

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LAÍZA MAGALHÃES DE ARAÚJO

**Efeito quimioprotetor de metabólitos secundários de fungo endofítico (BvFII)
isolado de folhas da *Bauhinia variegata* em fibroblastos dérmicos humanos.**

BRASÍLIA

2019

LAÍZA MAGALHÃES DE ARAÚJO

**Efeito quimioprotetor de metabólitos secundários de fungo endofítico (BvFII)
isolado de folhas da *Bauhinia variegata* em fibroblastos dérmicos humanos**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
da Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

**BRASÍLIA
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Me Magalhães de Araújo, Laíza
 Efeito quimioprotetor de metabólitos secundários de fungo
 endofítico (BvFII) isolado de folhas da Bauhinia variegata
 em fibroblastos dérmicos humanos. / Laíza Magalhães de
 Araújo; orientador Maria de Fátima Borin. -- Brasília, 2019.
 111 p.

 Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -
 Universidade de Brasília, 2019.

 1. Envelhecimento. 2. Pele. 3. Fungo endofítico. 4.
 Receptores ativados por proliferadores peroxissomais. 5.
 Antioxidante. I. de Fátima Borin, Maria, orient. II. Título.

LAÍZA MAGALHÃES DE ARAÚJO

**Efeito quimioprotetor de metabólitos secundários de fungo endofítico (BvFII)
isolado de folhas da *Bauhinia variegata* em fibroblastos dérmicos humanos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 12 de abril de 2019.

BANCA EXAMINADORA

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

**Profa. Dra. Angélica Amorim Amato
Universidade de Brasília**

**Prof. Dra. Caroline Lourenço de Lima
Universidade de Brasília**

**Dra. Cinthia Gabriel Meireles
Ministério da Saúde**

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

Aos meus amados pais,
À minha avó Antônia,
Ao meu avô Agenor (*in memoriam*),
Aos meus queridos irmãos,
A todos da minha família.

AGRADECIMENTOS

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

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

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.

Aos meus amigos do laboratório Daniela, Michelly, Rafael, Ádria, Natália, Karina, Palloma, Simone, Paloma, Érica, Cinthia, Carolina, Pedro, Hanna e Manuel pelo companheirismo e pela ajuda em diversas etapas da pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica Pedro Júnior e Palloma Soares pela dedicação e auxílio na realização deste trabalho.

A todos os professores e alunos do Laboratório de Farmacologia Molecular.

À Universidade de Brasília.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001, da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) - Edital 03/2015 - Demanda Espontânea, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo: 407851/2013-5.

*“O sonho encheu a noite
Extravasou pro meu dia
Encheu minha vida
E é dele que eu vou viver
Porque sonho não morre.”*

Adélia Prado

RESUMO

Magalhães de Araújo, Laíza. **Efeito quimioprotetor de metabólitos secundários de fungo endofítico (BvFII) isolado de folhas da *Bauhinia variegata* em fibroblastos dérmicos humanos**: Brasília, 2019. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

O envelhecimento cutâneo está associado com a perda gradual dos mecanismos de homeostase que mantêm a estrutura e função da pele tornando-a mais suscetível ao desenvolvimento de diversas patologias. Fatores intrínsecos e extrínsecos atuam de forma conjunta para induzir o envelhecimento cutâneo e a modulação de vias de sinalização envolvidas na manutenção da homeostase da pele, constitui-se como aspecto importante para a prevenção do envelhecimento cutâneo precoce. Neste sentido, os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) podem ser explorados como alvos potenciais por serem capazes de regular a função e expressão de genes importantes para a manutenção da homeostase da pele como as metaloproteinases de matriz (MMPs) e o colágeno, além de atuar na modulação do sistema de defesa antioxidante celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito quimioprotetor de metabólitos do fungo endofítico BvFII isolado de folhas de *Bauhinia variegata* em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo. Os metabólitos do fungo endofítico foram caracterizados quanto ao teor de polifenóis, flavonoides e atividade antioxidante, e nas células tratadas com esses metabólitos foram avaliadas a modulação da atividade do PPAR α , β/δ e γ , a capacidade antioxidante celular, a expressão de genes importantes para o processo de envelhecimento cutâneo e sua influência sobre o retardo da indução da senescência celular. Os resultados obtidos mostraram que metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico BvFII são ricos em compostos polifenólicos, são capazes de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, de modular a ativação do PPAR α e PPAR γ , diminuir a expressão de MMP-1 e atenuar o fenótipo relacionado à senescência celular em fibroblastos senescentes. Desta forma, os produtos naturais produzidos por fungos endofíticos demonstraram potencial em agir em variáveis importantes para o processo de envelhecimento cutâneo e podem ser explorados como agentes capazes de prevenir o envelhecimento precoce da pele.

Palavras-chave: envelhecimento; pele; metaloproteinases; receptores ativados por proliferadores peroxissomais; antioxidante; fungo endofítico.

ABSTRACT

Magalhães de Araújo, Laíza. **Chemoprotective effects of secondary metabolites of endophytic fungus (BvFII) isolated from *Bauhinia variegata* in human dermal fibroblasts.** Brasília, 2019. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

Skin aging is associated with the gradual loss of homeostasis mechanisms that maintain the structure and function of the skin making it more susceptible to the development of several pathologies. Intrinsic and extrinsic factors act together to induce skin aging and the modulation of signaling pathways involved in the maintenance of skin homeostasis is an important aspect for the prevention of premature skin aging. Thus, peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) can be exploited as potential targets for regulation of the function and expression of genes important for skin homeostasis maintenance such as matrix metalloproteinases (MMPs) and collagen and for the modulation of the cellular antioxidant defense system. The objective of this work was to evaluate the chemoprotective effect of BvFII endophytic fungi isolated from leaves of *Bauhinia variegata* on human dermal fibroblasts exposed to oxidative stress. The metabolites of the endophytic fungus were characterized in terms of polyphenol content, flavonoids and antioxidant activity, and the cells treated with these metabolites were evaluated for the modulation of PPAR α , β/δ and γ activity, cellular antioxidant capacity, expression of important genes for the skin aging process and the influence on the delay of induction of cellular senescence. The results obtained showed that secondary metabolites produced by BvFII endophytic fungi are rich in polyphenolic compounds, are able to increase the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase, modulate the activation of PPAR α and PPAR γ , decrease MMP-1 expression and attenuate the phenotype related to cellular senescence in senescent fibroblasts. In this way, the natural products produced by endophytic fungi demonstrated the potential to act on important variables for the skin aging process and can be exploited as agents capable of preventing premature aging of the skin.

Keywords: aging; skin; metalloproteinases; peroxisomal proliferator-activated receptor; antioxidant; endophytic fungus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele.....	4
Figura 2. Características morfológicas da pele envelhecida intrinsecamente e da pele envelhecida extrinsecamente.....	7
Figura 3. Ativação de vias de sinalização celular na pele mediada por EROs.....	11
Figura 4. Defesa antioxidante enzimática da pele.....	15
Figura 5. Interação entre o fungo endofítico e a planta hospedeira	22
Figura 6. Esquema de fracionamento do extrato.....	27
Figura 7. Viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados com frações do extrato.	44
Figura 8. Viabilidade celular de células HeLa tratadas com frações do extrato.	46
Figura 9. Avaliação do efeito agonista das frações do extrato no PPAR α – ensaio do gene repórter.....	48
Figura 10. Avaliação do efeito agonista das frações do extrato no PPAR β/δ – ensaio do gene repórter.....	49
Figura 11. Avaliação do efeito agonista das frações do extrato no PPAR γ – ensaio do gene repórter.....	51
Figura 12. Ensaio de avaliação da atividade da SOD em fibroblastos tratados com frações do extrato de fungo endofítico.	53
Figura 13. Ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase em fibroblastos tratados com as frações do extrato.	55
Figura 14. Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida.	56
Figura 15. Avaliação da peroxidação lipídica	57
Figura 16. Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio por fluorescência	59
Figura 17. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com peróxido de hidrogênio na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados com a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica	61

Figura 18. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com o extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados com a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica	62
Figura 19. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com agonistas e antagonistas das três isoformas do PPAR na presença ou ausência do extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA da <i>MMP-1</i> em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo.	64
Figura 20. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com agonistas e antagonistas das três isoformas do PPAR na presença ou ausência do extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA do <i>COL1A1</i> em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo.	66
Figura 21. Influência do tratamento com peróxido de hidrogênio na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados à inflamação	67
Figura 22. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com o extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados à inflamação.....	68
Figura 23. Influência do tratamento com peróxido de hidrogênio na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados à via de sinalização das MAPK.	69
Figura 24. Influência do tratamento com o extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados à via de sinalização das MAPK.	70
Figura 25. Influência do tratamento com peróxido de hidrogênio, com o extrato bruto e fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA de genes <i>MKP7</i> e <i>NFE2L2</i>	71
Figura 26. Influência do tratamento com peróxido de hidrogênio, com o extrato bruto e fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA do <i>PPARα</i> , <i>PPARβ/δ</i> e <i>PPARγ</i>	72
Figura 27. Quantificação de colágeno no meio de cultivo de células HFF expostas ao estresse oxidativo e tratadas com o extrato bruto ou com a fração hexânica.	73
Figura 28. Avaliação da senescência celular associada à atividade da enzima β -galactosidase.	74
Figura 29. Síntese dos resultados.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento das frações do extrato do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp....	41
Tabela 2. Quantificação de polifenóis totais nas frações do extrato.....	41
Tabela 3. Quantificação de flavonoides totais nas frações do extrato.....	42
Tabela 4. Atividade antioxidante dos padrões e frações do extrato.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína ativadora-1
BHT	di-terc-butil metil fenol
CAT	Catalase
COL1A1	Colágeno do tipo I alfa-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DPPH.	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F. EtOAc	Fração de acetato de etila
F. DCM	Fração diclorometano
F. HA	Fração hidroalcoólica
F. HEX	Fração hexânica
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSH-px	Glutaciona peroxidase
GSSG	Glutaciona oxidada
HDAC2	Histona deacetilase-2
HFF	<i>Human foreskin fibroblasts</i>
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

JNK	Quinase c-Jun amino terminal
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MDA	Malondialdeído
MKP	MAPK fosfatase
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5- difenil-tetrazólio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
OPA	o-ftalaldeído
PCAF	P300/fator associado ao CBP
PBS	Tampão fostato de sódio e potássio, 1M, pH 7,4, com 0,8% de NaCl e 0,02% de KCl
PPAR	Receptores ativados por proliferadores peroxissomais
PPRE	Elemento responsivo ao proliferador de peroxissomas
PRX	Peroxirredoxinas
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RXR	Receptor do ácido 9-cis retinóico
SA-β-Gal	β-Galactosidase associada à senescência
SASP	Fenótipo secretor associado à senescência
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TA	Temperatura ambiente

TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TGF- β	Fator de transformação de crescimento β
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
UR	Umidade relativa
UV	Radiação ultravioleta
UVB	Radiação ultravioleta na faixa B do espectro (280 a 320 nm)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
SUMÁRIO.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Envelhecimento cutâneo	3
2.2. Mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento cutâneo.....	9
2.3. Sistema antioxidante cutâneo.....	13
2.4. Receptores ativados por proliferadores peroxissomais	16
2.5. Produtos naturais antienvelhecimento e fungos endofíticos	19
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Manutenção dos fungos e cultivo em cultura líquida submersa	26
4.2. Produção do extrato bruto e fracionamento.....	26
4.3. Avaliação do teor de polifenóis totais	27
4.4. Avaliação do teor de flavonoides totais	28
4.5. Avaliação da atividade antioxidante das frações do extrato pelo método do DPPH.....	28
4.6. Cultura de fibroblastos dérmicos humanos e de células HeLa	29
4.7. Avaliação indireta da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos e de células HeLa tratadas com as frações do extrato de fungos endofíticos.....	29
4.8. Ensaio de transfecção transiente e gene repórter	30
4.9. Tratamento das culturas de fibroblastos dérmicos humanos para os ensaios de avaliação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, quantificação da glutatona reduzida e peroxidação lipídica.	31
4.10. Quantificação de proteína.....	32
4.11. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase.....	32

4.12.	Avaliação da atividade da enzima catalase	33
4.13.	Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida.....	33
4.14.	Avaliação da peroxidação lipídica.....	34
4.15.	Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio 35	
4.16.	Extração de RNA e ensaio de RT-qPCR	36
4.17.	Quantificação da síntese de colágeno na cultura de células.	38
4.18.	Avaliação de senescência celular.....	39
4.19.	Análise estatística	40
5.	RESULTADOS	41
5.1.	Produção dos metabólitos dos fungos em cultura líquida submersa e avaliação do rendimento das frações do extrato.....	41
5.2.	Quantificação de polifenóis totais	41
5.3.	Quantificação de flavonoides totais	42
5.4.	Avaliação da atividade antioxidante.....	42
5.5.	Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos e de células HeLa tratados com as frações do extrato.	43
5.6.	Ensaio do gene repórter para os receptores PPAR α , β/δ e γ	47
5.7.	Ensaio de avaliação de atividade da enzima superóxido dismutase.	52
5.8.	Ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase.....	53
5.9.	Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida.....	56
5.10.	Peroxidação lipídica.....	57
5.11.	Detecção da geração de espécies reativas do oxigênio por fluorescência 58	
5.12.	Quantificação relativa da expressão gênica	60
5.12.1.	Quantificação relativa da expressão gênica de genes relacionados à manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica	60
5.12.2.	Quantificação relativa da expressão gênica de genes relacionados à inflamação.....	67
5.12.3.	Quantificação relativa da expressão gênica de genes relacionados à via de sinalização das proteínas-quinases ativadas por mitógenos e do <i>NFE2L2</i>	69
5.12.4.	Quantificação relativa da expressão gênica do <i>PPARα</i> , <i>PPARβ/δ</i> e <i>PPARγ</i> 72	
5.13.	Quantificação de colágeno	73

5.14.	Avaliação da Senescência.....	74
5.15.	Síntese dos resultados	75
6.	DISCUSSÃO.....	77
7.	CONCLUSÃO	89
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICE A – INFORMAÇÕES SOBRE OS PRIMERS E SONDAS TAQMAN.....		105

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento está associado com a perda gradual dos mecanismos de homeostase responsáveis por manter a estrutura e função dos tecidos adultos. Na pele, fatores genéticos e ambientais atuam de forma conjunta para promover as alterações envolvidas no processo de envelhecimento cutâneo, que incluem a disfunção mitocondrial, alterações em vias de transdução de sinal intracelulares, instabilidade genômica, senescência celular e degradação da matriz extracelular dérmica (Sorrentino et al., 2014; Kammeyer e Lutein, 2015).

O envelhecimento prematuro da pele manifesta-se pela indução acelerada da formação de rugas, descamação, aspereza, ressecamento, flacidez e anormalidades na pigmentação (Brand et al., 2017). A elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento é importante para o desenvolvimento de abordagens capazes de retardar sua progressão precoce e diminuir a incidência de patologias relacionadas a este processo, como o câncer de pele (de Magalhaes, 2013; Rogers et al., 2015).

Uma das teorias que visa explicar o processo de envelhecimento é a teoria do estresse oxidativo, que propõe que boa parte das alterações funcionais e morfológicas observadas durante o envelhecimento ocorrem devido a um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e sua eliminação. Espécies reativas do oxigênio (EROs) desempenham um papel importante no envelhecimento da pele. Estima-se que 1% a 5% do oxigênio consumido durante os processos metabólicos normais é convertido em EROs por mecanismos intrínsecos. Além disso, o aumento da produção de espécies reativas também ocorre devido à exposição da pele a fatores ambientais, como a poluição e a radiação ultravioleta (UV) (Poljsak et al., 2012; Kammeyer e Lutein, 2015).

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) têm sido considerados como alvos interessantes para prevenir ou retardar a ocorrência de eventos importantes para o desenvolvimento do envelhecimento cutâneo, já tendo sido mostrado que a ativação das três isoformas do PPAR está relacionada com a modulação do sistema de defesa antioxidante e da expressão de componentes

importantes para a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica (Ham et al., 2013; Jeon et al., 2015; Yin e Smith, 2016).

Produtos naturais são amplamente investigados como potenciais agentes capazes de atuar contra desordens que apresentam o estresse oxidativo como parte importante de sua fisiopatologia, uma vez que tais compostos apresentam capacidade de atuar como antioxidantes, anti-inflamatórios e imunomodulares (Calabrese et al., 2008; Agati et al., 2013). Os fungos endofíticos podem ser utilizados como fonte potencial de novos produtos naturais, dado que muitos compostos com estruturas novas e com atividade biológica já foram isolados destes micro-organismos (Gutierrez et al., 2012).

Neste trabalho, foi investigado o efeito biológico do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com os metabólitos produzidos pelo fungo endofítico BvFII isolado das folhas de *Bauhinia variegata*. Este fungo foi escolhido para a realização deste trabalho pelo fato de estudo anterior ter mostrado que o extrato bruto, composto por metabólitos produzidos por este fungo em cultura líquida submersa, apresenta atividade agonista de todas as isoformas do PPAR (Mesquita, 2016). Além disso, também já foi demonstrado que este extrato bruto foi capaz de diminuir a expressão da metaloproteinase de matriz do tipo 1 (MMP-1), diminuir a atividade da metaloproteinase de matriz do tipo 2 (MMP-2) e aumentar a atividade da enzima catalase em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo (Araújo, 2015).

Com o intuito de iniciar a purificação do extrato bruto, foi realizado o seu fracionamento para avaliar a atividade de metabólitos solúveis em solventes de polaridades distintas. Desta forma, neste trabalho são apresentados resultados tanto para o tratamento realizado com o extrato bruto quanto com suas frações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Envelhecimento cutâneo

A pele é o maior órgão do corpo humano e exerce papel essencial na saúde dos indivíduos por prover uma barreira física entre o organismo e o ambiente externo. Este órgão apresenta múltiplas funções fisiológicas e, além de atuar como barreira de proteção contra agressões físicas, químicas e microbiológicas, também participa da termorregulação, funciona como órgão sensorial e exerce funções endócrinas ao atuar na síntese da vitamina D e na conversão periférica de pró-hormônios (Menon, 2002; Yin e Smith, 2016; Yu et al., 2016; Gaur et al., 2017).

Estruturalmente, a pele é formada pela epiderme, derme e tecido subcutâneo (Yin e Smith, 2016) (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa da pele, sendo primariamente formada por queratinócitos que estão organizados em um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, o qual é composto por cinco camadas distintas, a basal, a espinhosa, a granulosa, a lúcida e o estrato córneo. Queratinócitos progenitores não diferenciados presentes na camada basal migram e se diferenciam através das respectivas camadas da epiderme para formar o estrato córneo que é rico em proteínas e em células anucleares denominadas corneócitos (Wahli, 2002; Rittié e Fisher, 2015; Yin e Smith, 2016). Os corneócitos estão imersos em uma matriz rica em lipídeos e são cruciais para a formação da barreira de permeabilidade que provê proteção contra a perda de água e eletrólitos e contra efeitos prejudiciais que podem ocorrer devido à exposição ao ambiente externo (Rittié e Fisher, 2015; Yin e Smith, 2016).

