtidas poderia revelar frações que não apresentem atividade tóxica significativa ou mesmo a presença de alguma substância com capacidade de aumentar a viabilidade celular.

A hipótese do estresse oxidativo é uma das teorias mais aceitas para explicar o processo de envelhecimento. A produção de espécies reativas de oxigênio é inerente à função normal das células aeróbias, porém o aumento intracelular de moléculas oxidantes é responsável por causar danos a diversos componentes da célula e por desencadear vias de sinalização específicas que, ao longo do tempo, podem provocar disfunção celular e tecidual (Finkel e Holbrook, 2000; Giorgio et al., 2007). Tem sido demonstrado que no envelhecimento há aumento do estresse oxidativo intracelular, que se deve principalmente ao fato da capacidade de defesa contra ERO ser progressivamente diminuída durante o período de vida do indivíduo (Giorgio et al., 2007). Para minimizar os possíveis danos promovidos pelo estresse oxidativo, as células aeróbias possuem sistemas de defesa antioxidante que incluem compostos enzimáticos e não-enzimáticos. A defesa enzimática contra ERO envolve

a ação cooperativa da ação de diversas enzimas, incluindo a SOD e a catalase. A primeira catalisa a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto a segunda está envolvida na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A modulação da atividade dessas enzimas antioxidantes pode conferir proteção contra o estresse oxidativo (Hu et al., 2011).

Neste estudo, o peróxido de hidrogênio foi utilizado para induzir o estresse oxidativo nas células. A determinação da concentração adequada de peróxido de hidrogênio a ser utilizada para esta finalidade foi obtida após realização do ensaio de avaliação da peroxidação lipídica, que mostrou que o tratamento com qualquer das três concentrações de H₂O₂ testadas, 300 µM, 500 µM ou 1000 µM, foi capaz de induzir o estresse oxidativo, demonstrado pelo aumento na formação de produtos da peroxidação lipídica (Figura 6). Partindo-se da premissa que o estresse oxidativo é um fator que influencia a capacidade de resposta adaptativa do organismo, estudos foram feitos para avaliar a capacidade de defesa dessas células frente ao estresse oxidativo e o papel do tratamento com os extratos nesse processo.

As atividades da SOD e da catalase foram alteradas pelo tratamento das células com o peróxido de hidrogênio, havendo diminuição significativa da atividade da SOD (Figura 7) e da catalase (Figura 8), esta última com uma diminuição de cerca de 45% da atividade, evidenciando que o tratamento com H₂O₂ foi capaz de interferir na capacidade de defesa antioxidante das células, tornando-as mais suscetíveis aos danos promovidos pelo estresse oxidativo, dado que a diminuição da atividade da enzima catalase está relacionada ao acúmulo de ERO envolvidas com mudanças em vias de sinalização intracelular, que apresentam papel importante nos processos que desencadeiam o envelhecimento cutâneo (Tigges et al., 2014).

O tratamento dos fibroblastos com os metabólitos produzidos pelos fungos influenciou de forma diferente a atividade de ambas as enzimas. Os resultados obtidos para a atividade da SOD mostraram que o tratamento com o peróxido de hidrogênio aliado ao tratamento com os extratos levou a uma diminuição considerável da atividade desta enzima, principalmente para os tratamentos com o extrato do fungo II. Contudo, o tratamento com os extratos foi capaz de reverter parcialmente a diminuição na atividade da enzima catalase induzida pelo tratamento com o H₂O₂, com observação de aumento na atividade desta enzima para o tratamento com o extrato de ambos os fungos.

Tem sido demonstrado que na derme de indivíduos idosos a atividade da enzima catalase é menor quando comparada com a derme de indivíduos jovens, e que também é menor na pele envelhecida extrinsecamente quando comparada com a envelhecida intrinsecamente, enquanto que não há alteração na atividade da SOD nessas condições (Rhie et al., 2001; Shin et al., 2005). Pelos resultados observados na Figura 8, o ensaio de indução do estresse oxidativo nos fibroblastos conseguiu simular a situação de envelhecimento extrínseco, uma vez que conseguiu reduzir a atividade da catalase significativamente. Apesar do tratamento com o extrato do fungo I não ter conseguido restabelecer a atividade da CAT no mesmo nível das células não submetidas ao estresse oxidativo, foi possível observar uma clara tendência de aumento da atividade da CAT quando comparada a das células estressadas. Isso sugere que, no caso de células envelhecidas extrinsecamente, o tratamento com o extrato poderia iniciar um restabelecimento, ao menos em parte, do equilíbrio redox das células.

O fato do aumento da expressão da catalase conseguir prolongar o tempo de vida de camundongos, e do desequilíbrio das enzimas antioxidantes ser determinante da senescência celular, faz com que a utilização de compostos capazes de aumentar a atividade da catalase seja benéfica no tratamento do envelhecimento, pois o decréscimo do peróxido de hidrogênio está associado à reversão do aumento da fosforilação de JNK e p38 e, conseqüentemente, no decréscimo da expressão basal da MMP-1 (Schriner et al., 2005; Shin et al., 2005; Briganti et al., 2008).

O aumento da atividade da SOD sem aumento concomitante das enzimas que degradam o peróxido de hidrogênio foi observada em fibroblastos senescentes quando comparados com fibroblastos jovens, que mostram um perfeito balanço de enzimas antioxidantes (Briganti et al., 2008). Tem sido mostrado que superexpressão de SOD em células modificadas por engenharia genética provoca aumento na expressão da MMP-1, através do aumento da concentração de peróxido de hidrogênio. O aumento das concentrações intracelulares desta espécie reativa do oxigênio promove o recrutamento de ambos os membros do AP-1, c-Jun e c-Fos, para a região proximal e distal do promotor da MMP-1. Este aumento da ligação dos fatores de transcrição no promotor da MMP-1 em modelos que superexpressam a SOD é parcialmente revertida com a co-expressão da catalase (Nelson et al., 2006;

Bartling et al., 2014). Os resultados obtidos para a atividade de SOD e CAT nas células tratadas com os extratos sugerem que este tratamento pode ter provocado diminuição da concentração intracelular de peróxido de hidrogênio, dado que houve diminuição da atividade da enzima responsável pela formação do H₂O₂ e aumento parcial da atividade da enzima responsável por degradá-lo, e isto pode ter exercido influência em vias de sinalização intracelular, nas quais o H₂O₂ apresenta papel relevante.

O tratamento dos fibroblastos com o peróxido de hidrogênio exerceu impacto na expressão gênica da metaloproteinase do tipo I, aumentando em mais de 2 vezes sua expressão em relação aos fibroblastos não expostos ao estresse oxidativo (Figura 15). O aumento no nível de expressão da MMP-1 é comumente associado a elevações das concentrações de H₂O₂, que é uma espécie reativa livremente difusível capaz de agir como mensageiro secundário em eventos celulares. Alteração no estado de equilíbrio do H₂O₂ aumenta a sinalização de quinases, que modificam componentes de iniciação do complexo de transcrição levando a uma alta produção de MMP-1. Aumento da expressão da MMP-1 também está relacionado à peroxidação da membrana celular, com a formação de hidroperóxidos lipídicos, o que ativa as cascatas de sinalização dependentes de AP-1 e leva ao aumento da expressão dessa enzima (Nelson et al., 2006; Briganti et al., 2008; Bartling et al., 2014).

A alteração do estado de equilíbrio do H₂O₂ nos fibroblastos utilizados neste estudo pode ter sido promovida pelo tratamento com 300 µM de H₂O₂. Aliado a isso, observa-se também que nos fibroblastos tratados somente com H₂O₂ a atividade da SOD permaneceu acima de 90%, enquanto a atividade da catalase diminuiu para 55,39%, o que pode ter contribuído para um aumento ainda maior das concentrações intracelulares de H₂O₂.

O tratamento dos fibroblastos com o extrato do fungo I conseguiu promover diminuição da expressão da MMP-1 de forma dose dependente, porém nos fibroblastos tratados com o extrato do fungo II houve tendência de aumento da expressão desta enzima (Figura 17). As diferenças apresentadas na ação de ambos os extratos pode ser atribuída à diferença apresentada em suas atividades antioxidantes. O extrato do fungo I, além de apresentar atividade antioxidante maior que o extrato do fungo II quando avaliado pelo ensaio do sequestro do DPPH·,

também conseguiu induzir aumento maior na atividade da catalase do que o observado para as células tratadas com o extrato do fungo II, estas ações podem ter auxiliado as células a diminuir o estresse provocado pelo tratamento com o peróxido de hidrogênio.