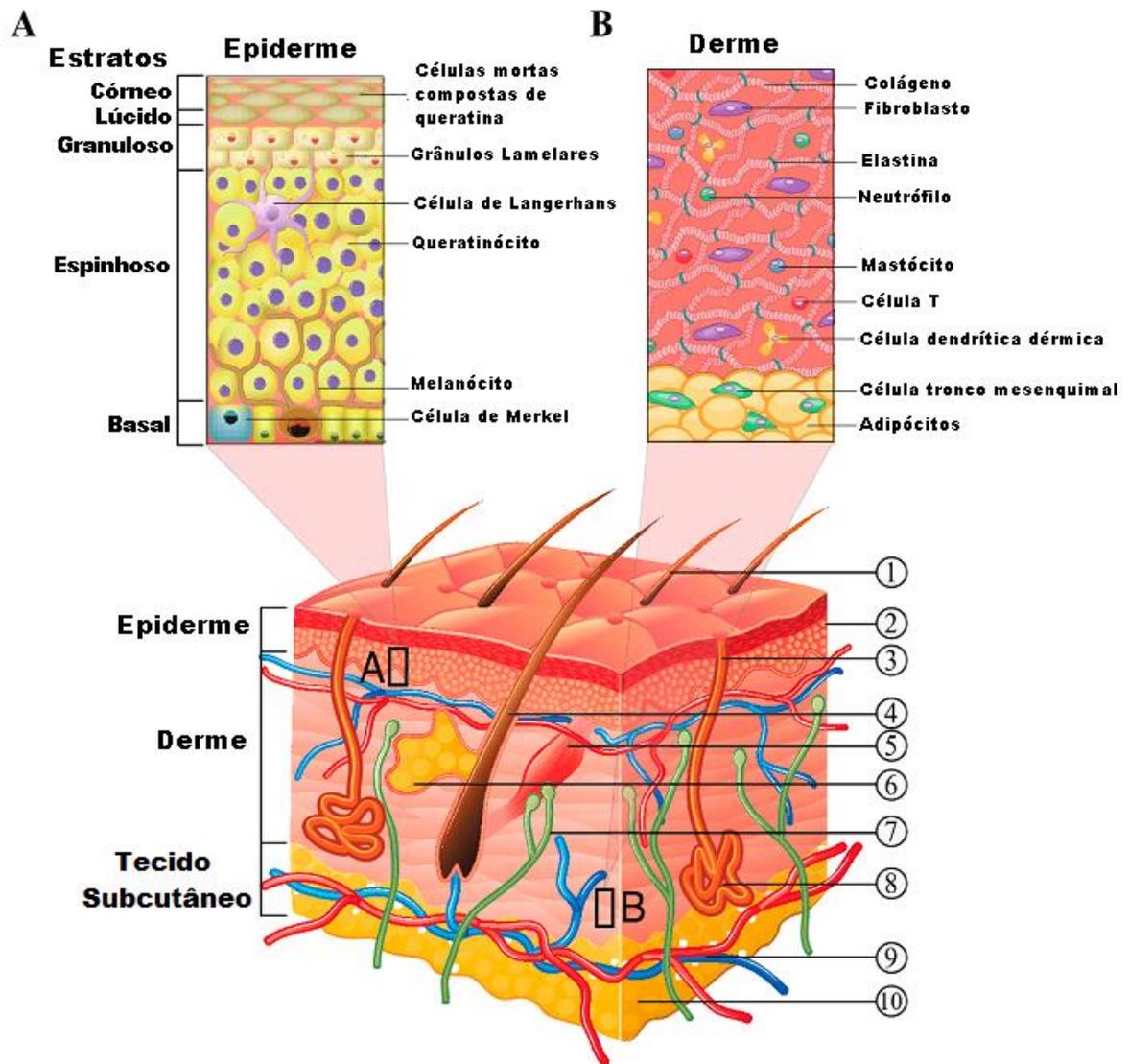


Figura 1. Estrutura da pele.

A pele é composta pela Epiderme, Derme e Tecido Subcutâneo que são compostas por (1) pêlo, (2) estrato córneo, (3) poro da glândula sudorípara, (4) folículo piloso, (5) músculo eretor do folículo piloso, (6) glândula sebácea, (7) nervo, (8) glândula sudorípara écrina, (9) plexo vascular cutâneo, (10) depósito de tecido adiposo. Estrutura detalhada da epiderme (A) e da derme (B). Extraído e adaptado de Gaur e colaboradores (2017).

Outros tipos de células também estão presentes na epiderme como os melanócitos, que são células capazes de produzir a melanina, pigmento responsável por proteger os queratinócitos contra a radiação ultravioleta, e células de Langerhans e de Merkel, que são responsáveis por apresentar antígenos e pelas funções sensoriais da pele, respectivamente (Mancini et al., 2014; Yin e Smith, 2016).

A derme provê suporte estrutural para a epiderme, e é composta primariamente pela matriz extracelular (MEC), nervos, vasos sanguíneos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. A MEC é produzida e secretada por fibroblastos e seus principais componentes são as fibras de colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Menon, 2012; Rittié e Fisher, 2015; Gaur et al., 2017).

As fibras de colágeno, compostas pelo colágeno do tipo I e do tipo III, são as proteínas mais abundantes da derme humana, representando cerca de 80% de sua massa seca. Suas propriedades físicas únicas conferem propriedade tênsil para a derme e contribui para manutenção da integridade estrutural da pele (Uitto e Bernstein, 1998; Fisher et al., 2008; Quan e Fisher, 2015; Park et al., 2017). As fibras elásticas, que constituem de 2 a 4% da MEC, formam uma rede que provê elasticidade e resiliência para a pele normal. As macromoléculas de glicosaminoglicanos e de proteoglicanos, representam cerca de 0,1% a 0,3% da massa seca da pele, e são responsáveis por sua hidratação (Uitto e Bernstein, 1998).

O tecido subcutâneo é formado por adipócitos, células-tronco mesenquimais, e por vasos sanguíneos e linfáticos. Este tecido exerce influência marcante no microambiente adjacente pela secreção de fatores bioativos que exercem diversas funções, que incluem o metabolismo de lipídeos, balanço energético, sensibilidade à insulina, regulação da angiogênese e imunomodulação (Gaur et al., 2017).

A manutenção da integridade da pele é importante para garantir a saúde do indivíduo. Uma pele comprometida de forma aguda ou crônica pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças que variam desde uma irritação até o envelhecimento precoce e o câncer (Yin e Smith, 2016).

O envelhecimento cutâneo é um processo biológico complexo que afeta a epiderme, derme e tecido subcutâneo e provoca mudanças discretas ou marcantes na morfologia e funções da pele (Uitto e Bernstein 1998; Baumann, 2007). A complexidade do envelhecimento cutâneo é devida à ocorrência de dois processos independentes, distintos tanto clínica como biologicamente, que afetam a pele de forma simultânea. O primeiro é o envelhecimento inato ou intrínseco, que afeta a pele de maneira similar à que provavelmente afeta todos os órgãos, e está associado a fatores genéticos; e o segundo é o envelhecimento extrínseco, que está intimamente

associado com a qualidade de vida de cada indivíduo e de sua capacidade de se adaptar aos desafios impostos pelas condições ambientais e aos mecanismos de resposta ao estresse (Brink et al., 2009; Tigges et al., 2014).

Os efeitos sinérgicos dos fatores que levam ao envelhecimento intrínseco e extrínseco ao longo da vida humana produzem deterioração da barreira cutânea, com significativa morbidade associada. A pele envelhecida é suscetível ao ressecamento, prurido, infecção, desordens autoimunes, complicações vasculares e aumento do risco de malignidade cutânea. De fato, a maior parte das pessoas com mais de 65 anos possui no mínimo uma desordem da pele (Uitto e Bernstein 1998; Farage et al., 2008; Mine et al., 2008).

Os sinais clínicos do envelhecimento intrínseco e do extrínseco são diferentes (Figura 2). A pele envelhecida intrinsecamente apresenta flacidez, rugas finas, afinamento da epiderme, achatamento da junção dermo-epidérmica, diminuição da capacidade de cicatrização, distúrbio da função de barreira, diminuição da defesa imune da pele, diminuição da força e resiliência, redução da microvasculatura cutânea, atrofia da MEC, distúrbio da função sensorial, diminuição dos melanócitos, diminuição das células de Langerhans, redução e desintegração do colágeno e de fibras elásticas, deposição de substâncias exógenas, redução das terminações nervosas, e diminuição do número de glândulas sebáceas e sudoríparas (Gilchrest, 1996, Zouboulis e Makrantonaki, 2011; Mancini et al., 2014; Quan e Fisher, 2015; Kanaki et al., 2016).

Alterações extrínsecas, ou fotoenvelhecimento, são primariamente causadas pela exposição à radiação ultravioleta (UV), e consistem no aumento da espessura da epiderme, achatamento da junção dermo-epidérmica, danos severos ao tecido conectivo dérmico, acúmulo de tecido elástico anormal na derme, aumento da degradação de colágeno, alteração morfológica dos fibroblastos, disfunção de glicosaminoglicanos e proteoglicanos, aumento do número de mastócitos e neutrófilos e desorganização de pequenos vasos sanguíneos (Altabas et al., 2008; Zouboulis e Makrantonaki, 2011; Mancini et al., 2014; Quan e Fisher, 2015; Kanaki et al., 2016).

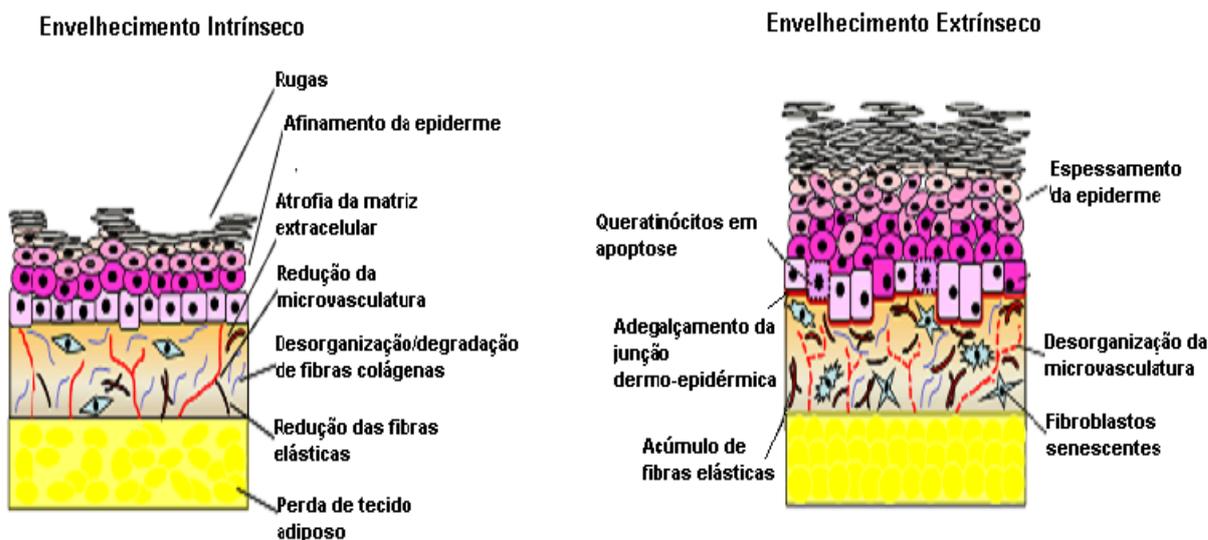


Figura 2. Características morfológicas da pele envelhecida intrinsecamente e da pele envelhecida extrinsecamente.

Extraído e adaptado de Mancini e colaboradores (2014).

A integridade estrutural da pele humana é amplamente dependente da qualidade da MEC dérmica, que é produzida, organizada, e mantida por fibroblastos da derme. Com o aumento da idade, há declínio progressivo na resposta dos fibroblastos a fatores de crescimento, diminuindo sua capacidade proliferativa e biossintética (Gilchrest, 1996; Fisher et al., 2016). Processos que alteram as proporções relativas dos componentes da derme, por meio de vias que os degradam ou os tornam moléculas não funcionais, resultam em manifestações clínicas reconhecidas como parte do processo de envelhecimento cutâneo (Uitto e Bernstein, 1998).

A fisiopatologia do envelhecimento da pele, seja intrínseco ou extrínseco, envolve a degradação do colágeno e falhas na sua reposição como mecanismo de ação central (Gilchrest 1996; Bailey, et al., 1998; Uitto e Bernstein, 1998; El-Domyati et al., 2002; Varani et al., 2006; Tigges et al., 2014).

Estudos demonstraram que, na pele de pessoas jovens (20 a 30 anos), as fibras de colágeno são intactas, abundantes e bem-organizadas. Em contraste, na pele envelhecida (> 80 anos), as fibras de colágeno são fragmentadas e desorganizadas, e alteração da homeostase do colágeno é responsável pelo comprometimento da

integridade estrutural e de propriedades mecânicas da pele (El-Domyati et al., 2002; Quan et al., 2010; Quan e Fisher, 2015).

O comprometimento da homeostase da MEC é resultado da redução da síntese de colágeno aliada à sua maior degradação, que é mediada por metaloproteinases de matriz (MMPs) cuja expressão e atividade são maiores na pele de pessoas idosas que na pele de pessoas jovens (Mine et al., 2008). MMPs são uma ampla família de endoproteases dependentes de zinco, que apresentam diversidade ampla de substratos e apresentam papel importante no remodelamento da MEC (Fisher et al., 2002; Park et al., 2017).

As MMPs são secretadas por fibroblastos e queratinócitos em resposta a múltiplos estímulos como o estresse oxidativo, radiação UV e citocinas. Até agora, no mínimo 28 tipos diferentes de MMPs já foram identificados, e desempenham diversas funções importantes em processos fisiológicos e patológicos, incluindo a angiogênese, a cicatrização, o crescimento e remodelação esquelética, a inflamação, o fotoenvelhecimento e o câncer. As MMPs podem ser classificadas em cinco subgrupos (colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e MMP associada à membrana) que apresentam especificidade para substratos distintos (Bickers e Athar, 2006; Sbardella et al., 2012; Pittayapruek et al., 2016). Essas enzimas são produzidas pelas células como zimogênios, de modo que a clivagem proteolítica do seu pró-domínio resulta na expressão da sua atividade catalítica (Fisher et al., 2002).

Na pele, queratinócitos e fibroblastos secretam principalmente a colagenase intersticial do tipo 1 (MMP-1), que é responsável por iniciar a degradação do colágeno fibrilar. A MMP-2 (gelatinase A ou colagenase do tipo IV de 72 kDa) e a MMP-9 (gelatinase B ou colagenase do tipo IV de 92 kDa) pertencem ao grupo das gelatinases e são essenciais para a degradação dos fragmentos de colágeno fibrilar após sua degradação inicial pelas colagenases. A função primária da MMP-3, uma estromelina, é a ativação de pró-MMP como as colagenases, gelatinases e matrilisinas durante a renovação da MEC. (Gupta et al., 2014; Pittayapruek et al., 2016).

Aumento na expressão de diversas MMPs tem sido relatado tanto na pele envelhecida intrinsecamente quanto na envelhecida extrinsecamente (Fisher et al.,

2002; Calleja-Agius et al., 2013; Gilchrest, 2013). Entender os mecanismos que provocam este aumento é importante para identificar novos alvos para a prevenção ou tratamento de doenças da pele e para manutenção da saúde de forma geral.

2.2. Mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento cutâneo

Os mecanismos teóricos que têm sido propostos para explicar o envelhecimento da pele, incluem a senescência celular, diminuição da capacidade proliferativa de células da pele, redução da capacidade de reparar o DNA, perda dos telômeros, mutações pontuais no DNA mitocondrial e aumento da frequência de anormalidades cromossômicas (Bickers e Athar, 2006; Zouboulis e Makrantonaki, 2012). Além de estar envolvido em diversas desordens cutâneas inflamatórias e no câncer de pele, o acúmulo de espécies reativas do oxigênio (EROs) também tem sido considerado importante no envelhecimento cutâneo intrínseco e extrínseco (Finkel e Holbrook, 2000; Rhie et al., 2001; Sun et al., 2017).

A teoria da contribuição do estresse oxidativo para o envelhecimento cutâneo vem recebendo atenção particular devido ao fato da pele estar constantemente produzindo EROs, seja por meio de sua exposição constante ao meio ambiente, ou como parte do metabolismo celular, em que as EROs provêm primariamente da cadeia respiratória da mitocôndria, que transfere elétrons para o oxigênio molecular e gera o ânion radical superóxido (Bickers e Athar, 2006; Sies et al., 2017).

EROs são capazes de provocar danos em macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídeos, e estes danos aumentam na medida em que o indivíduo envelhece (Rando et al., 2012; Brand et al., 2017). O estresse oxidativo exerce papel central nas alterações da MEC dérmica ocorridas no envelhecimento cutâneo, dado que as EROs são capazes de ativar vias de transdução de sinal citoplasmáticas que estão relacionadas à degradação do tecido conectivo (Nelson et al., 2003; Rai et al., 2009; Sies et al., 2017).

Um dos principais fatores que provocam o aumento da formação de EROs na pele é a exposição ao sol. A radiação UV promove a produção de EROs por meio de

reações fotoquímicas que ocorrem via excitação de elétrons e resultam na transferência de energia ou em modificações químicas de moléculas fotossensibilizadoras, como aminoácidos aromáticos, NADH, NADPH, flavinas, quinonas, porfirinas, carotenoides, ácido urocânico, e melanina (Fisher et al., 2002; Natarajan et al., 2014; Premi et al., 2015; Gegotek et al., 2017).

A radiação UV é composta por um espectro de diferentes comprimentos de onda e a fração que alcança a superfície da terra é dividida em UVA (315 a 400 nm) e UVB (280 a 315 nm). Os mecanismos pelos quais o UVA e o UVB exercem seus efeitos no fotoenvelhecimento e na fotocarcinogênese ainda são objetos de estudo (Runger, 2008; He et al., 2014; Kim et al., 2015; Zhang e Duan, 2018). Contudo, já se sabe que esses componentes da luz solar penetram na pele, interagem com componentes celulares e induzem respostas biológicas tanto na derme quanto na epiderme (Gilchrest, 2013). A fotossensibilização mediada pela radiação UV ocorre por meio de reações fotoquímicas do tipo I e do tipo II, a primeira envolve a transferência ou a abstração de elétrons para gerar radicais livres, e a segunda envolve a transferência de energia para o O_2 resultando na formação do oxigênio singlete (Natarajan et al., 2014; de Jager et al., 2017).

A radiação UVA penetra a epiderme chegando até a derme e está envolvida com a geração do oxigênio singlete (1O_2), do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila ($OH\cdot$). A radiação UVB afeta de forma mais proeminente a camada basal da epiderme, mas também induz eventos biológicos adversos de forma direta ou indireta nas células da derme (Kwon et al., 2012; Gegotek et al., 2017).

Uma das vias de sinalização que é ativada pelas EROs produzidas após a exposição à radiação UV é a cascata de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (Finkel e Holbrook, 2000; Bickers e Athar, 2006; Lu et al., 2016). Esta via de sinalização modula processos como a transcrição gênica, proliferação e diferenciação celular, e apoptose. A família MAPK consiste de três maiores subfamílias, as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), quinases c-Jun N-terminal (JNK) e p38. A ativação das MAPKs é dependente da fosforilação de resíduos de treonina e tirosina, sendo que a desfosforilação é crítica para a regulação negativa

de sua atividade. As MAPK fosfatases (MKPs) são importantes para regular negativamente a atividade das MAPK, sendo que já foi demonstrado que em fibroblastos a MKP7 exerce importante papel na regulação da desfosforilação de componentes da via MAPK (Masuda et al., 2001; Roux e Blenis, 2004).

Essa via de sinalização inclui diversos fatores de transcrição como o Elk-1, Ets, CREB, c-Fos e c-Jun, sendo que estes dois últimos formam um heterodímero denominado complexo proteína ativadora-1 (AP-1), o qual desempenha funções importantes na manutenção da homeostase da MEC dérmica (Figura 3) (Shin et al., 2005; Tigges et al., 2014).