A derme é responsável por conferir elasticidade, resiliência, resistência e força à pele. A matriz extracelular dérmica é composta majoritariamente por fibras de colágeno do tipo I e a fragmentação progressiva desta matriz tem importantes consequências, que incluem a diminuição da força geral da pele, o favorecimento da formação de rugas e criação de um ambiente propício para a formação de tumores, além de sua progressão (Fisher et al., 2009; Mancini et al., 2014; Rittié e Fisher, 2015).

A diminuição da quantidade de colágeno do tipo I e do tipo III é observada com o avanço da idade, sendo que esta diminuição é mais proeminente na pele exposta ao sol que na pele não exposta. Estudo que avaliou alterações nos componentes estruturais da pele do rosto e do abdômen de 38 pacientes, cuja idade variava de 6 a 84 anos, mostrou que há alteração significativa na quantidade de colágeno do tipo I e do tipo III nas peles de jovens e idosos, sendo a diminuição da concentração destes tipos de colágeno mais proeminente na pele de idosos, com destaque para a pele exposta ao sol (Chung et al., 2001; El-Domyati et al., 2002).

Estudos têm mostrado que o estresse oxidativo atua nas vias de síntese do colágeno alterando principalmente a sinalização do TGF- β e SMAD, esta ação aliada às observadas para a expressão das metaloproteinases atuam de forma sincronizada para diminuição do conteúdo de colágeno da derme (Choi et al., 2007; Natarajan et al., 2014). Como demonstrado na Figura 15, o tratamento dos fibroblastos com peróxido de hidrogênio provocou diminuição da expressão do colágeno do tipo I, evidenciando que esta espécie reativa de oxigênio é capaz de interferir nas vias de sinalização envolvidas na síntese do colágeno do tipo I.

Nas células tratadas com ambos os extratos houve tendência de aumento da expressão do colágeno do tipo I (Figura 16), o que demonstra que ambos os extratos podem atuar de forma benéfica na produção desta proteína essencial para as funções da pele.

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) são uma família de proteínas capazes de se ligar diretamente às MMP e inibir sua atividade catalítica. A

expressão das MMP e TIMP é regulada de forma coordenada para evitar a atividade excessiva das MMP (Fisher et al., 2009). As espécies reativas de oxigênio levam a um desequilíbrio entre a produção e a degradação dos componentes da matriz extracelular. Elas provocam diminuição da síntese de colágeno e aumento da produção de enzimas que degradam esta proteína, assim a ação do TIMP é importante para inibir as MMP e ajudar a restaurar o equilíbrio. O tratamento dos fibroblastos com o H₂O₂ levou a um desequilíbrio no balanço de expressão entre MMP-1 e TIMP-1, pois houve aumento na expressão do MMP-1 sem aumento concomitante da expressão do TIMP-1 (Figura 15). Este resultado foi similar ao resultado encontrado para a expressão de metaloproteinase e TIMP na pele envelhecida extrinsecamente, onde houve aumento na expressão de metaloproteinases, enquanto não houve alteração na expressão do TIMP (Quan et al., 2013).

Os níveis de expressão do TIMP-1 nas células tratadas com os extratos variaram para ambos os extratos testados, de modo que as células tratadas com o extrato do fungo I apresentaram tendência de diminuição da expressão de TIMP-1 para as duas maiores concentrações testadas, enquanto o tratamento com o extrato do fungo II provocou uma tendência de aumento da expressão deste gene na maior concentração testada (Figura 18). Considerando que o tratamento com o extrato do fungo II também apresentou tendência de aumento na expressão da MMP-1, há a possibilidade da tendência de aumento do TIMP-1 ser importante na promoção do balanço de ambos.

A atividade das MMP é regulada em diversos níveis, incluindo regulação da transcrição, conversão da pró-enzima para a forma ativa e inibição pelos inibidores teciduais de MMP (Arakaki et al., 2009; Sárdy, 2009). Análises da expressão e atividade de metaloproteinases na pele de indivíduos jovens e idosos mostraram que há maior expressão e atividade destas em indivíduos idosos. Além disso, a comparação entre a produção de metaloproteinases na pele exposta ao sol e na pele não exposta também demonstra que a produção destas enzimas é maior no segundo caso (Chung et al., 2001).

Além da MMP-1, outras metaloproteinases que são importantes no processo de envelhecimento cutâneo são as gelatinases, MMP-2 e MMP-9. A pele de idosos, além de apresentar maiores níveis de MMP-1 quando comparada com a pele

de jovens, também apresenta maior atividade da MMP-2 e MMP-9 (Chung et al., 2001).

Para avaliar a influência dos tratamentos com os extratos sobre a atividade dessas foi realizado o ensaio de zimografia. Neste ensaio não foi observada atividade para a MMP-9, mas os resultados sugerem uma influência do tratamento com os extratos dos fungos sobre a atividade da MMP-2 nos fibroblastos. A análise qualitativa da atividade proteolítica das enzimas no gel de poliacrilamida com gelatina mostrou que o tratamento com o peróxido de hidrogênio induziu aumento da atividade de ambas as formas da MMP-2, a pró-ativa e a ativa. Os tratamentos com o extrato do fungo I nas concentrações de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e com o extrato do fungo II na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveram diminuição da atividade de ambas as formas desta enzima. Contudo, atividade considerável de ambas as formas da MMP-2 foi encontrada para as concentrações de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato do fungo I e de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato do fungo II (Figura 19).

O aumento da atividade das gelatinases em resposta ao estresse oxidativo abre espaço para a exploração da ação de substâncias antioxidantes na atividade destas enzimas (Alge-Priglinger et al., 2009). Estudos com polifenóis mostraram que estes são capazes de inibir a atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9 (Demeule et al., 2000). Da mesma forma, há a possibilidade de que a inibição da atividade da MMP-2 nos fibroblastos tratados com metabólitos dos fungos possa ser atribuída aos compostos polifenólicos presentes nos extratos.

6. CONCLUSÃO

- Fungos endofíticos isolados das folhas de *Bauhinia variegata* foram capazes de produzir compostos polifenólicos e flavonóides com atividade antioxidante.
- A viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos permaneceu acima de 80% após o tratamento com a maior parte das concentrações testadas para o extrato do fungo I e para todas as concentrações testadas do extrato do fungo II.
- O tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com os extratos destes fungos exerceu uma influência na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, com diminuição da atividade da primeira e tendência de aumento na atividade da segunda.
- O tratamento das células com o extrato do fungo I provocou uma tendência de aumento na expressão do COL1A1, diminuição da expressão da MMP-1 e tendência de diminuição da expressão do TIMP-1.
- O tratamento das células com o extrato do fungo II provocou uma tendência de aumento na expressão do COL1A1, da MMP-1 e do TIMP-1.
- Ambos os extratos foram capazes de diminuir a atividade da MMP-2 nos fibroblastos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelin, E., C. Servy, et al. (2011). "Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA." Phytochemistry 72(18): 2406-2412.

Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol. 105: 121-126.

Alge-Priglinger, C. S., T. Kreutzer, et al. (2009). "Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells." Investigative ophthalmology & visual science 50(11): 5495-5503.

Alnuqaydan, A. M., C. E. Lenehan, et al. (2015). "Extracts from *Calendula officinalis* Offer in Vitro Protection Against H₂O₂ Induced Oxidative Stress Cell Killing of Human Skin Cells." Phytotherapy Research 29(1): 120-124.

Arakaki, P., M. Marques, et al. (2009). "MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes." Journal of biosciences 34(2): 313-320.

Aruoma, O. I. (1998). "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease." Journal of the American Oil Chemists' Society 75(2): 199-212.

Aslam, M. N., E. P. Lansky, et al. (2006). "Pomegranate as a cosmeceutical source: pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells." Journal of ethnopharmacology 103(3): 311-318.

Bae, J.-Y., J.-S. Choi, et al. (2008). "(-) Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase." Food and Chemical Toxicology 46(4): 1298-1307.