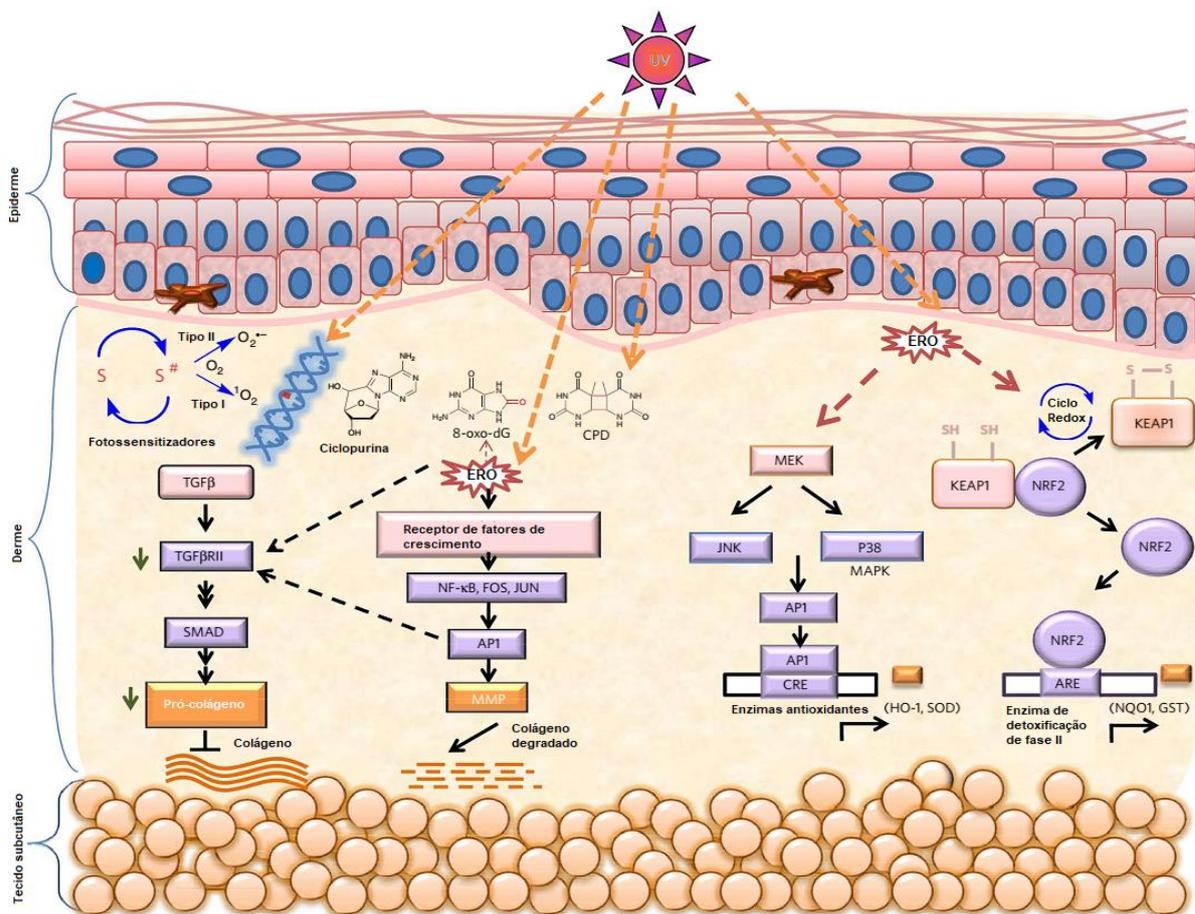


Figura 3. Ativação de vias de sinalização celular na pele mediada por EROs.

Como resultado da geração de EROs mediada pela radiação UV uma série de vias de sinalização são ativadas. EROs promovem a ativação de MAPK, das quais as mais importantes são a ERK, JNK e quinase p38. A ERK e a JNK são importantes para o recrutamento do c-Fos e c-Jun para o núcleo onde eles se dimerizam para formar o fator de transcrição AP-1, enquanto a ativação do p38 e quinases kappa inibitórias (IKK) são importantes para a ativação transcricional do NF-κB. Ambos os fatores de transcrição são importantes na regulação de diversos genes que desempenham papel importante na manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica. Extraído de Natarajan e colaboradores (2014).

Diversas MMPs são reguladas positivamente pelo AP-1. Estas incluem a MMP-1, que inicia a degradação dos colágenos fibrilares do tipo I e III, MMP-2 e MMP-9, que degradam os fragmentos de colágeno gerados pela colagenases, e a MMP-3 que degrada o colágeno do tipo IV da membrana basal e ativa a pró-MMP-1 (Fisher et al., 2002; Shin et al., 2005).

Diversos fatores de remodelamento da cromatina e ativadores transcricionais controlam a resposta do promotor da MMP-1 ao estado redox. Estudos mostraram que o recrutamento de c-Jun e c-Fos, e da histona acetiltransferase (P300/fator associado ao CBP - PCAF), para o promotor da MMP-1 é dependente de H₂O₂. A iniciação da transcrição da MMP-1 é também aumentada por modificações redox-dependentes da histona deacetilase-2 (HDAC2). A alteração no estado de equilíbrio do H₂O₂ aumenta a sinalização de quinases, que modificam componentes de iniciação do complexo de transcrição levando a uma produção máxima de MMP-1 (Nelson et al., 2006; Bartling et al., 2014).

As EROs também estão envolvidas no comprometimento da síntese de colágeno (Fisher, 2002). O aumento da ativação do AP-1 reduz a biossíntese de colágeno de forma indireta. O AP-1 diminui a expressão do receptor do fator de crescimento transformador β (TGF- β) do tipo II, comprometendo a sinalização do TGF- β , maior regulador da biossíntese de colágeno, e como resultado há diminuição da fosforilação dos fatores de transcrição Smad2 e Smad3, o que provoca redução da expressão do colágeno do tipo I e do tipo III (Quan et al., 2002; Quan e Fisher, 2015).

Além de provocar alterações importantes na expressão de enzimas que degradam componentes da MEC e na síntese de colágeno, o estresse oxidativo está associado à depleção dos antioxidantes celulares, com a diminuição da eficiência do sistema de defesa antioxidante e com o aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios (Bicker e Athar 2006; Natarajan et al., 2014).

Algumas respostas biológicas induzidas pelo aumento da concentração de EROs estão associadas com a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B. Este fator regula a secreção de citocinas pró-inflamatórias, do fator de necrose tumoral alfa (TNF α), da interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), e assim são capazes de instaurar um processo inflamatório na pele, que, por sua vez, está

associado ao aumento da expressão da MMP-1. Além disso, há aumento dos níveis das proteínas responsivas ao NF- κ B, como a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), além da indução de produção de óxido nítrico (NO), que desempenha papel central na regulação da apoptose das células da pele (Bicker e Athar 2006; Oeckinghaus et al., 2011; Jeon et al., 2015).

As células da pele respondem aos danos produzidos pela inflamação e pelo estresse oxidativo entrando em um estado de cessação do crescimento e alterações de suas funções (Krtolica et al., 2001). Estas alterações são manifestadas pelo aparecimento do fenótipo secretor associado a senescência (SASP). O SASP inclui diversos compostos que consistem em fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas como a IL-6, a IL8 e o TNF α (de Magalhães e Passos, 2018; Rahimi et al., 2018). De forma conjunta, estes são os principais fatores envolvidos na etiologia do envelhecimento cutâneo (Natarajan et al., 2014).

2.3. Sistema antioxidante cutâneo

A defesa cutânea contra EROs envolve a ação cooperativa de sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que atuam neutralizando e minimizando os efeitos deletérios dessas moléculas com o objetivo de manter a homeostase da pele (Kohen e Gati, 2000; Furue et al., 2017). O sistema de defesa antioxidante celular é gradualmente comprometido com o envelhecimento, resultando na redução da habilidade que as células apresentam em lidar com a geração de EROs, pois o acúmulo dessas substâncias provoca o desequilíbrio redox e sobrecarrega a capacidade antioxidante natural da pele (Brand et al., 2017; Petruk et al., 2017).

Um dos principais reguladores da defesa antioxidante celular é o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2). Em condições normais, este fator encontra-se ligado ao seu repressor, a proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (Keap 1), no citoplasma. Mediante o estresse oxidativo, há diminuição da afinidade do Nrf2 pelo Keap1, e como consequência, o Nrf2 é liberado e pode regular a expressão de enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), de reguladores do

metabolismo da glutatona e de peroxirredoxinas (PRX) (Rahimi et al., 2018; Zhang et al., 2019).

O sistema antioxidante enzimático inclui a glutatona peroxidase (GSH-px), a glutatona redutase (GR), a superóxido dismutase, a catalase e as peroxirredoxinas. Antioxidantes não enzimáticos presentes nas células são o α -tocoferol, ubiquinona, β -caroteno, ascorbato e glutatona (Briganti e Picardo, 2003; Bickers e Athar, 2006; Lei et al., 2016).

O ânion radical superóxido é o primeiro tipo de ERO formado nas diferentes vias de produção de espécies reativas e, por isso, a SOD é considerada como a primeira linha de defesa contra EROs, pois é responsável por converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio. A atividade da SOD é dependente de cofatores como o cobre, zinco e manganês. Os mamíferos possuem três isoformas de SOD com distribuição distinta, a SOD1 (Cu, Zn-SOD) encontra-se no citoplasma e no núcleo das células; a SOD2 (Mn-SOD) está presente na mitocôndria, e a SOD3 (Cu, Zn-SOD) está presente na MEC (Choung et al., 2004; Hu et al., 2011; Birben et al., 2012; Kwon et al., 2012).

As três isoformas da SOD exercem influência significativa no envelhecimento. Já foi demonstrado que a utilização de substâncias capazes de mimetizar o efeito da SOD pode aumentar a sobrevivência de camundongos por diversas semanas. A importância da atividade desta enzima para manutenção da homeostase da pele é evidenciada pela observação de que a sua deficiência está associada com o aparecimento de sinais comumente encontrados na pele envelhecida. A deficiência de SOD1 está relacionada ao desenvolvimento de atrofia da pele acompanhada por degradação do colágeno e de fibras elásticas em camundongos (Murakami et al., 2009; Shibuya et al., 2014). Além disso, a deficiência constitutiva da SOD2 resulta em disfunção mitocondrial e aceleração do aparecimento do fenótipo de envelhecimento e de senescência celular na pele de camundongos (Velarde et al., 2012).

As enzimas SOD representam a única família de enzimas capazes de eliminar o ânion radical superóxido, porém diversas enzimas são capazes de eliminar o H_2O_2 ou peróxidos orgânicos, como catalase, glutatona peroxidase e tioredoxina (Figura 4) (Lei et al., 2016).

A CAT é uma das enzimas responsáveis por converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Weydert e Cullen, 2010). A CAT consiste de quatro cadeias polipeptídicas idênticas, cada uma com um grupo heme. A conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ocorre em duas etapas. Na primeira etapa o peróxido de hidrogênio reage com o grupo heme levando à formação do cátion radical oxoferril porfirina e uma molécula de água. O radical catiônico é muito ativo e reage imediatamente com uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio para produzir água e oxigênio molecular, regenerando o grupo prostético heme original (Kirkman e Gaetani, 2007). O H_2O_2 também pode ser decomposto em água e oxigênio molecular pela ação da glutathiona peroxidase e da tioredoxina. A atividade da primeira é dependente da glutathiona e a da segunda é dependente do NADPH (Masaki, 2010).

A glutathiona (GSH) é o principal antioxidante não enzimático que contribui para o sistema antioxidante cutâneo (Birben et al., 2012). No processo de defesa contra espécies reativas a GSH atua como co-fator da GSH-px que atua reduzindo o peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. Nesse processo, a GSH é oxidada e se liga a outra GSH por meio de uma ligação dissulfeto para formar o dímero denominado glutathiona oxidada (GSSG). A GSH pode ser recuperada por meio da redução catalisada pela enzima glutathiona redutase (Rinnerthaler et al., 2015; Birben et al., 2012).

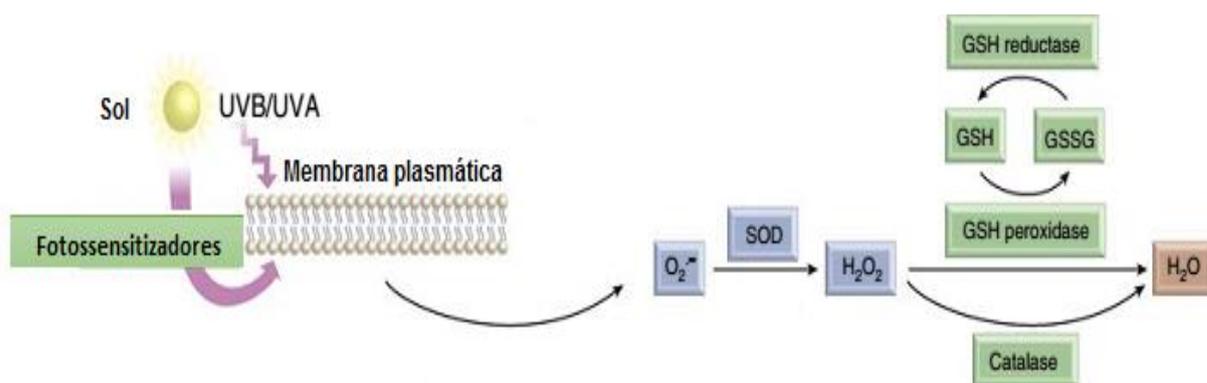


Figura 4. Defesa antioxidante enzimática da pele

A exposição da pele à radiação UV estimula fotossensibilizadores intracelulares que provocam a geração de espécies reativas. O sistema de defesa antioxidante da pele catalisa reações de inativação das espécies reativas. A enzima SOD realiza a reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ para formar H_2O_2 , e este é degradado a H_2O e O_2 por ação das enzimas catalase e glutathiona peroxidase. O GSH atua como co-fator da glutathiona peroxidase e é convertida a sua forma oxidada durante o processo de degradação do H_2O_2 , e é reciclada por ação da enzima glutathiona redutase. Extraído e adaptado de Bickers e Athar, 2006.

A capacidade de defesa antioxidante é diferente entre as camadas da pele (Shindo et al., 1994; Rhie et al., 2001; Shin et al., 2005). A epiderme apresenta capacidade antioxidante maior que a da derme humana (Shindo et al., 1994). Isso ocorre devido à maior concentração de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos encontrados nesta camada. Já foi demonstrado que a atividade da CAT, da glutathione peroxidase e da glutathione reductase são maiores na epiderme, assim como a concentração de α -tocoferol, ácido ascórbico e glutathione (Shindo et al., 1994; Godic et al., 2014).

O envelhecimento cutâneo, tanto extrínseco como o intrínseco, provoca alterações nas quantidades relativas de moléculas antioxidantes na epiderme e na derme. A atividade da CAT é menor derme da pele envelhecida quando comparado com sua atividade na pele jovem (Rhie et al., 2001; Shin et al., 2005). Há também diminuição dos níveis α -tocoferol, ácido ascórbico e glutathione na pele envelhecida (Rhie et al., 2001).

A ação conjunta dos diversos mecanismos de defesa antioxidante é importante para manter o equilíbrio redox nos diversos tipos de células, e o comprometimento dos componentes deste sistema de defesa representa um dos fatores que contribuem para o processo de envelhecimento cutâneo (Rhie et al., 2001; Soeur et al., 2015). Considerando estes fatores, a elucidação dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão e atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante pode fornecer subsídio para a utilização de abordagens que auxiliem no combate aos danos produzidos pelas EROs.

2.4. Receptores ativados por proliferadores peroxissomais

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) são uma subfamília dos receptores nucleares, e são responsáveis por regular a expressão de genes envolvidos em diversas funções celulares, incluindo o metabolismo de carboidratos e lipídeos, a proliferação celular, diferenciação e migração, o reparo tecidual, e a resposta imune e inflamatória. Três isoformas, codificadas por genes distintos, já foram identificadas, PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) e PPAR γ (NR1C3) (Berger e Moller, 2002; Kuenzli e Saurat, 2003).

Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligante que regulam a expressão de genes alvo por meio da ligação aos elementos responsivos ao proliferador de peroxissomas (*Peroxisome Proliferator Response Element* - PPRE). Cada receptor se liga ao PPRE como um heterodímero formado pelo PPAR com o receptor do ácido 9-cis retinoico (RXR α , NR2B1). Quando um agonista se liga ao receptor, a conformação do PPAR é alterada, estabilizada, moléculas co-repressoras são removidas e ativadores da transcrição são recrutados, o que resulta em aumento da transcrição gênica (Berger e Moller, 2002; Kuenzli e Saurat, 2003).

Os PPARs são reguladores importantes de diversas funções da pele e, por isso, têm sido considerados alvos terapêuticos potenciais para o tratamento de desordens que acometem esse órgão (El-Jamal et al., 2013). A função destes receptores nucleares é importante para manutenção da função de barreira cutânea e tem sido relacionada a mecanismos moleculares que controlam o processo de inflamação, cicatrização e envelhecimento cutâneo (Ham et al., 2013; Jeon et al., 2015; Yin e Smith, 2016).

As três isoformas do PPAR são expressas na epiderme e na derme da pele humana (Michalik e Whali, 2007; Sertznig et al., 2008; Ham et al., 2014). O PPAR β/δ é a isoforma predominante nos queratinócitos, enquanto o PPAR α e PPAR γ são menos expressos e sua expressão é aumentada nos processos de diferenciação de queratinócitos (Kuenzli e Saurat, 2003).

A modulação da atividade dos PPAR tem sido mostrada como importante na manutenção do equilíbrio entre a atividade de MMPs e a expressão de proteínas da MEC (Ham et al., 2013; Jeon et al., 2016). Os ativadores de PPAR α e de PPAR γ podem proteger o tecido de danos induzidos pela radiação UV e eventualmente proteger contra o envelhecimento precoce, por meio da redução da expressão e atividade de MMPs, diminuição da produção de EROs, aumento da atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante e supressão de citocinas pró-inflamatórias (Park et al., 2013; Briganti et al., 2014; Elewa et al., 2015; Jeon et al., 2015; Jeon et al., 2016).

O PPAR β/δ é o subtipo de PPAR mais abundante na epiderme humana e muitos estudos mostram evidências interessantes para o seu envolvimento no

processo de cicatrização (Montagner et al., 2015). Este receptor está envolvido com o aumento da expressão do colágeno do tipo I e do tipo III. Esse aumento está relacionado à sua ligação ao PPRE presente no promotor do COL3A1, gene responsável por codificar o colágeno do tipo III, e ao aumento da expressão do TGF- β induzida por agonistas deste receptor (Ham et al., 2010; Kwok et al., 2012; Ham et al., 2013). A ativação do PPAR β/δ modula os níveis da MPK7, uma MAP fosfatase responsável por desfosforilar o JNK, e esta modulação está envolvida com a diminuição da ativação da via de sinalização da MAPK (Ham et al., 2013). O PPAR β/δ também medeia atividades anti-inflamatórias por meio da diminuição da sinalização do NF- κ B, e atua como modulador do equilíbrio redox por promover aumento da expressão da CAT e glutathiona peroxidase em fibroblastos da derme humana (Kilgore e Bilin, 2008; Montagner et al., 2015).

A expressão do PPAR α e do PPAR γ diminui em diversos compartimentos da pele envelhecida (Briganti et al., 2014; Elewa et al., 2015; Jeon et al., 2016). A utilização de agonistas do PPAR γ tem sido associada à restauração da estrutura jovem e função de mitocôndrias que são estruturalmente e funcionalmente comprometidas pelo estresse oxidativo, e também está associada com as vias de diferenciação de melanócitos. (Grabacka et al., 2008; McCarty et al., 2009; Briganti et al., 2014).

A utilização de agonistas do PPAR α e do PPAR γ em fibroblastos expostos à radiação UV promove a diminuição da produção de EROs, além de promover diminuição da expressão da MMP-1 e aumento da expressão do colágeno (Briganti et al., 2014; Jeon et al., 2015; Jeon et al., 2016; Shin et al., 2016). Essas duas isoformas do PPAR também auxiliam na manutenção do equilíbrio redox, dado que são capazes de modular e aumentar a expressão e atividade da enzima CAT (Briganti et al., 2014; Shin et al., 2016).

2.5. Produtos naturais antienvelhecimento e fungos endofíticos

Os produtos naturais desempenham importante papel na descoberta de novos fármacos e a sua investigação como fonte de novas terapias tem sido amplamente explorada (Koehn e Carter, 2005). Newman e Cragg (2016) mostraram em sua revisão sobre a utilização de produtos naturais como fonte de novos fármacos que estes produtos representam boa parte do arsenal de fármacos aprovados por órgãos regulatórios de diversos países, sendo que, de todas as pequenas moléculas aprovadas entre os anos de 1981 e 2014 (n = 1211), cerca de 34% são produtos naturais ou produtos semissintéticos derivados de produtos naturais (Newman e Cragg, 2016).

Produtos naturais ricos em polifenóis têm recebido atenção devido ao seu potencial de aplicação no tratamento de diversas desordens que apresentam o estresse oxidativo ou a inflamação como mecanismos essenciais para sua iniciação e progressão (Soobrattee et al., 2005; Lephart, 2016). Esses compostos são explorados como possíveis agentes capazes de suprimir a evolução ou prevenir a ocorrência de eventos envolvidos na fisiopatologia do envelhecimento e de algumas doenças como o câncer (F'guyer et al., 2003; Steward e Brown, 2013; Soeur et al., 2015).

Os polifenóis representam um grupo de metabólitos secundários amplamente produzidos por diversos tipos de plantas e são caracterizados por apresentar diversidade ampla de atividades biológicas (Soobrattee et al., 2005; Pérez-Jiménez et al., 2010; Ratz-Lyko et al., 2015). Os principais compostos polifenólicos encontrados na natureza são os flavonoides, ácidos fenólicos, quinonas, cumarinas, lignanas, estilbenos e taninos (Ratz-Lyko et al., 2015).

Diversos estudos mostram que extratos de plantas ricos em compostos polifenólicos são capazes de atuar em vias importantes para o envelhecimento cutâneo. Estudos *in vitro*, que utilizaram queratinócitos humanos ou fibroblastos da derme humana, mostraram que a utilização de extratos provenientes de diferentes tipos de plantas ou de insetos é capaz de proteger as células contra os efeitos deletérios provocados por sua exposição à radiação UV (Chang et al., 2017; Park et al., 2017; Petruk et al., 2017).

Estudo que utilizou o extrato aquoso das partes aéreas da planta *Siegesbeckia glabrescens* mostrou que este extrato aumentou a expressão do colágeno do tipo I e do tipo III na pele de camundongos, diminuiu a expressão da MMP-3, aumentou a expressão da CAT e diminuiu a fosforilação de componentes da via da MAPK (ERK, JNK e p38) e a expressão do NF- κ B (Kim et al., 2017). Outro estudo mostrou que o extrato metanólico do fruto da planta *Euterpe oleracea Martius* (açai), apresentou atividade protetora em fibroblastos expostos à radiação UVA por diminuir a formação intracelular de EROs, a peroxidação lipídica e a fosforilação de sinalizadores da via da MAPK, além de aumentar os níveis de glutathiona reduzida intracelular (Petruk et al., 2017).

O extrato etanólico do rizoma de *Kaempferia parviflora* aumentou a expressão do colágeno do tipo I e do tipo III, inibiu a ativação de c-Jun e c-Fos, aumentou a expressão da CAT e suprimiu a resposta inflamatória em camundongos expostos à radiação UV (Park et al., 2014). O extrato etanólico da raiz da planta *Angelica acutiloba* aumentou a expressão do pró-colágeno do tipo I em fibroblastos dérmicos humanos, assim como diminuiu a expressão de MMP-1 e MMP-2 em fibroblastos expostos ao UVB (Park et al., 2017).

Outro estudo mostrou que o isômero *trans* da chalcona, um precursor de flavonoides, é capaz de diminuir a atividade da MMP-9 na pele de camundongos expostos ao UVB. Além disso, esse composto foi capaz de aumentar os níveis de glutathiona e aumentar a atividade das enzimas CAT, glutathiona peroxidase e glutathiona redutase (Martinez et al., 2017).

Estudo que utilizou o extrato de *Periostracum cicadae* (cigarra) mostrou que, em queratinócitos, esse extrato é capaz de diminuir a concentração de EROs intracelular, diminuir a expressão das MMPs de matriz do tipo 2 e do tipo 9, diminuir a atividade do NF- κ B e do AP-1, e aumentar a expressão do Nfr2, o qual está envolvido na expressão de enzimas do sistema de defesa antioxidante (Chang et al., 2017).

O estudo de Rahimi e colaboradores (2018) mostrou em modelo de envelhecimento induzido pelo tratamento com a D-galactose em linhagem celular de neuroblastoma humano, que o ácido elágico, por meio da modulação da ativação do PPAR γ , possui efeitos antienvhecimento por provocar a diminuição de ERO

intracelular, diminuição de produtos da peroxidação lipídica, aumento de GSH, diminuição da atividade da enzima β -Galactosidase associada à senescência e dos níveis de TNF- α (Rahimi et al., 2018).

Estes estudos demonstram que os produtos naturais são capazes de atuar em vias que são importantes para o desenvolvimento e progressão do envelhecimento cutâneo e podem ser exploradas na prevenção da progressão deste processo. E um campo crescente de exploração de novas fontes de produtos naturais é o que estuda os produtos naturais produzidos por micro-organismos endofíticos (Gunatilaka, 2006; Newman e Cragg, 2016).

Um endófito é um micro-organismo que vive por toda a vida ou parte dela colonizando o espaço intercelular ou intracelular dos tecidos de plantas, sem lhes causar danos aparentes (Petrini, 1991). Os endófitos que colonizam o tecido das plantas são nutridos e protegidos pela planta hospedeira e, em contrapartida, eles conferem vantagens para a planta hospedeira pela produção de metabólitos funcionais capazes de proteger a planta contra agressões bióticas (herbívoros e patógenos) e abióticas (fatores ambientais) (Tan e Zou, 2001; Huang et al., 2015; Yan et al., 2019).

Os mecanismos utilizados para a proteção das plantas pelos fungos endofíticos envolvem a indução da resposta dos sistemas de defesa antioxidante da planta, da produção de metabólitos pelos fungos endofíticos com atividade antimicrobiana, e pela modulação de fito-hormônios que estimulam o sistema imune da planta hospedeira (Figura 5) (Yan et al., 2019).

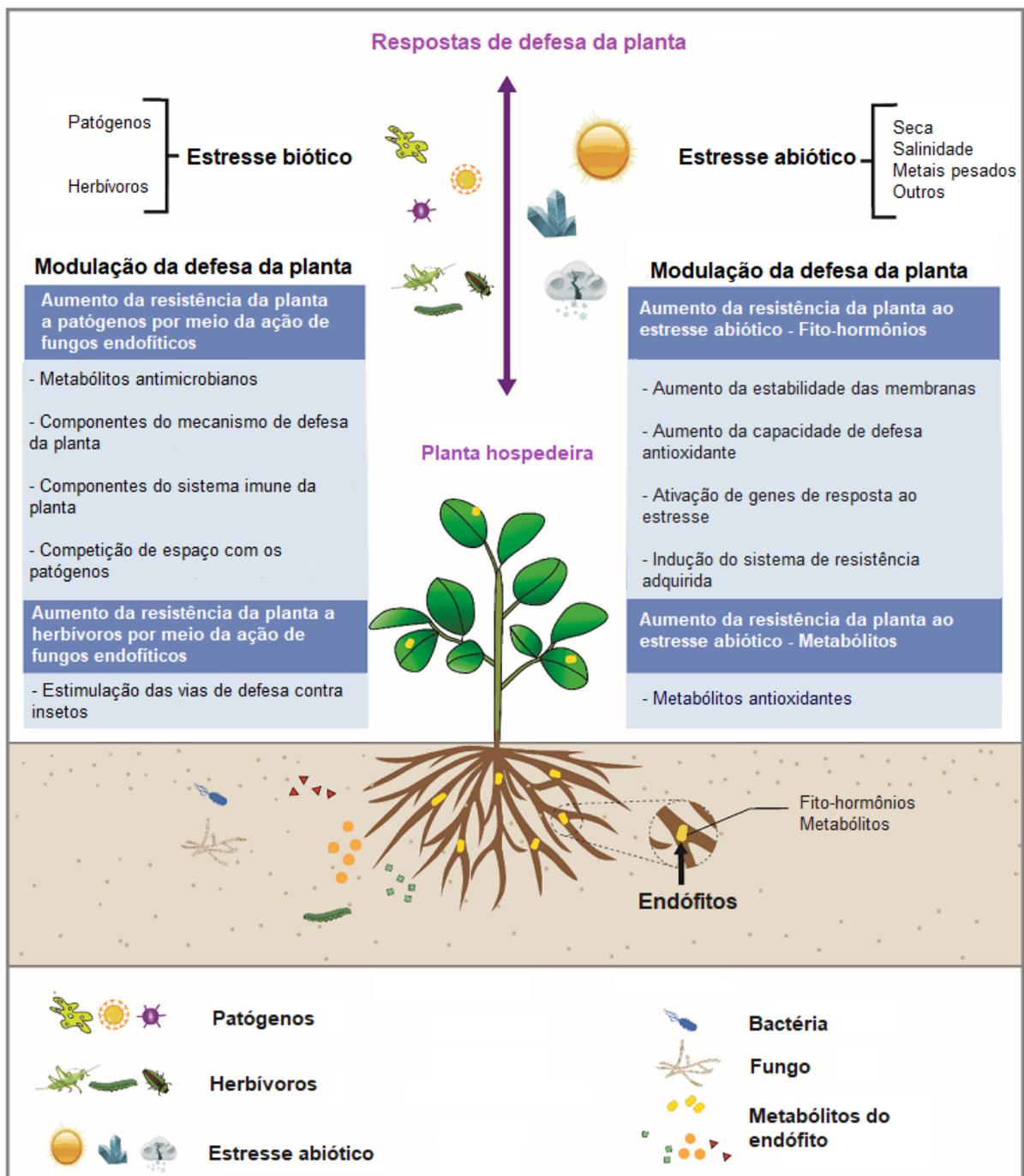


Figura 5. Interação entre o fungo endofítico e a planta hospedeira

A colonização por endófitos modula os sistemas de defesa da planta contra o estresse biótico e abiótico, induzindo a produção de metabólitos antimicrobianos e antioxidantes, e estimulando o sistema imune da planta e de mecanismos de resistência ao estresse. Extraído e adaptado de Yan et al., 2019.

A bioprospecção de fungos endofíticos apresenta-se como um campo importante para a descoberta de novos compostos biologicamente ativos devido ao fato desses micro-organismos possuírem a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários que variam amplamente quanto a sua classe química e quanto a sua complexidade, tendo sido demonstrada a produção de alcaloides, esteroides, terpenoides, peptídeos e polifenóis por estes micro-organismos (Tan e Zou, 2001; Strobel, 2014).

A *Bauhinia variegata* é uma leguminosa amplamente utilizada pela medicina popular por seus efeitos antidiabéticos, antitumoral, antibacteriano e no tratamento de úlceras (Dhale, 2011; Kumar et al., 2019). Além disso, Mohsin e Akhtar (2017) mostraram em seu estudo que o extrato das folhas desta planta possui potencial antioxidante para aplicação cosmética e farmacêutica. Já foi demonstrado que fungos endofíticos isolados das folhas de *Bauhinia variegata* são capazes de produzir metabólitos com considerável atividade antioxidante e agonista das três isoformas do PPAR. (Mesquita, 2011; Mesquita, 2015).

Desta forma, os metabólitos produzidos por fungo endofítico isolado das folhas de *Bauhinia variegata* foram utilizados neste estudo devido à verificação em trabalhos anteriores de que o extrato bruto produzido pelo fungo BvFII foi capaz de ativar as três isoformas do PPAR (Mesquita, 2015), de diminuir a expressão da MMP-1 e a atividade da MMP-2, e de aumentar a atividade da CAT (Araújo, 2015), constituindo-se, portanto, como metabólitos com potencial de atuar contra o envelhecimento cutâneo precoce.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de metabólitos secundários produzidos por fungo endofítico isolado de folhas da *Bauhinia variegata* em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o teor de polifenóis e flavonoides das frações do extrato.
- Avaliar a atividade antioxidante das frações do extrato.
- Avaliar a citotoxicidade das frações do extrato em cultura de fibroblastos dérmicos humanos e de células HeLa.
- Avaliar a atividade agonista das frações do extrato frente às diferentes isoformas dos receptores nucleares ativados por proliferadores peroxissomais.
- Avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase nas culturas de fibroblastos tratados com as frações do extrato e submetidos ao estresse oxidativo.
- Avaliar a influência do extrato bruto e suas frações nos níveis de glutathiona reduzida na cultura de fibroblastos induzidos ao estresse oxidativo.
- Quantificar os níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio e quantificar produtos da peroxidação lipídica em cultura de fibroblastos induzidos ao estresse oxidativo e tratados com o extrato ou suas frações.
- Avaliar quantitativamente a influência do extrato bruto e da fração hexânica na expressão gênica de genes relacionados à manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica nos fibroblastos induzidos ao estresse oxidativo.
- Avaliar quantitativamente a influência do extrato e da fração hexânica na expressão gênica de *MMP-1* e *COL1A1*, na presença de agonistas ou inibidores específicos de PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ na cultura de fibroblastos induzidos ao estresse oxidativo.
- Avaliar a influência do extrato bruto e da fração hexânica na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos induzidos ao estresse oxidativo.

- Avaliar a influência do extrato bruto e da fração hexânica sobre a senescência de fibroblastos dérmicos humanos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Manutenção dos fungos e cultivo em cultura líquida submersa

O fungo endofítico BvFII, previamente isolado de folhas da planta *Bauhinia variegata* (Mesquita, 2012), foi mantido em estoque por repiques periódicos em meio ágar Sabouraud dextrose e armazenado a 4°C, após período de incubação de 7 dias a 28°C. Para a produção do extrato, o fungo em estoque foi repicado em tubos de ensaio contendo meio inclinado de ágar Sabouraud dextrose (*slants*) e incubado por 7 dias a 28°C. Após este período de incubação, a massa micelial e esporos do fungo de 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 horas 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 horas.

4.2. Produção do extrato bruto e fracionamento

Após o cultivo do fungo 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 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 do extrato bruto seco. Este foi fracionado por partição líquido-líquido como descrito por Pereira e colaboradores (2015). Uma solução do extrato em metanol:água (1:3 v/v) foi fracionada sucessivamente com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila (Figura 6). A secagem das frações foi realizada de forma similar à realizada para o extrato bruto. O extrato bruto e as frações utilizadas nos experimentos foram solubilizados em volume específico de metanol para obtenção da concentração desejada.

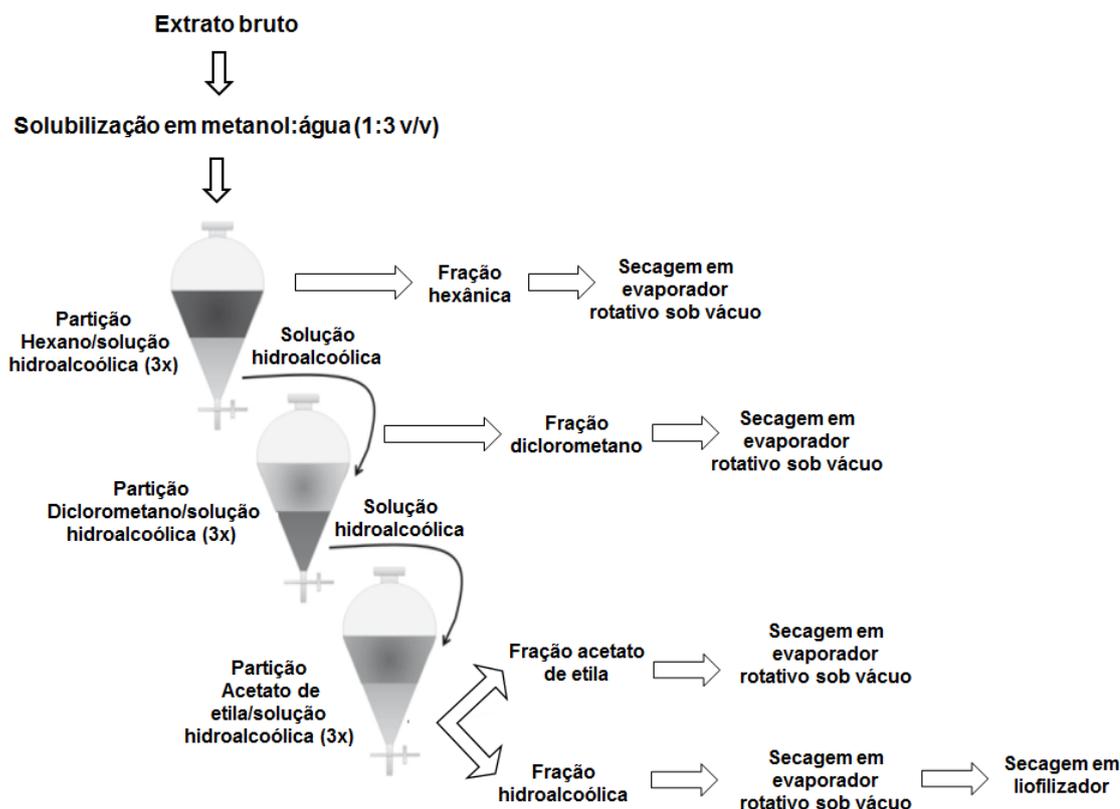


Figura 6. Esquema de fracionamento do extrato.

4.3. Avaliação do teor de polifenóis totais

A quantificação de polifenóis totais nas frações de acetato de etila (F. EtOAc), diclorometano (F. DCM), hexânica (F. HEX) e hidroalcoólica (F. HA) foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu, como descrito previamente (Singleton e Rossi, 1965). Neste ensaio, 50 μL de solução metanólica das frações do extrato 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 na ausência de luz por 60 minutos. Após o período de incubação foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1800, Kyoto, Japão) a 760 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico por massa de extrato (μg EAG/mg de extrato).

4.4. Avaliação do teor de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides foi realizada através do método do cloreto de alumínio, de acordo com o descrito por Chang e colaboradores (2002). Neste ensaio, 50 µL de solução metanólica das frações do extrato foram adicionadas a 500 µL de solução metanólica de AlCl₃ 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 na ausência de luz por 30 minutos. Após o período de incubação, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1800, Kyoto, Japão) a 425 nm. A quercetina foi utilizada como padrão e os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina por massa de extrato (µg EQ/mg de extrato).

4.5. Avaliação da atividade antioxidante das frações do extrato pelo método do DPPH·

A atividade antioxidante das frações do extrato 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). A solução alcoólica do DPPH· apresenta cor roxa e na presença de antioxidante há a redução deste radical e a solução alcoólica torna-se transparente, e a diminuição da absorbância da solução é proporcional à atividade antioxidante dos compostos em estudo (Garcia et al., 2012). Neste ensaio foram utilizadas 12 diferentes concentrações das frações do extrato, entre 20,00 µg/mL e 9,76 µg/mL. 100 µL de cada diluição da solução metanólica das frações do extrato e 100 µL de solução metanólica do radical estável DPPH· 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, CA, EUA) ajustado no comprimento de onda de 492 nm. O ácido ascórbico, a quercetina e o butilhidroxitolueno (BHT) foram utilizados como padrões. 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·.