Bailey, A. J., R. G. Paul, et al. (1998). "Mechanisms of maturation and ageing of collagen." Mechanisms of ageing and development 106(1): 1-56.

Barroso, M. R., L. Barros, et al. (2014). "Exploring the antioxidant potential of Helichrysum stoechas (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer." Industrial Crops and Products 53: 330-336.

Bartling, T., S. Subbaram, et al. (2014). "Redox-sensitive gene regulatory events controlling aberrant matrix metalloproteinase-1 expression." Free Radical Biology and Medicine.

Baumann, L. (2007). "Skin ageing and its treatment." The Journal of pathology 211(2): 241-251.

Bickers, D. R. and M. Athar (2006). "Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease." Journal of Investigative Dermatology 126(12): 2565-2575.

Briganti, S. and M. Picardo (2003). "Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new." Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 17(6): 663-669.

Briganti, S., M. Wlaschek, et al. (2008). "Small molecular antioxidants effectively protect from PUVA-induced oxidative stress responses underlying fibroblast senescence and photoaging." Free Radical Biology and Medicine 45(5): 636-644.

Chan, C.-F., W.-Y. Huang, et al. (2014). "Potent antioxidative and UVB protective effect of water extract of Eclipta prostrata L." The Scientific World Journal 2014.

Chang, C.-C., M. H. Yang, et al. (2002). "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods." Journal of food and drug analysis 10(3): 178-182.

Chiang, H.-M., H.-C. Chen, et al. (2012). "Michelia alba extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts." Food and Chemical Toxicology 50(12): 4260-4269.

Chiang, H.-M., T.-J. Lin, et al. (2011). "Coffea arabica extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway." Food and Chemical Toxicology 49(1): 309-318.

Choi, H.-k., D.-h. Kim, et al. (2010). "Labisia pumila extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation." Journal of Bioscience and Bioengineering 109(3): 291-296.

Choi, M. S., M. S. Yoo, et al. (2007). "Increase of collagen synthesis by obovatol through stimulation of the TGF- β signaling and inhibition of matrix metalloproteinase in UVB-irradiated human fibroblast." Journal of dermatological science 46(2): 127-137.

Chung, J. H., J. Y. Seo, et al. (2001). "Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo." Journal of Investigative Dermatology 117(5): 1218-1224.

Clark, I. M., T. E. Swingler, et al. (2008). "The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors." The international journal of biochemistry & cell biology 40(6): 1362-1378.

Cronin, H. and Z. D. Draelos (2010). "Original Contribution: Top 10 botanical ingredients in 2010 anti-aging creams." Journal of cosmetic dermatology 9(3): 218-225.

de Barros, B. S., J. P. da Silva, et al. (2011). "Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice." Journal of natural medicines 65(3-4): 526-531.

Demeule, M., M. Brossard, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology 1478(1): 51-60.

El-Domyati, M., S. Attia, et al. (2002). "Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin." Experimental dermatology 11(5): 398-405.

Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature 408(6809): 239-247.

Fisher, G. J., S. Kang, et al. (2002). "Mechanisms of photoaging and chronological skin aging." Archives of dermatology 138(11): 1462-1470.

Fisher, G. J., T. Quan, et al. (2009). "Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin." The American journal of pathology 174(1): 101-114.

Gilchrest, B. (1996). "A review of skin ageing and its medical therapy." British Journal of Dermatology 135(6): 867-875.

Gilchrest, B. A. (1989). "Skin aging and photoaging: an overview." Journal of the American Academy of Dermatology 21(3): 610-613.

Giorgio, M., M. Trinei, et al. (2007). "Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?" Nature Reviews Molecular Cell Biology 8(9): 722-728.

Gunatilaka, A. L. (2006). "Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence." Journal of Natural Products 69(3): 509-526.

Haake, A., G. A. Scott, et al. (2001). "Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis." The biology of the skin 2001: 19-45.

Harman, D. (1955). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry."

Hu, W., W. Han, et al. (2011). "Protective effect of the methanolic extract from *Duchesnea indica* against oxidative stress in vitro and in vivo." Environmental toxicology and pharmacology 31(1): 42-50.

Huang, Q., H. An, et al. (2014). "Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Kadsura angustifolia*." Research in microbiology.