4.6. Cultura de fibroblastos dérmicos humanos e de células HeLa

Fibroblastos dérmicos humanos (*Human Foreskin Fibroblasts*, HFF) provenientes de cultura primária feita a partir do prepúcio de paciente adulto submetido à postectomia (de Souza, 2016) foram utilizadas, nas passagens de 5 a 11, para avaliar os efeitos do tratamento com o extrato bruto e suas frações sobre parâmetros importantes para a manutenção da homeostase da derme humana. Células HeLa, linhagem derivada de tumor cervical uterino, foram utilizadas para o ensaio de transfecção transiente e ensaio do gene repórter. Ambos os tipos de células foram cultivados no meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As placas com as células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa (UR) de 95% e temperatura de 37°C.

4.7. Avaliação indireta da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos e de células HeLa tratadas com as frações do extrato de fungos endofíticos

A viabilidade celular das células HFF e HeLa tratadas com as frações do extrato foi determinada pela análise da atividade mitocondrial das células viáveis por meio de ensaio colorimétrico que utiliza o reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Este reagente possui cor amarela e quando o anel de tetrazólio presente em sua estrutura é clivado por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas há a formação de cristais de formazan que apresentam cor azul. A formação dos cristais de formazan é proporcional ao número de células viáveis o que permite a quantificação da viabilidade celular por espectrofotometria (Mosmann, 1983).

Fibroblastos dérmicos humanos ou células HeLa foram inoculados na concentração de 1×10^4 células em cada poço de uma placa de 96 poços. O tratamento das células HFF foi realizado com soluções das frações do extrato nas concentrações de 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL e as células HeLa foram tratadas com as concentrações de 0,625 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, e 10 µg/mL. Após incubação por 48 horas (37°C / 5% CO₂ / 95% UR), o meio com tratamento foi removido e foram adicionados 100 µL de DMEM e 10 µL de solução de

MTT (5 mg/mL) em cada poço. A placa foi incubada por 4 horas e, posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução ácida de isopropanol (solução 0,04M de HCl em isopropanol) para dissolução dos cristais de formazan produzidos. A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas (Beckman DTX 800, CA, EUA). Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica.

4.8. Ensaio de transfecção transiente e gene repórter

A influência do tratamento com as frações do extrato sobre a ativação das três isoformas do PPAR foi avaliada por meio do ensaio do gene repórter, que permite avaliar a atividade transcricional do gene de interesse ou a ativação de receptores nucleares por meio da quantificação da atividade do produto de expressão do gene repórter. Neste ensaio, o gene da luciferase, dirigido por um promotor contido do elemento responsivo ao receptor nuclear de interesse, foi utilizado como gene repórter e a ativação dos receptores foi medida por meio da avaliação da atividade da enzima luciferase.

O ensaio de transfecção transiente foi realizado com a utilização do reagente lipofectamina como método químico de transfecção gênica. Células HeLa (3×10^4 células por poço) foram inoculadas em uma placa de 48 poços com meio DMEM contendo 10% de SFB, e incubadas por 24 horas (37°C/ 5% CO₂/ 95% UR), para adesão celular. O reagente lipofectamina (Lipofectamine[®] 2000, Invitrogen, CA, USA) foi diluído em DMEM, assim como os plasmídeos contendo o DNA complementar (cDNA) dos receptores nucleares PPAR α , PPAR β/δ ou PPAR γ juntamente com o plasmídeo contendo seu elemento responsivo (PPRE) fusionado ao gene repórter da luciferase. Posteriormente, a solução contendo o DNA plasmidial correspondente a um dos receptores nucleares em estudo e ao elemento responsivo foi adicionada à solução contendo lipofectamina e a mistura resultante foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente para formação dos complexos de lipídeo-DNA plasmidial. A cada poço da placa de 48 poços foram adicionados 100 µL da solução contendo os complexos de lipídeo-DNA plasmidial de modo a obter 0,5 µL de lipofectamina por poço, 60 ng e 240 ng do DNA plasmidial do receptor nuclear e do elemento responsivo, respectivamente. As placas foram incubadas por 6 horas (37°C/ 5% CO₂/ 95% UR), para permitir a incorporação do DNA plasmidial pelas células HeLa. Ao término do período de incubação, o meio foi removido e foram acrescentados 250 µL de DMEM

com 10 % de SFB, o qual continha os agonistas específicos para cada isoforma do PPAR (PPAR α : 10⁻⁴ M de bezafibrato; PPAR β/δ : 10⁻³ M de L-165041; PPAR γ : 10⁻⁵ M de rosiglitazona) ou concentrações de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ para as frações de acetato de etila, diclorometano, hexânica ou hidroalcoólica. As placas foram incubadas por 24h (37°C/ 5% CO₂/ 95% UR). Ao final do período de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram lisadas com auxílio do tampão de lise Tris/HCl 100 mM pH 7,6, contendo 2% de Triton X-100 (Dalby et al., 2004).

A determinação da atividade da luciferase foi realizada utilizando 10 μL do lisado celular e 20 μL de luciferina (Luciferase Assay System[®] - Promega). A emissão de luz resultante da reação de bioluminescência catalisada pela enzima luciferase foi medida em aparelho luminômetro GloMax[®] 20/20. Os resultados foram expressos como atividade relativa da luciferase das amostras tratadas com agonistas do PPAR ou com as frações do extrato em relação ao veículo (DMSO ou metanol). Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e com no mínimo três replicatas biológicas.

4.9. Tratamento das culturas de fibroblastos dérmicos humanos para os ensaios de avaliação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, quantificação da glutathiona reduzida e peroxidação lipídica.

Os tratamentos das células HFF foi realizado pelo período de 48 horas, pois foi demonstrado que o tratamento de células da pele por este período com extratos de planta ricos em compostos polifenólicos, promoveu maior proteção contra os danos oxidativos promovidos pelo tratamento com o peróxido de hidrogênio (Alnuqaydan et al., 2014). Além disso, as células foram tratadas por 1 hora com peróxido de hidrogênio e coletadas 48 horas após a indução do estresse oxidativo, pois foi demonstrado que alguns dos efeitos provocados pelo peróxido de hidrogênio são progressivos e atingem seu ápice 48 horas após a indução do estresse (Brenneisen et al., 1997; Alge-Priglinger et al., 2009).

Para a realização dos ensaios de avaliação da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), quantificação da glutathiona reduzida (GSH) e avaliação da peroxidação lipídica, fibroblastos dérmicos humanos foram inoculados na concentração de 2 x 10⁵ células em cada poço de uma placa de 6 poços e as

células foram tratadas por 48 horas com as concentrações de 2,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 10 µg/mL de cada fração do extrato ou com as concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL do extrato bruto para os ensaios de quantificação da glutathiona reduzida e peroxidação lipídica. A indução do estresse oxidativo foi obtida por meio do tratamento por 1 hora com H₂O₂ na concentração de 300 µM em meio DMEM sem SFB (Araújo, 2015). Após este período, o meio com H₂O₂ foi removido e 2 mL de meio DMEM com 10% de SFB foram adicionados às placas e estas foram incubadas por 48 horas (37°C/ 5% CO₂/ 95% UR). Ao término deste período, as células foram recolhidas e submetidas aos procedimentos experimentais de cada um dos ensaios.

4.10. Quantificação de proteína

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

4.11. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase

A avaliação da atividade da enzima SOD, responsável por converter o ânion radical superóxido (O₂⁻) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio molecular (O₂), foi realizada pelo método bioquímico que utiliza o sistema xantina/xantina oxidase como fonte de O₂⁻. A redução do reagente *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), com a consequente formação de cristais de formazan, é utilizada para medir a formação do ânion radical superóxido. A enzima SOD compete com o NBT pelo O₂⁻, 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°C e descongelamento em temperatura ambiente (TA) para obtenção do lisado celular.

Uma solução de NBT na concentração de 60 µM e xantina na concentração de 100 µM foi preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo 0,1 mM de EDTA. Alíquotas de 50 µL do lisado celular foram adicionadas a 900 µL da solução de 60 µM de NBT e 100 µM de xantina. A enzima xantina oxidase (0,00375 U/mL) foi adicionada às amostras no momento imediatamente anterior à leitura da

absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1800, Kyoto, Japão), que foi realizada no modo cinético, por 5 minutos, no comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos como unidade de SOD por miligrama de proteína (Weydert e Cullen, 2010). Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica.

4.12. Avaliação da atividade da enzima catalase

A conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular pela enzima CAT foi medida por acompanhamento da diminuição da absorbância do H₂O₂ 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°C e descongelamento em TA para obtenção do lisado celular. Uma solução 30 mM de H₂O₂ foi preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7. O meio reacional foi composto por 650 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7, 300 µL da solução de H₂O₂ a 30 mM e 50 µL do lisado celular, o qual foi adicionado à solução de H₂O₂ no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1800, Kyoto, Japão), que foi realizada no modo cinético, por 2 minutos, no comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos como unidade de CAT por miligrama de proteína sendo considerada uma unidade internacional de CAT como a quantidade de CAT necessária para decompor 1 µM de H₂O₂ por minuto no pH 7 e temperatura de 25°C (Weydert e Cullen, 2010). Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica.

4.13. Quantificação dos níveis de glutatona reduzida

A glutatona é um tiol intracelular não proteico que exerce papel importante no sistema de defesa antioxidante das células por atuar diretamente na neutralização do oxigênio singlete, radicais hidroxila e superóxido, além de atuar como co-fator de enzimas antioxidantes e na regeneração da vitamina C e E (Pizzorno, 2014). A quantificação da glutatona reduzida presente nas células HFF tratadas com as frações do extrato e com o extrato bruto foi avaliada por meio do ensaio fluorimétrico que mede a fluorescência emitida pelo complexo formado pelo grupo tiol da glutatona e o reagente o-ftaldialdeído (Hissin e Hilf, 1976).

Fibroblastos dérmicos humanos tratados como descrito anteriormente, foram recolhidos em tampão fosfato de sódio e potássio, 1M, pH 7,4, com 0,8% de NaCl e 0,02% de KCl (PBS) e centrifugados a 2684 *xg* por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em água gelada e submetido a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento em TA para obtenção do lisado celular. Para cada mililitro da solução foram adicionados 200 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 30%. As soluções foram submetidas à centrifugação a 2684 *xg* por 6 minutos a 4°C e depois a 16770 *xg* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi utilizado para avaliar os níveis de glutatona reduzida (GSH). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 180 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8, contendo 5 mM de EDTA, 10 µL de amostra ou de GSH padrão e 10 µL de solução de o-ftalaldeído (OPA) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) 1 mg/mL. Após 15 minutos de reação a fluorescência foi medida em leitor de microplacas (Beckman DTX 800, CA, EUA) nos comprimentos de onda de excitação 350 nm e emissão de 420 nm. Para determinação dos níveis de GSH presentes nas amostras foi utilizada a equação de regressão linear da curva de calibração obtida plotando-se as concentrações (mM) de GSH padrão (Sigma-Aldrich, MO, EUA) *versus* unidades de fluorescência (Hissin e Hilf, 1976). Foram realizados três experimentos independentes para este ensaio.

4.14. Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um indicador do estresse oxidativo e está envolvida em diversos processos patológicos. Os lipídeos são responsáveis pela manutenção da integridade das membranas celulares, e o processo de peroxidação dos lipídeos altera a composição, estrutura e a dinâmica da membrana lipídica. Como compostos altamente reativos, os peróxidos de lipídeos são também capazes de promover maior propagação da geração de EROs além de causar danos a outras biomoléculas como o DNA e as proteínas (Gaschler e Stockwell, 2017).

O ensaio de avaliação das substâncias reativas do 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 com absorvância máxima em 532 nm. O

cromóforo formado também pode ser identificado por fluorescência, que pode ser medida em comprimento de excitação de 515 nm e de emissão de 553 nm (Lima e Abdalla, 2001).

A peroxidação lipídica nos fibroblastos foi avaliada de acordo com o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979). Fibroblastos dérmicos humanos, tratados como descrito anteriormente, foram recolhidos em 500 µL de KCl 1,15% e submetidos a ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento em TA para obtenção do lisado celular. O meio reacional foi composto por 25 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS), 187,5 µL de ácido acético 20%, 187,5 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA), 25 µL do lisado celular e o volume de reação foi completado para 1 mL com água deionizada. O meio reacional foi incubado por 1 hora em estufa a 95°C e, após este período, a reação foi resfriada em banho de água gelada. A fluorescência do meio reacional foi medida em leitor de microplacas (PerkinElmer, EnSight Multimode Plate Reader, MA, EUA) nos comprimentos de onda de excitação de 520 nm e emissão de 550 nm. O 1,1,3,3-tetrahidroxipropano (MDA, 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. Foram realizados três experimentos independentes para este ensaio.

4.15. Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio

A quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio foi realizada utilizando o reagente 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), uma sonda estável lipofílica não fluorescente capaz de atravessar a membrana das células. No citosol das células, esterases desacetilam o DCFH-DA e formam a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) que permanece no interior da célula devido a sua polaridade. As espécies reativas de oxigênio oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde que pode ser medida com comprimento de excitação de 510 nm e de emissão de 530 nm. Desta forma, os níveis intracelulares de espécies reativas podem ser medidos por meio da fluorescência emitida pelo DCFoxi (Kalyanaraman et al., 2012).

Fibroblastos dérmicos humanos foram inoculados na concentração de 1×10^4 células em cada poço de uma placa de 96 poços e as células foram tratadas por 48h com as concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL do extrato bruto do fungo ou com as concentrações de 2,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 10 µg/mL das frações. Após este período, o meio com tratamento foi removido, os poços foram lavados e foram adicionados 100 µL de solução de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (20 µM) e a placa foi incubada por 30 minutos (37°C/ 5% CO₂/ 95% UR). Posteriormente, a solução de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína foi removida, os poços foram lavados e foram adicionados 100 µL de solução de H₂O₂ na concentração de 300 µM em meio DMEM sem SFB e as células foram incubadas por 1 hora (37°C/ 5% CO₂/ 95% UR) (Katsuyama et al., 2016). Ao término deste período, o meio com peróxido de hidrogênio foi removido, os poços foram lavados e 50 µL de PBS foram adicionados e a fluorescência produzida foi detectada em leitor de microplacas (Beckman DTX 800, CA, EUA) no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530nm. Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e com no mínimo três replicatas biológicas.

4.16. Extração de RNA e ensaio de RT-qPCR

Os efeitos do tratamento das células HFF, com o extrato bruto e com a fração hexânica, sobre a expressão de genes relacionados à manutenção da homeostase da pele (*COL1A1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1* e *TGF-β*), genes inflamatórios (*IL-1A*, *IL-6*, *NF-κB* e *TNF-α*), genes envolvidos na via das proteínas-quinases ativadas por mitógeno (*FOS*, *JUN*, *MAPK1*, *p38*, *ERK*, *JNK* e *MKP7*), e dos PPARs (*PPARα*, *PPARβ/δ*, *PPARγ*) foram analisados por meio do ensaio de amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Além disso, também foi investigada a influência do tratamento de células HFF com os agonistas e antagonistas das três isoformas do PPAR sobre a expressão gênica do *COL1A1* e da *MMP-1*.

O tratamento das células HFF foi realizado em placas de cultura de 100 x 20 mm com 80 a 90% de confluência. As células foram tratadas por 48 horas com os seguintes compostos: bezafibrato (agonista PPARα, 20 µM), L-165041 (agonista PPARβ/δ, 20 µM), rosiglitazona (agonista PPARγ, 20 µM), extrato bruto (10 µg/mL), fração hexânica (10 µg/mL), GW6471 (antagonista PPARα, 20 µM), GSK0660

(antagonista PPAR β/δ , 20 μ M), T0070907 (antagonista PPAR γ , 20 μ M). O tratamento com os antagonistas das três isoformas do PPAR foi realizado somente com o antagonista ou com o antagonista com adição posterior de extrato bruto (10 μ g/mL), fração hexânica (10 μ g/mL) ou dos agonistas das três isoformas do PPAR, todos na concentração de 20 μ M. Os antagonistas foram adicionados 30 minutos antes do extrato bruto, da fração hexânica ou dos agonistas. Após o período de tratamento, o meio 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 μ M em meio DMEM por 1 hora. Após este período, o meio contendo H₂O₂ foi removido e as placas foram lavadas com 5 mL de PBS. 10 mL de meio DMEM com 10% de SFB foram adicionados às placas e estas foram incubadas por 48 horas (37°C/ 5% CO₂/ 95% UR). Foram realizados três experimentos independentes.

A extração do RNA total das amostras de fibroblastos foi realizada utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen, CA, EUA), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. A concentração e pureza do RNA total extraído foram avaliadas com auxílio do espectrofotômetro NanoVue[™] Plus (GE Healthcare Life Sciences, UK). A integridade do RNA extraído foi avaliada por meio do ensaio de eletroforese em gel de agarose a 1%, para visualização das bandas 18S e 28S do RNA ribossômico. As amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNase I (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o objetivo de remover contaminação por DNA genômico, seguindo recomendações do fabricante.

A quantificação de expressão dos genes *COL1A1*, *FOS*, *JUN*, *MAPK1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *NFE2L2*, *TIMP-1*, *PPAR α* , *PPAR β/δ* , *PPAR γ* e *TGF- β 1* (Apêndice A), nas células HFF tratadas foi feita por PCR quantitativa em um único passo com a utilização do kit *Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step* (Applied Biosystems, CA, EUA). As reações foram realizadas com volume final de reação de 10 μ L, sendo 5,5 μ L de uma mistura composta por Power SYBR[®] Green, enzima transcriptase reversa (RT), *primers forward* e *reverse* (5 pMol/ μ L), e 4,5 μ L da amostra de RNA total, 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 Taq 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, por meio de aumento gradual da temperatura (acréscimos de 0,3°C) de 60°C para 95°C, para demonstrar a especificidade de amplificação dos *primers*. O nível de expressão gênica em cada amostra foi quantificado por meio do método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando a β -actina como controle endógeno (Livak e Schmittgen, 2001).

A expressão dos genes *IL-1A*, *IL-6*, *NF- κ B* e *TNF- α* , *p38*, *ERK*, *JNK* e *MKP7* nas células HFF foi quantificada por meio do sistema de ensaio *TaqMan® Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, CA, EUA). O RNA extraído das células HFF tratadas foi extraído como descrito anteriormente e submetidos à transcrição reversa para produção do cDNA utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Thermo Fisher, CA, EUA), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Posteriormente, o ensaio de qPCR foi realizado utilizando as placas *TaqMan® Array*, as quais possuem sondas específicas para os genes em estudo. As reações foram realizadas com volume final de reação de 20 μ L, sendo 10 μ L da amostra de cDNA, que continham 10 ng de amostra, e 10 μ L do *Master Mix (TaqMan™.Universal Master Mix II*, com uracil-DNA glicosilase). As condições de reação utilizadas nos experimentos foram: 2 minutos a 50°C para atividade da enzima uracil-DNA glicosilase, seguida de 20 segundos a 95°C para ativação da enzima Taq DNA polimerase; 40 ciclos a 95°C por 3 segundos para desnaturação e 60°C por 30 segundos para anelamento do primer e extensão. O nível de expressão gênica em cada amostra foi quantificado por meio do método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o 18S como controle endógeno (Livak e Schmittgen, 2001).

As informações sobre os primers e sondas TAQMAN utilizados encontram-se no Apêndice A.