Huang, W.-Y., Y.-Z. Cai, et al. (2007). "A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants." Economic botany 61(1): 14-30.

Huang, W., Y. Cai, et al. (2008). "Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants." Fungal Divers 33(1560-2745): 61-75.

Hwang, K.-A., B.-R. Yi, et al. (2011). "Molecular mechanisms and in vivo mouse models of skin aging associated with dermal matrix alterations." Laboratory animal research 27(1): 1-8.

Jackson, M., J. P. Karwowski, et al. (1993). "Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. I. Production, taxonomy of the producing organism and biological activity." The journal of Antibiotics 46(1): 34-38.

Jenkins, G. (2002). "Molecular mechanisms of skin ageing." Mechanisms of ageing and development 123(7): 801-810.

Kaul, S., S. Gupta, et al. (2012). "Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites." Phytochemistry Reviews 11(4): 487-505.

Klass, M. R. (1977). "Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span." Mechanisms of ageing and development 6: 413-429.

Kohen, R. and I. Gati (2000). "Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress." Toxicology 148(2): 149-157.

Kohl, E., J. Steinbauer, et al. (2011). "Skin ageing." Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 25(8): 873-884.

Kusari, S., C. Hertweck, et al. (2012). "Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites." Chemistry & biology 19(7): 792-798.

Leu, S. J., Y. P. Lin, et al. (2006). "Phenolic constituents of *Malus doumeri* var. *formosana* in the field of skin care." Biological and Pharmaceutical Bulletin 29(4): 740.

Liu, K., X. Ding, et al. (2009). "Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*." Journal of industrial microbiology & biotechnology 36(9): 1171-1177.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J biol Chem 193(1): 265-275.

Mancini, M., A. M. Lena, et al. (2014). "MicroRNAs in human skin ageing." Ageing research reviews 17: 9-15.

Martini, A. G. (2013). "GQ-16, agonista parcial de PPAR γ , diminui proliferação de células mesangiais humanas."

Masaki, H. (2010). "Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects." Journal of dermatological science 58(2): 85-90.

Massagué, J. (1998). "TGF- β signal transduction." Annual review of biochemistry 67(1): 753-791.

Mesquita, P. G. (2012). "Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata*: busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes."

Mine, S., N. O. Fortunel, et al. (2008). "Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging." PLoS One 3(12): e4066.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of immunological methods 65(1): 55-63.

Natarajan, V. T., P. Ganju, et al. (2014). "Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation." Nature chemical biology 10(7): 542-551.

Nath, A., P. Raghunatha, et al. (2012). "Diversity and biological activities of endophytic fungi of *Emblca officinalis*, an ethnomedicinal plant of India." mycobiology 40(1): 8-13.

Naylor, E. C., R. E. Watson, et al. (2011). "Molecular aspects of skin ageing." Maturitas 69(3): 249-256.

Nelson, K. K., S. Subbaram, et al. (2006). "Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs." Journal of Biological Chemistry 281(20): 14100-14110.

Nichols, J. A. and S. K. Katiyar (2010). "Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms." Archives of dermatological research 302(2): 71-83.

Ohkawa, H., N. Ohishi, et al. (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." Analytical biochemistry 95(2): 351-358.

Pamplona, R. (2008). "Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1777(10): 1249-1262.

Quan, T., E. Little, et al. (2013). "Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function." The Journal of investigative dermatology 133(5): 1362.

Quan, T. and G. Fisher (2015). "Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review." Gerontology.

Ratz-Łyko, A., J. Arct, et al. (2015). "Influence of Polyphenols on the Physiological Processes in the Skin." Phytotherapy Research.

Raut, S., S. S. Bhadoriya, et al. (2012). "Lecithin organogel: a unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging." Acta Pharmaceutica Sinica B 2(1): 8-15.

Rhie, G.-e., M. H. Shin, et al. (2001). "Aging-and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo." Journal of Investigative Dermatology 117(5): 1212-1217.

Rittié, L. and G. J. Fisher (2015). "Natural and Sun-Induced Aging of Human Skin." Cold Spring Harbor perspectives in medicine 5(1): a015370.