4.17. Quantificação da síntese de colágeno na cultura de células.

A quantificação da síntese de colágeno foi feita a partir de uma reação cromogênica entre o colágeno e o corante *Sirius Red*, que cora especificamente as moléculas de colágeno, seguida da mensuração espectrofotométrica da biossíntese dessa proteína de acordo com o método descrito por Walsh e colaboradores (1992). O tratamento das células foi realizado como descrito para o ensaio de PCR quantitativo e, ao término do tratamento, o meio de cultura foi recolhido para a

quantificação da síntese de colágeno. Colágeno de tendão equino (Helena Laboratories, TX, EUA) foi utilizado para construção da curva padrão. O volume de 50 µL do meio de cultura ou das diluições do colágeno padrão foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços e a placa foi incubada por 16 horas em incubadora úmida (37°C/ 5% CO₂/ 95% UR) e por 24 horas em estufa seca a 37°C. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com água destilada pelo período de 1 minuto por lavagem. Foram adicionados a cada poço 100 µL de solução de *Direct Red 80* (Sigma-Aldrich, MO, EUA) 0,1% em ácido pícrico saturado (m/v) e as placas foram incubadas por 1h em temperatura ambiente. Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com 200 µL de solução de HCl 10 mM e foram adicionados 200 µL de solução de NaOH 0,1 M para dissolução do colágeno corado. O conteúdo dos poços foi transferido para nova placa de 96 poços e a leitura foi realizada em leitor de microplacas (PerkinElmer, EnSight Multimode Plate Reader, MA, EUA) no comprimento de onda de 540 nm.

4.18. Avaliação de senescência celular.

A coloração associada à atividade da enzima β-Galactosidase tem sido amplamente utilizada para avaliação da senescência celular. A senescência celular é caracterizada pela cessação da proliferação celular e por alterações morfológicas e funcionais nas células. Células senescentes apresentam mudanças no perfil de expressão gênica e expressam a β-galactosidase associada à senescência (SA-β-Gal), enzima responsável por catalisar a hidrólise de β-galactosídeos em monossacarídeos (Chen et al., 2007). A atividade da SA-β-Gal pode ser visualizada por meio da formação de um composto de coloração azul produzido a partir da hidrólise do X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo). A enzima β-galactosidase hidrolisa X-GAL formando galactose e 5-bromo-4-cloro-3-hidroxi-indol, este último na presença de oxigênio é oxidado e convertido no corante azul 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. Desta forma, as células senescentes apresentarão coloração azul após a exposição ao X-GAL (Burn, 2012).

A avaliação da senescência nos fibroblastos foi realizada por meio do ensaio de coloração associada à atividade da β-galactosidase com utilização do kit *Senescence β-Galactosidase Staining* (Cell Signaling Technology, MA, EUA). As células, na

passagem 11, foram plaqueadas em placas de 6 poços ($1,2 \times 10^4$ células por poço) e foram tratadas 48 h com o extrato bruto (10 µg/mL) ou fração hexânica (10 µg/mL) e, posteriormente, com H_2O_2 na concentração de 300 µM por 2 h para indução da senescência celular por estresse (Chen e Ames, 1994). Após o tratamento, as placas foram lavadas com PBS e a fixação e coloração das células foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante do kit SA-β-Gal. As células HFF foram fotomicrografadas em microscópio invertido (Zeiss, Primo Vert, Göttingen, Alemanha), equipado com câmera digital (Zeiss ERC 5s, Göttingen, Alemanha) com aumento de 50x, e a população de células positivas para a β-Galactosidase foi determinada por meio de contagem com auxílio do programa ImageJ (Rasband Wayne, National Institute of Health, EUA).

4.19. Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios foram avaliados estatisticamente no programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism Software*, versão 5.01). Foram utilizados o teste t não-pareado, a análise de variância (*one-way ANOVA*) seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey e pelo teste de comparação de médias Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. Os dados estão expressos como média ± erro-padrão da média e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Produção dos metabólitos dos fungos em cultura líquida submersa e avaliação do rendimento das frações do extrato.

O rendimento das frações foi calculado com relação à massa do extrato bruto e estão representados na Tabela 1. O maior rendimento foi observado para a fração extraída com diclorometano e o menor rendimento foi o da fração extraída com hexano. Por se tratar de uma quantidade muito pequena de extrato, houve uma grande perda de massa no processo de fracionamento de modo que o rendimento total de todas as frações foi de apenas 68,1%.

Tabela 1. Rendimento das frações do extrato do fungo endofítico BvFII.

Frações	Massa do extrato bruto (mg)	Massa da fração (mg)	Rendimento (% m/m)
Acetato de Etila	343,1	31,2	9,1
Diclorometano	343,1	132,9	38,7
Hexânica	343,1	15,6	4,5
Hidroalcoólica	343,1	54,1	15,8

5.2. Quantificação de polifenóis totais

A quantidade de polifenóis totais nas frações do extrato foi proporcional à polaridade dos solventes utilizados, de forma que a fração hidroalcoólica, a mais polar, foi a que apresentou maior teor de polifenóis totais, seguida das frações extraídas com acetato de etila, diclorometano e hexano, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação de polifenóis totais nas frações do extrato.

Frações	Polifenóis totais (μg EAG/mg de extrato)
Acetato de Etila	10,06 \pm 0,81
Diclorometano	8,85 \pm 1,17
Hexânica	4,48 \pm 0,46
Hidroalcoólica	41,99 \pm 4,26

5.3. Quantificação de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides totais nas frações mostrou que apesar de a fração hidroalcoólica ter apresentado o maior teor de polifenóis totais, a quantidade de flavonoides que compõem este total de polifenóis representa apenas 6,88%. A quantidade de flavonoides da fração extraída com acetato de etila representam 53,98% dos polifenóis totais. As frações extraídas com hexano e diclorometano foram as que apresentaram menor quantidade de flavonoides, sendo que esta quantidade representa 42,63% e 20,11% da quantidade de polifenóis totais, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Quantificação de flavonoides totais nas frações do extrato.

Frações	Flavonoides totais ($\mu\text{g EQ/mg}$ de extrato)
Acetato de Etila	$5,43 \pm 1,47$
Diclorometano	$1,78 \pm 0,48$
Hexânica	$1,91 \pm 0,55$
Hidroalcoólica	$2,89 \pm 0,42$

5.4. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante das frações do extrato foi determinada por meio do ensaio de sequestro do radical estável DPPH \cdot . O cálculo da porcentagem de redução do DPPH \cdot 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 \cdot .

A fração extraída com acetato de etila foi a que apresentou maior atividade antioxidante, seguida da fração extraída com diclorometano, da hidroalcoólica e da fração extraída com hexano (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade antioxidante dos padrões e frações do extrato.

Controles e Frações	IC ₅₀ (µg/mL)
Ácido ascórbico	1,89 ± 0,31
BHT	8,87 ± 2,37
Quercetina	1,22 ± 0,33
Fração acetato de etila	498,30 ± 37,33
Fração diclorometano	515,20 ± 59,04
Fração hexânica	7.265,00 ± 2.925,00
Fração hidroalcoólica	836,60 ± 61,15

5.5. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos e de células HeLa tratados com as frações do extrato.

A influência que os metabólitos do fungo endofítico exerciam sobre a viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos e de células HeLa foi avaliada através do ensaio do MTT com o objetivo de determinar as concentrações seguras para serem utilizadas nos demais ensaios. A viabilidade celular de células HFF e HeLa foi expressa em porcentagem em relação à viabilidade observada para o metanol, e o tratamento foi considerado não-citotóxico para viabilidade celular $\geq 70\%$, conforme parâmetros estabelecidos na ISO 10993-5:2009(E).

As células HFF tratadas com 0,1% do veículo metanol apresentaram viabilidade celular de $94,98\% \pm 7,89\%$. A viabilidade celular foi maior que 90% para todas as concentrações testadas da fração acetato de etila e da fração hexânica. As concentrações de 12,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL da fração hidroalcoólica provocaram diminuição da viabilidade celular em relação ao metanol 0,1%, porém para todas as concentrações a viabilidade celular foi maior que 87%. As concentrações de 25 µg/mL a 100 µg/mL da fração de diclorometano provocaram diminuição da viabilidade celular em relação ao metanol 0,1%, porém para todas as concentrações a viabilidade celular foi maior que 85% (figura 7).

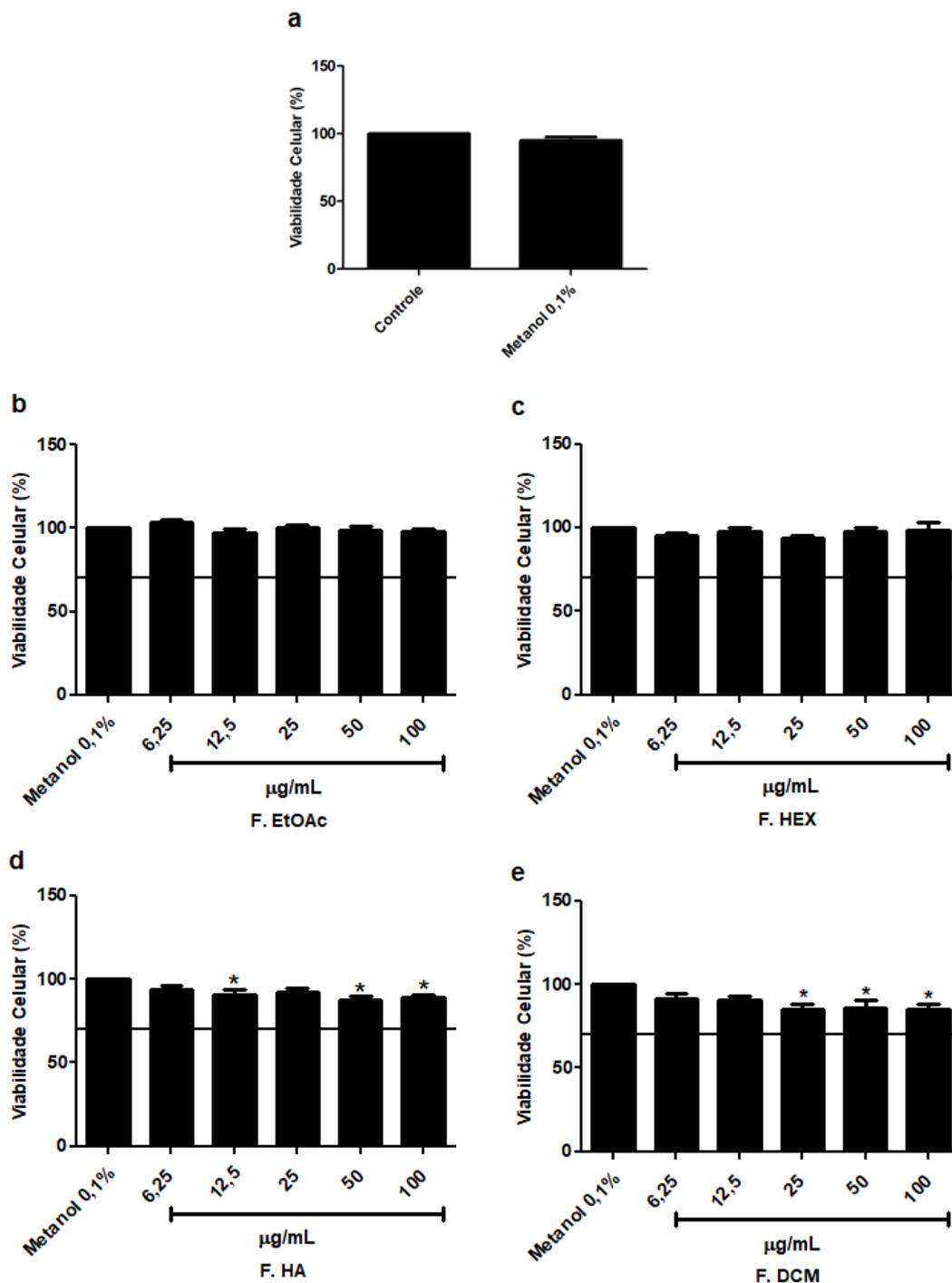


Figura 7. Viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados com frações do extrato.

A viabilidade celular de fibroblastos foi avaliada pelo ensaio do MTT após 48h de tratamento com diferentes concentrações das frações do extrato: a) Controle x Metanol 0,1%; b) Fração acetato de etila (F. EtOAc); c) fração hexânica (F. HEX); d) fração hidroalcoólica (F. HA) e e) fração diclorometano (F. DCM). Os resultados apresentados representam a média \pm erro médio da porcentagem de células viáveis, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,05$ vs metanol 0,1%).

Células HeLa tratadas com 0,01% do veículo metanol apresentaram viabilidade celular de $96,58\% \pm 4,48\%$. As células tratadas com as frações acetato de etila e hexânica apresentaram viabilidade celular acima de 100% para todas as concentrações testadas. A viabilidade celular das células tratadas com a fração hidroalcoólica foi maior que 99% para todas as concentrações utilizadas. As células tratadas com a fração de diclorometano apresentaram viabilidade celular acima de 92% para as concentrações de 0,625 $\mu\text{g/mL}$ a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, e o tratamento com as concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram viabilidade celular de $80,28\% \pm 4,77\%$ e de $81,98\% \pm 4,71\%$, respectivamente (Figura 8).

O ensaio de avaliação da viabilidade celular das células HeLa também foi realizado com concentrações das frações que variaram até 100 $\mu\text{g/mL}$, porém houve diminuição considerável da viabilidade celular no tratamento com concentrações a partir de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, motivo pelo qual concentrações acima de 10 $\mu\text{g/mL}$ não foram utilizadas neste estudo (dados não mostrados).

As concentrações das frações do extrato escolhidas para realização dos demais ensaios tanto com fibroblastos dérmicos humanos como com células HeLa foram: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$. Para os ensaios realizados com o extrato bruto foram utilizadas as concentrações de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, concentrações não-citotóxicas conforme Araújo (2015).

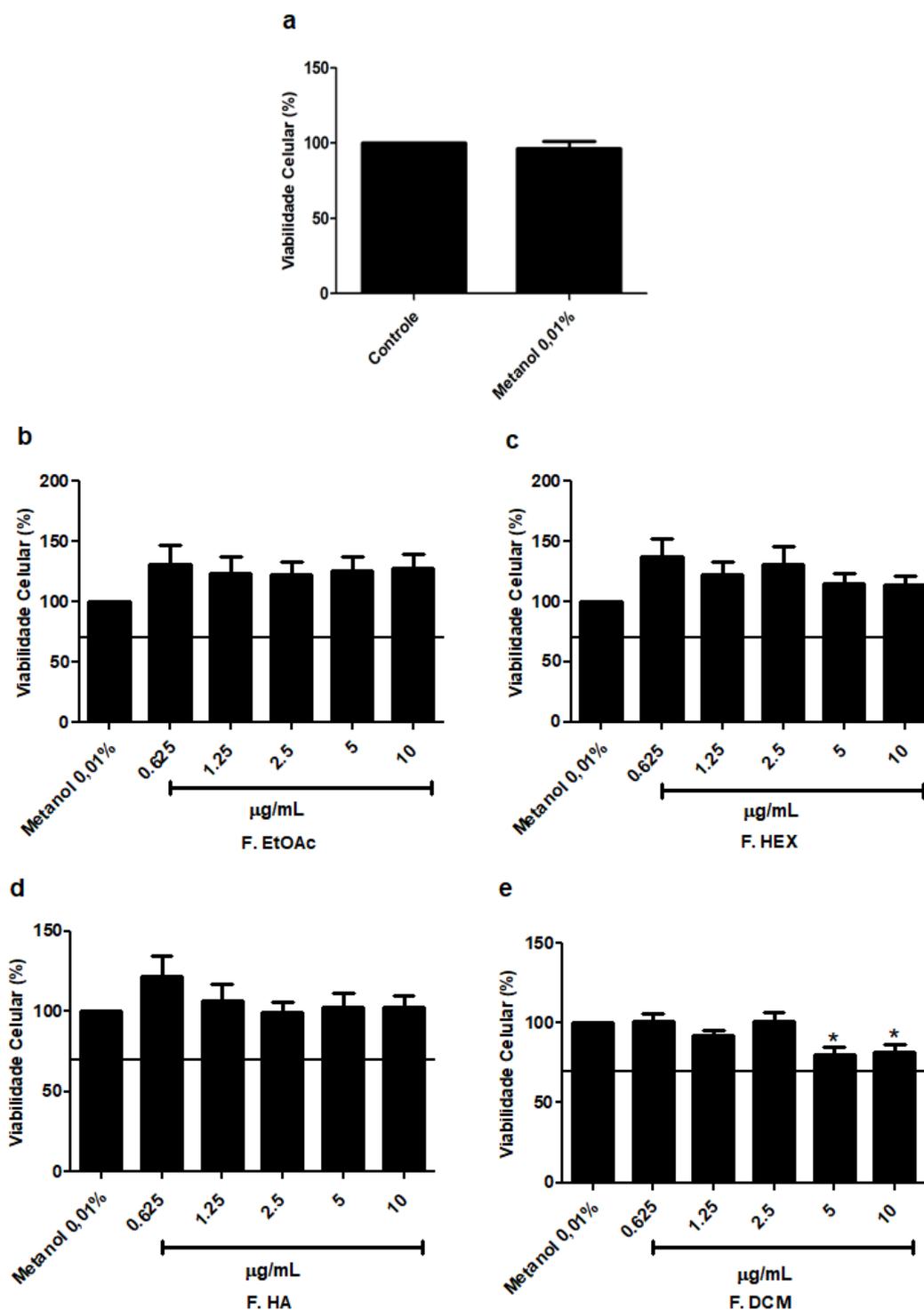


Figura 8. Viabilidade celular de células HeLa tratadas com frações do extrato.

A viabilidade celular de células HeLa foi avaliada pelo ensaio do MTT após 48h de tratamento com diferentes concentrações das frações do extrato: a) Controle x Metanol 0,1%; b) Fração acetato de etila (F. EtOAc); c) fração hexânica (F. HEX); d) fração hidroalcoólica (F. HA) e e) fração diclorometano (F. DCM). Os resultados apresentados representam a média \pm erro médio da porcentagem de células viáveis, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (*one-way ANOVA*) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,05$ vs metanol 0,1%).

5.6. Ensaio do gene repórter para os receptores PPAR α , β/δ e γ

Os resultados obtidos para as células HeLa co-transfectadas com o PPAR α e o elemento responsivo PPRE mostraram que os tratamentos com a concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ da fração hexânica e com a concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ da fração diclorometano promoveram aumento estatisticamente significativo da atividade relativa da luciferase quando comparado ao tratamento com o veículo metanol, e estas atividades representam 66,43% e 70,8% da atividade observada para o tratamento com bezafibrato, respectivamente. O tratamento com as demais concentrações da fração hexânica e diclorometano, assim como com as demais frações, não modificou a atividade relativa da luciferase quando comparadas com as células tratadas com metanol (Figura 9).