Rukachaisirikul, V., U. Sommart, et al. (2008). "Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15." Phytochemistry 69(3): 783-787.

Sárdy, M. (2009). "Role of matrix metalloproteinases in skin ageing." Connective tissue research 50(2): 132-138.

Schriner, S. E., N. J. Linford, et al. (2005). "Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria." science 308(5730): 1909-1911.

Shin, M. H., G.-e. Rhie, et al. (2005). "H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin in vivo." Journal of Investigative Dermatology 125(2): 221-229.

Singh, R. P. and R. Agarwal (2009). "Cosmeceuticals and silibinin." Clinics in dermatology 27(5): 479-484.

Singleton, V. L. and J. A. Rossi (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." American journal of Enology and Viticulture 16(3): 144-158.

Stierle, A., G. Strobel, et al. (1993). "Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew." science 260(5105): 214-216.

Strobel, G., B. Daisy, et al. (2004). "Natural products from endophytic microorganisms. I." Journal of Natural Products 67(2): 257-268.

Strobel, G. A. (2014). "Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons." Natural product reports 31(2): 259-272.

Svobodová, A., J. Psotová, et al. (2003). "Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 147(2): 137-145.

Tan, R. and W. Zou (2001). "Endophytes: a rich source of functional metabolites." Natural product reports 18(4): 448-459.

Thring, T. S., P. Hili, et al. (2009). "Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants." BMC complementary and Alternative Medicine 9(1): 27.

Tianpanich, K., S. Prachya, et al. (2010). "Radical scavenging and antioxidant activities of isocoumarins and a phthalide from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp." Journal of Natural Products 74(1): 79-81.

Tigges, J., J. Krutmann, et al. (2014). "The hallmarks of fibroblast ageing." Mechanisms of ageing and development 138: 26-44.

Tiwari, S., S. Singh, et al. (2014). "Isolation, structure determination, and antiaging effects of 2, 3-pentenediol from endophytic fungus of *Curcuma amada* and docking studies." Protoplasma 251(5): 1089-1098.

Uitto, J. and E. F. Bernstein (1998). Molecular mechanisms of cutaneous aging: connective tissue alterations in the dermis. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, Nature Publishing Group.

Varani, J., M. K. Dame, et al. (2006). "Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation." The American journal of pathology 168(6): 1861-1868.

Vayalil, P. K., A. Mittal, et al. (2004). "Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin." Journal of Investigative Dermatology 122(6): 1480-1487.

Verrecchia, F., M.-L. Chu, et al. (2001). "Identification of novel TGF- β /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach." Journal of Biological Chemistry 276(20): 17058-17062.

Weber, D., O. Sterner, et al. (2004). "Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*." The journal of Antibiotics 57(9): 559-563.

Wen, K.-C., I. Shih, et al. (2010). "Inhibitory effects of *Terminalia catappa* on UVB-induced photodamage in fibroblast cell line." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011.

Weydert, C. J. and J. J. Cullen (2010). "Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue." Nature protocols 5(1): 51-66.

Yaar, M. and B. A. Gilchrest (1998). Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, Nature Publishing Group.

Yaar, M. and B. A. Gilchrest (2007). "Photoageing: mechanism, prevention and therapy." British Journal of Dermatology 157(5): 874-887.

Yadav, T., S. Mishra, et al. (2015). "Anticedants and natural prevention of environmental toxicants induced accelerated aging of skin." Environmental toxicology and pharmacology 39(1): 384-391.

Ye, Y., Y. Xiao, et al. (2013). "Flavipin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity." Applied microbiology and biotechnology 97(16): 7131-7139.

Zeng, J.-p., B. Bi, et al. (2014). "Repeated exposure of mouse dermal fibroblasts at a sub-cytotoxic dose of UVB leads to premature senescence: A robust model of cellular photoaging." Journal of dermatological science 73(1): 49-56.

Zhao, J., Y. Fu, et al. (2012). "Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] produce antioxidant cajaninstilbene acid." Journal of agricultural and food chemistry 60(17): 4314-4319.

Zhao, J., D. Ma, et al. (2014). "In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]." Food Research International 56: 243-251.

Zouboulis, C. C. and E. Makrantonaki (2011). "Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging." Clinics in dermatology 29(1): 3-14.