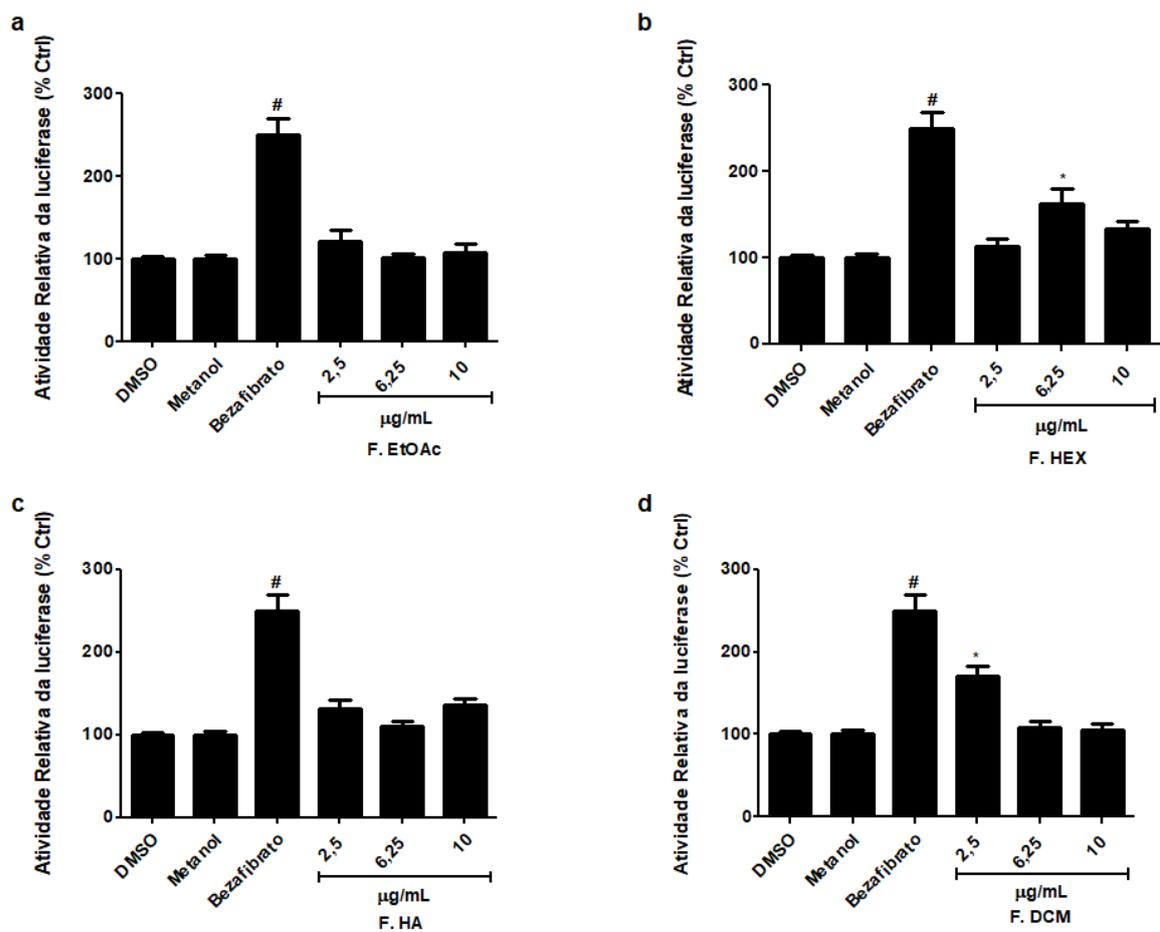


Figura 9. Avaliação do efeito agonista das frações do extrato no PPAR α – ensaio do gene repórter.

Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPAR α e com o plasmídeo contendo seu elemento responsivo (PPRE) fusionado ao gene repórter da luciferase. O tratamento foi realizado com os veículos DMSO e metanol, Bezafibrato 10⁻⁴ M, e com as concentrações de 2,5 µg/mL; 6,25 µg/mL e 10 µg/mL para cada fração do extrato: a) Fração acetato de etila; b) fração hexânica; c) fração hidroalcoólica e d) fração diclorometano. Os resultados apresentados representam a média \pm erro médio da atividade relativa da luciferase, n = 3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, p < 0,05 vs metanol; #, p < 0,05 vs DMSO).

Nas células transfectadas com o PPAR β/δ e o elemento responsivo PPRE, o tratamento com as quatro frações não promoveu alteração na atividade relativa da luciferase quando comparado com o veículo metanol (Figura 10).

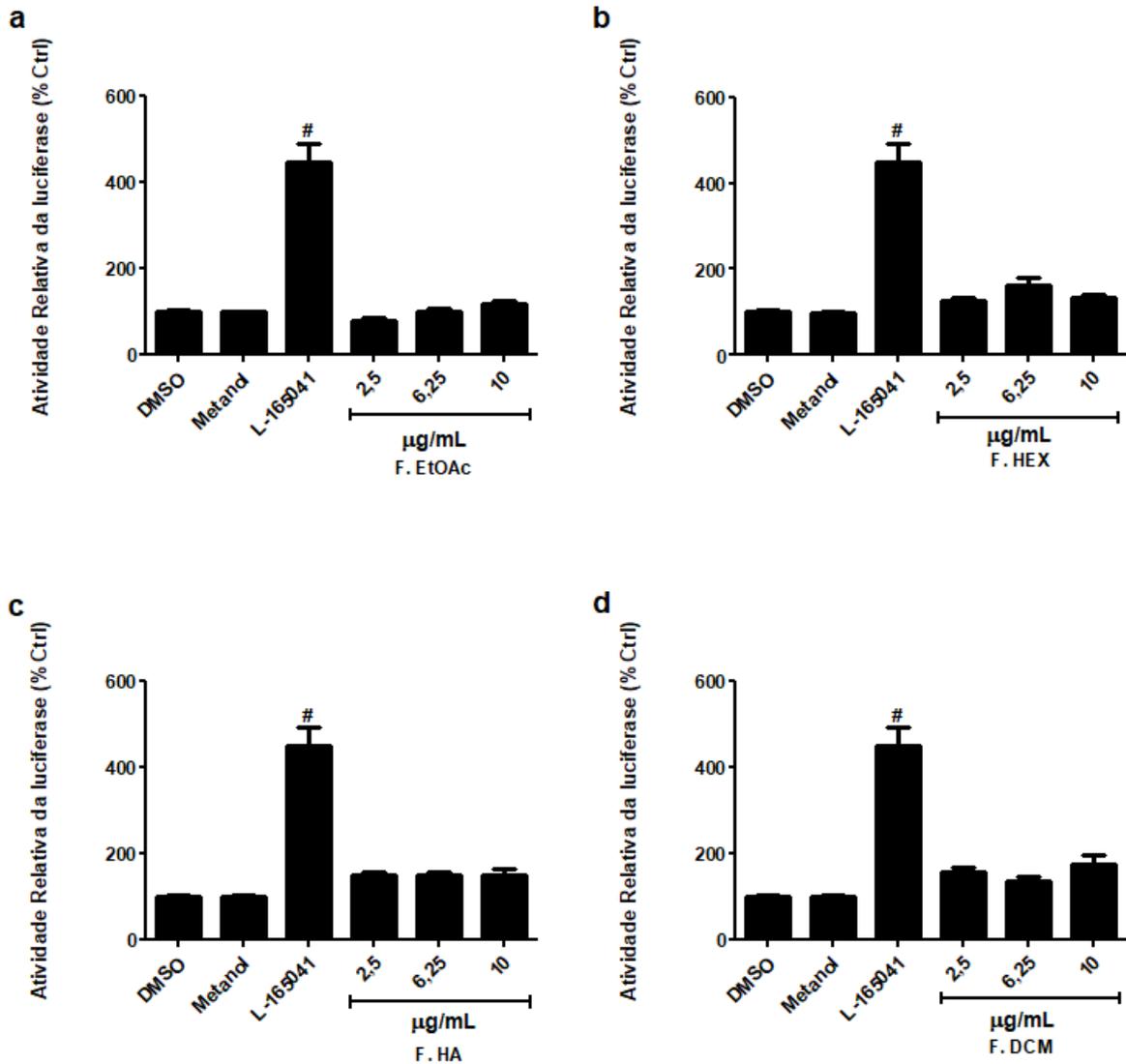


Figura 10. Avaliação do efeito agonista das frações do extrato no PPAR β/δ – ensaio do gene repórter.

Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPAR β/δ e com o plasmídeo contendo seu elemento responsivo (PPRE) fusionado ao gene repórter da luciferase. O tratamento foi realizado com os veículos DMSO e metanol, L-165041 10^{-3} M, e com as concentrações de 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ para cada fração do extrato: a) Fração acetato de etila; b) fração hexânica; c) fração hidroalcoólica e d) fração diclorometano. Os resultados apresentados representam a média \pm erro médio da atividade relativa da luciferase, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($\#$, $p < 0,05$ vs DMSO).

Nas células HeLa co-transfectadas com o plasmídeo do PPAR γ e elemento responsivo PPRE, o tratamento com as frações acetato de etila, hidroalcoólica e de diclorometano não alterou a atividade relativa da luciferase quando comparado com o tratamento com veículo metanol. Em relação às células tratadas com a fração hexânica a atividade da luciferase produzida pelo tratamento com a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ da fração hexânica foi 40,87% da atividade apresentada nas células tratadas com a rosiglitazona (Figuras 11).

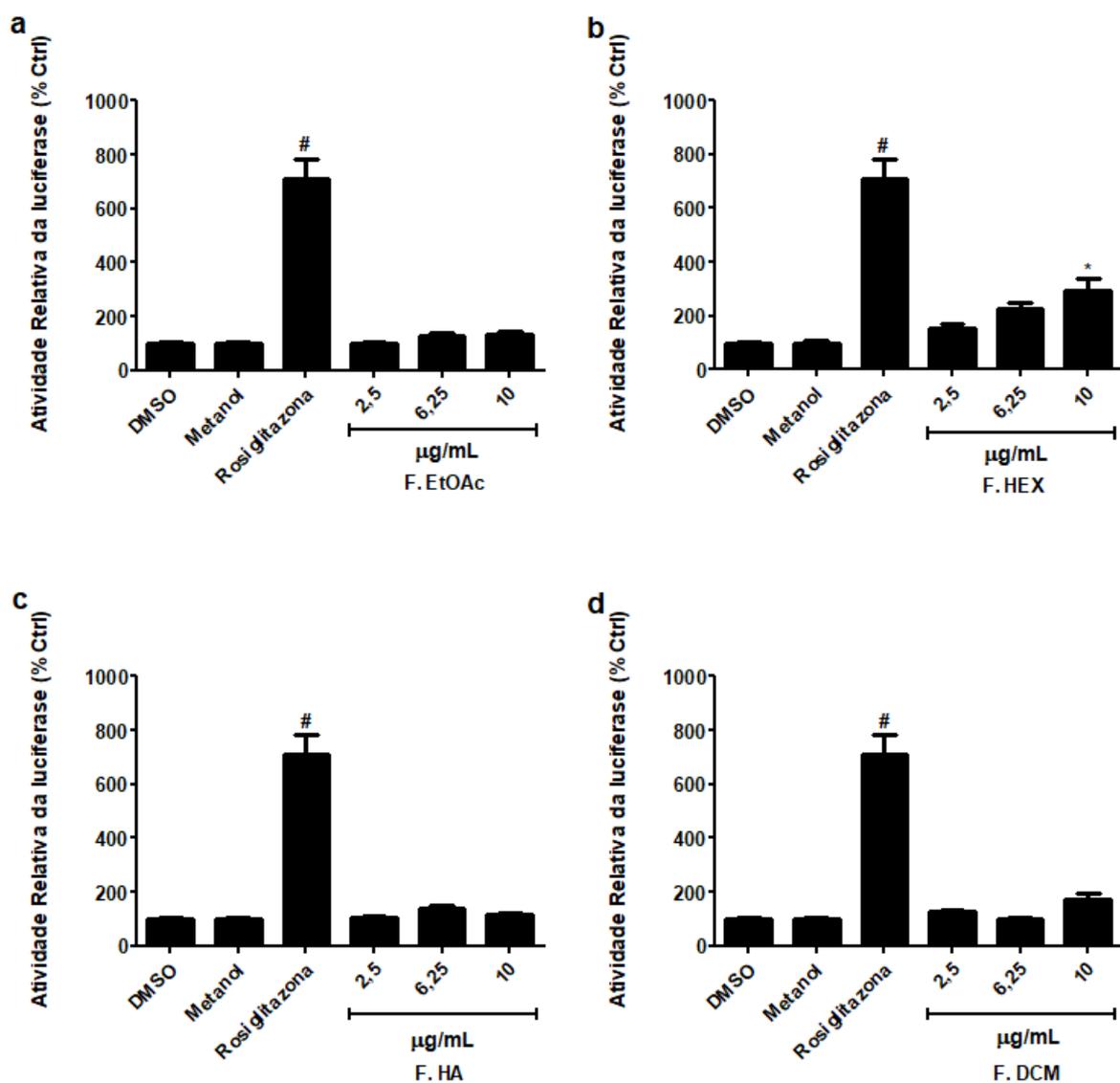


Figura 11. Avaliação do efeito agonista das frações do extrato no PPAR γ – ensaio do gene repórter.

Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPAR γ e com o plasmídeo contendo seu elemento responsivo (PPRE) fusionado ao gene repórter da luciferase. O tratamento foi realizado com os veículos DMSO e metanol, Rosiglitazona 10^{-5} M, e com as concentrações de 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ para cada fração do extrato: a) Fração acetato de etila; b) fração hexânica; c) fração hidroalcoólica e d) fração diclorometano. Os resultados apresentados representam a média \pm erro médio da atividade relativa da luciferase, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,05$ vs metanol; #, $p < 0,05$ vs DMSO).

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

O ensaio de avaliação de atividade da enzima SOD mostrou que o tratamento com peróxido de hidrogênio provocou diminuição da atividade desta enzima, com o controle apresentando $23,28 \pm 10,39$ U/mg de proteína e as amostras tratadas com peróxido de hidrogênio apresentando $3,45 \pm 2,06$ U/mg de proteína. O tratamento com as frações acetato de etila, hexânica e diclorometano induziram aumento na atividade da SOD quando comparado com as amostras expostas ao estresse oxidativo, sendo que as células tratadas com a concentração de $6,25 \mu\text{g/mL}$ da fração de acetato de etila apresentaram $62,20 \pm 16,02$ U/mg de proteína. Nas células tratadas com a concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ da fração hexânica ou da fração diclorometano, a quantidade de SOD foi de $49,92 \pm 8,96$ e $219,40 \pm 61,72$ U/mg de proteína, respectivamente. O tratamento com a fração hidroalcoólica não produziu aumento estatisticamente significativo da atividade da SOD, porém, assim como as demais concentrações das outras frações, houve tendência de aumento da atividade da enzima (Figura 12).

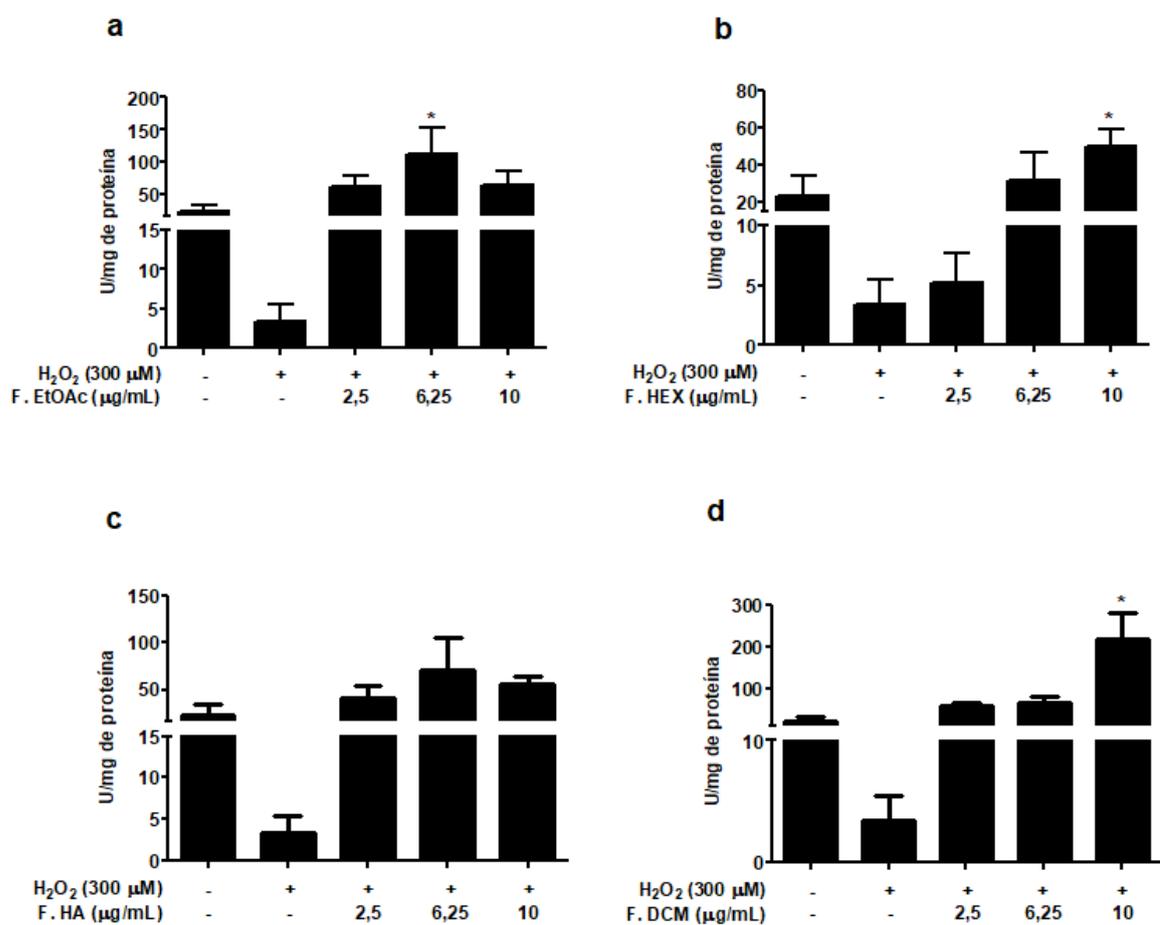


Figura 12. Ensaio de avaliação da atividade da SOD em fibroblastos tratados com frações do extrato de fungo endofítico.

Fibroblastos dérmicos foram tratados como descrito no item 4.9 e o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima SOD. Os resultados apresentados representam média \pm erro médio, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. (*, $p < 0,05$ vs amostras expostas a 300 μM de H_2O_2).

5.8. Ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase.

O ensaio de avaliação de atividade da enzima CAT mostrou que o tratamento com peróxido de hidrogênio provocou diminuição na atividade desta enzima, sendo que o controle apresentou $5,04 \pm 1,07$ U/mg de proteína e as células expostas ao peróxido de hidrogênio apresentaram $3,34 \pm 0,29$ U/mg de proteína. O tratamento prévio das células expostas ao estresse oxidativo com a fração acetato de etila não alterou a atividade da CAT de forma estatisticamente significativa. As células tratadas com as concentrações de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$

e 10 µg/mL desta fração apresentaram $4,36 \pm 0,26$ U/mg de proteína; $3,41 \pm 0,94$ U/mg de proteína, e $5,06 \pm 1,79$ U/mg de proteína, respectivamente (Figura 13a).

As células tratadas com as concentrações de 2,5 µg/mL; 6,25 µg/mL e 10 µg/mL da fração hexânica apresentaram $5,99 \pm 0,73$ U/mg de proteína, $6,63 \pm 1,52$ U/mg de proteína, e $5,97 \pm 1,24$ U/mg de proteína, respectivamente, representando um aumento de 2 a 3 unidades de CAT quando comparadas com as células expostas ao estresse oxidativo (Figura 13b).

A fração hidroalcoólica quando utilizada nas concentrações de 6,25 µg/mL e 10 µg/mL induziu o aumento na atividade da CAT quando comparada com as células expostas ao estresse oxidativo, apresentando atividades específicas de $5,82 \pm 1,62$ U/mg de proteína, e $4,93 \pm 1,08$ U/mg de proteína, respectivamente. As células tratadas com a concentração de 2,5 µg/mL desta fração apresentaram atividade de $3,94 \pm 0,38$ U/mg de proteína (Figura 13c).

Somente o tratamento com a concentração de 10 µg/mL da fração de diclorometano promoveu aumento na atividade da CAT quando comparada com as células expostas ao estresse oxidativo, apresentando $4,49 \pm 0,38$ U/mg de proteína de atividade específica. As células tratadas com as concentrações de 2,5 µg/mL e 6,25 µg/mL desta fração apresentaram $3,78 \pm 0,22$ U/mg de proteína e $4,06 \pm 0,57$ U/mg de proteína, respectivamente (Figura 13d).

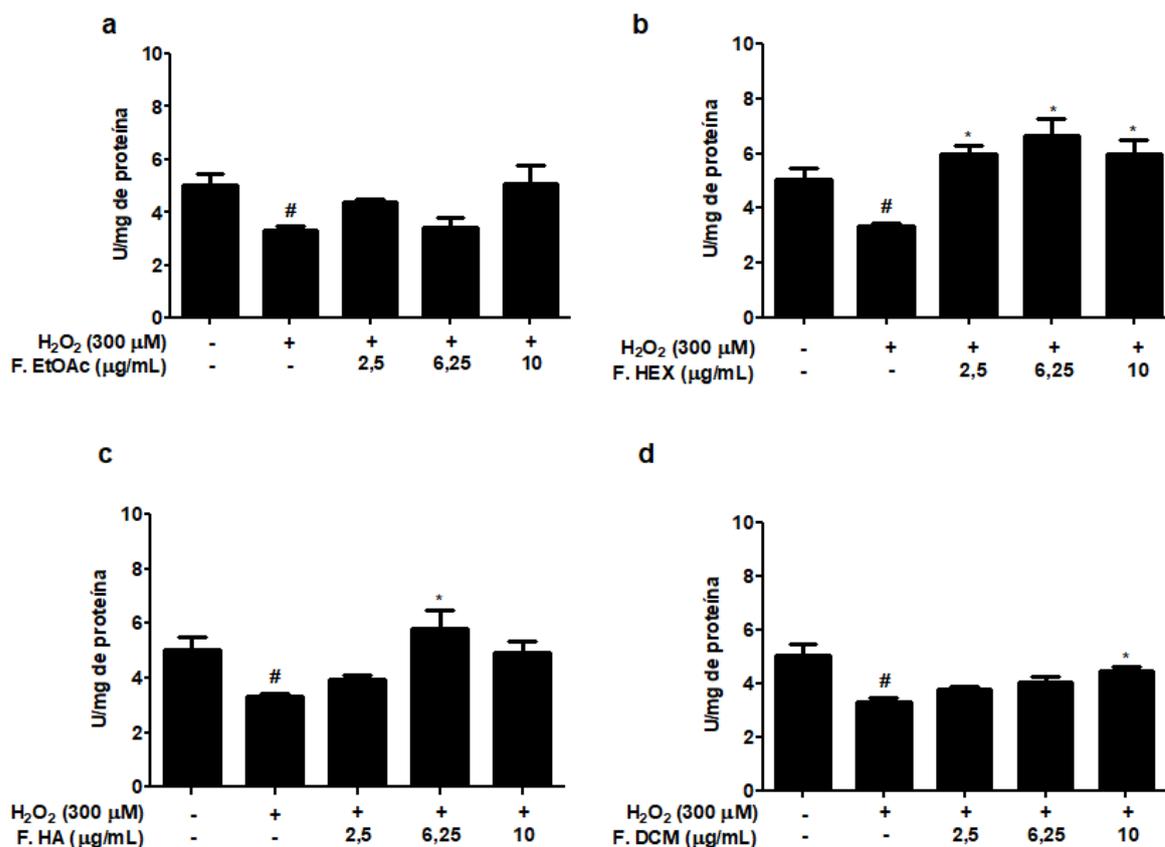


Figura 13. Ensaio de avaliação de atividade da enzima catalase em fibroblastos tratados com as frações do extrato.

Fibroblastos dérmicos foram tratados como descrito no item 4.9, e o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima catalase através do monitoramento do consumo de H₂O₂ 30 mM em espectrofotômetro. Os resultados apresentados representam a média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, p < 0,05 vs amostras expostas a 300 μM de H₂O₂; #, p < 0,05 vs controle).

5.9. Quantificação dos níveis de glutatona reduzida.

O ensaio de quantificação dos níveis de glutatona reduzida nas células HFF identificou que não houve alterações significativas nos níveis de glutatona reduzida nas células expostas ao estresse oxidativo e nas tratadas com as diferentes concentrações das frações do extrato ou com o extrato bruto (Figura 14).

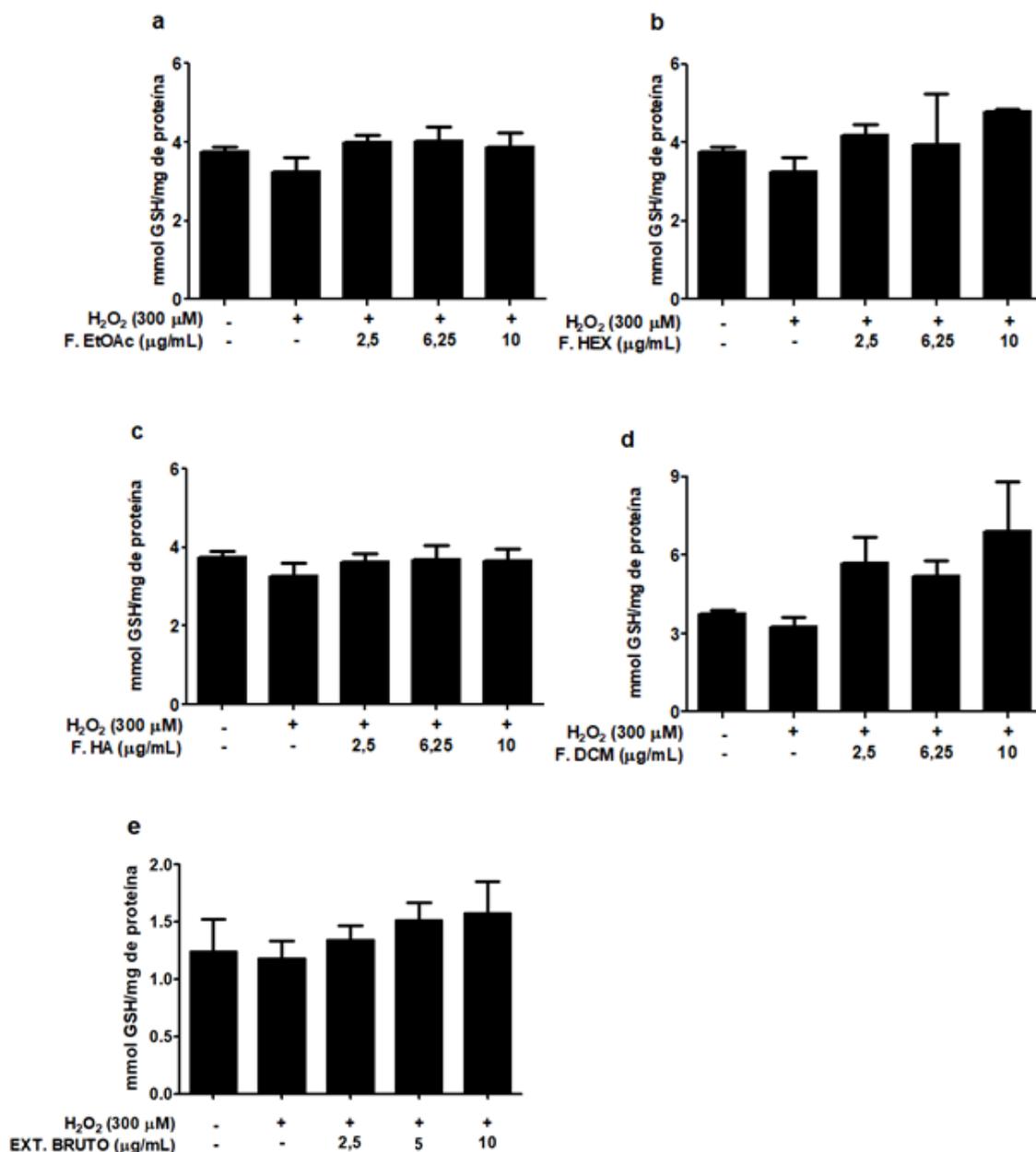


Figura 14. Quantificação dos níveis de glutatona reduzida.

Os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações do extrato bruto ou com sua frações e, após a reação com o o-ftaldeído, a leitura da fluorescência foi feita a 350 nm para excitação e 420 nm para emissão. Os resultados apresentados representam média \pm erro médio, $n = 3$. Resultados avaliados pelo teste de comparação de médias Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's.

5.10. Peroxidação lipídica

Os resultados obtidos para peroxidação lipídica mostraram que houve tendência de aumento na formação de produtos da peroxidação lipídica nas células HFF tratadas com peróxido de hidrogênio quando comparadas com as não tratadas. Quando comparados com o tratamento somente com peróxido de hidrogênio, os tratamentos com as concentrações de 6,25 µg/mL e 10 µg/mL da F. EtOAc, 2,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 10 µg/mL da F.HA e F.DCM, e 5 µg/mL do extrato bruto promoveram tendência de diminuição na formação dos produtos da peroxidação lipídica, e houve tendência de aumento na formação desses produtos na células HFF tratadas com a concentração 10 µg/mL da F.HEX (Figura 15).

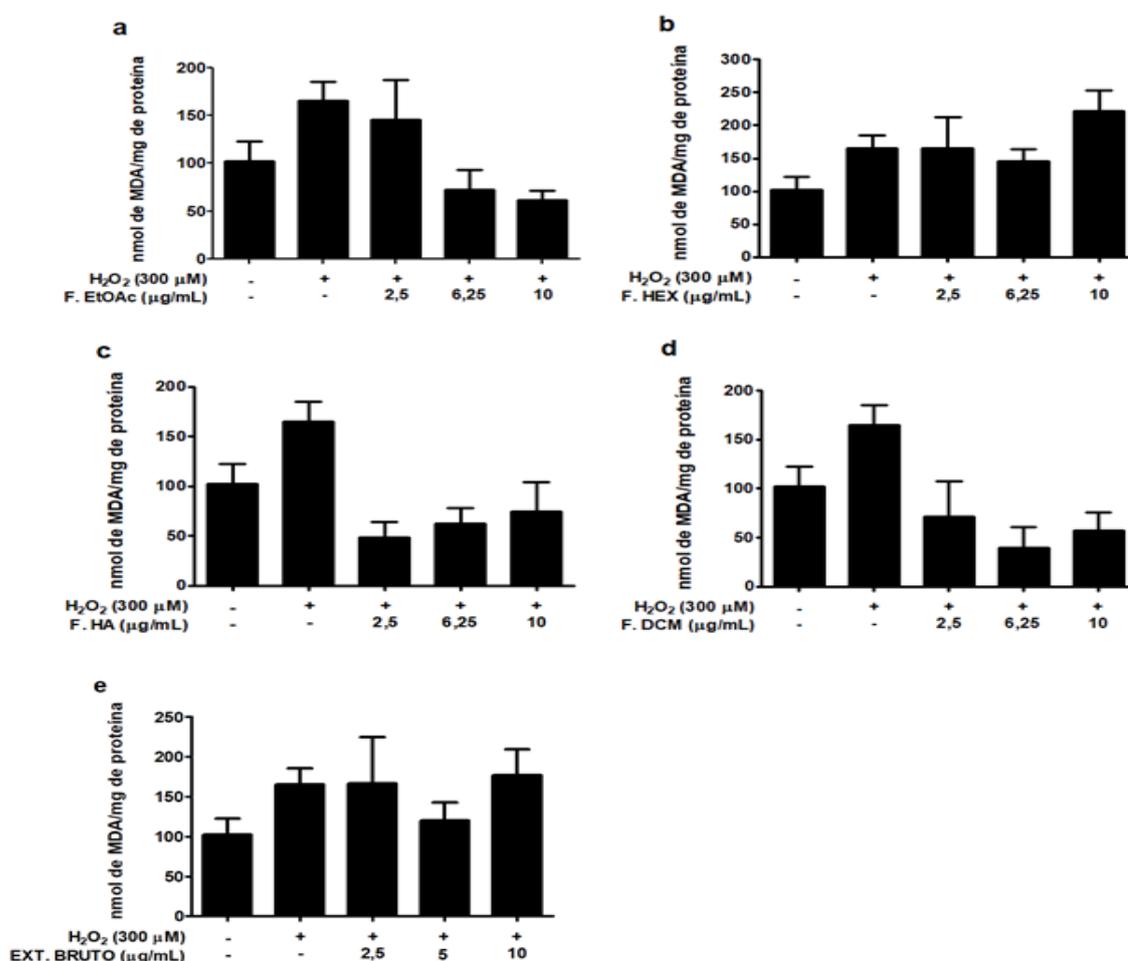


Figura 15. Avaliação da peroxidação lipídica

Os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações das frações do extrato e, após a reação com o ácido tiobarbitúrico, a leitura da fluorescência foi feita a 520 nm para excitação e 550 nm para emissão. Os resultados apresentados representam média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pelo teste de comparação de médias Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's.

5.11. Detecção da geração de espécies reativas do oxigênio por fluorescência

O tratamento dos fibroblastos com H₂O₂ na concentração de 300 µM promoveu aumento de 13,75 vezes na intensidade de fluorescência indicando aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio intracelular. O tratamento das células expostas ao estresse oxidativo com as frações de acetato de etila, diclorometano e hidroalcoólica, não promoveu alterações na intensidade da fluorescência, e o tratamento das células com a fração hexânica promoveu tendência de diminuição na intensidade de fluorescência para as concentrações de 2,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 10 µg/mL. O tratamento com o extrato bruto promoveu diminuição de 1,56; 1,84 e 1,83 vezes na intensidade de fluorescência para as concentrações de 2,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente (Figura 16).

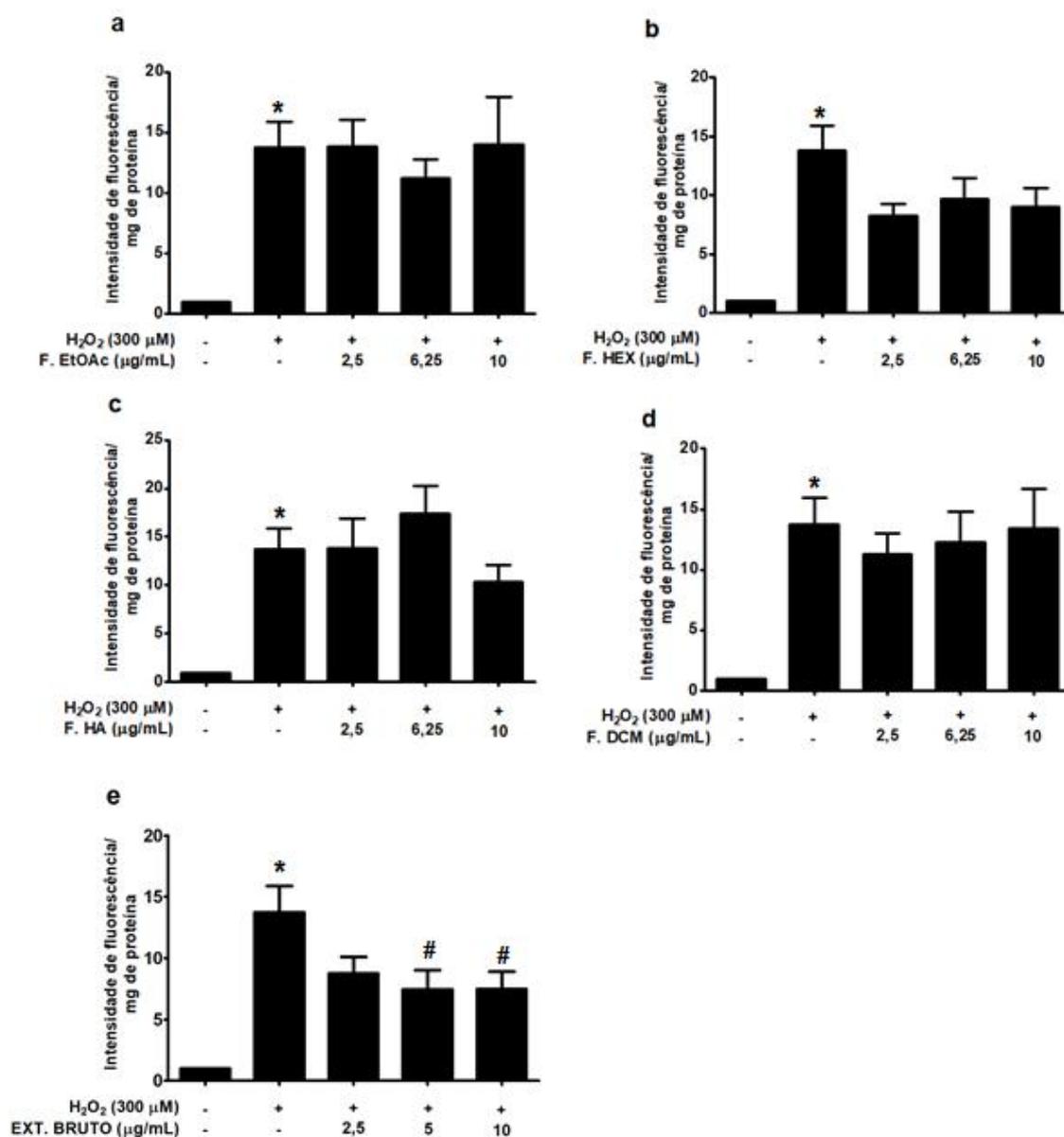


Figura 16. Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio por fluorescência

Os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações do extrato bruto e das suas frações e, após 48 h foram tratadas com DCFH que é oxidada pelas espécies reativas de oxigênio a DCFoxi. A fluorescência deste composto foi detectada no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530 nm. Os resultados apresentados representam média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, p < 0,05 vs células não-tratadas; #, p < 0,05 vs células tratadas com H₂O₂ 300 μM).

5.12. Quantificação relativa da expressão gênica

A expressão relativa de genes relacionados à manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica, a processos inflamatórios, à via de sinalização das proteínas-quinases ativadas por mitógenos e das três isoformas dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais nas células HFF tratadas com 300 μM de H_2O_2 foi avaliada em relação à expressão destes genes nos fibroblastos que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento, sendo cultivados somente em DMEM. A expressão gênica relativa do mRNA destes genes também foi quantificada em fibroblastos expostos ao estresse oxidativo e tratados com o extrato, ou fração hexânica, ou ainda com agonistas ou antagonistas das três isoformas do PPAR e foi avaliada com relação à expressão destes genes nos fibroblastos expostos ao estresse oxidativo e não tratados.

5.12.1. Quantificação relativa da expressão gênica de genes relacionados à manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica

O tratamento das células HFF com o peróxido de hidrogênio na concentração de 300 μM provocou aumento na expressão do mRNA da *MMP-1*, *MMP-3* e do *TGF- β* , diminuição na expressão do mRNA da *MMP-2*, *COL1A1* e *TIMP-1*, e houve tendência de aumento na expressão da *MMP-9*, todos em comparação com o controle (células HFF não-tratadas) (Figura 17).

O tratamento das células HFF expostas ao estresse oxidativo com o extrato bruto promoveu diminuição da expressão da *MMP-1* e não promoveu alterações estatisticamente significativas para a expressão dos demais genes analisados, porém houve tendência de aumento na expressão gênica da *MMP-3*. Não houve expressão da *MMP-9* nas células tratadas com o extrato bruto e, por isso, não há sua representação gráfica. As células HFF expostas ao estresse oxidativo e tratadas com a fração hexânica apresentaram diminuição na expressão da *MMP-1* e tendência de diminuição na expressão da *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1* e *TGF- β* (Figura 18).

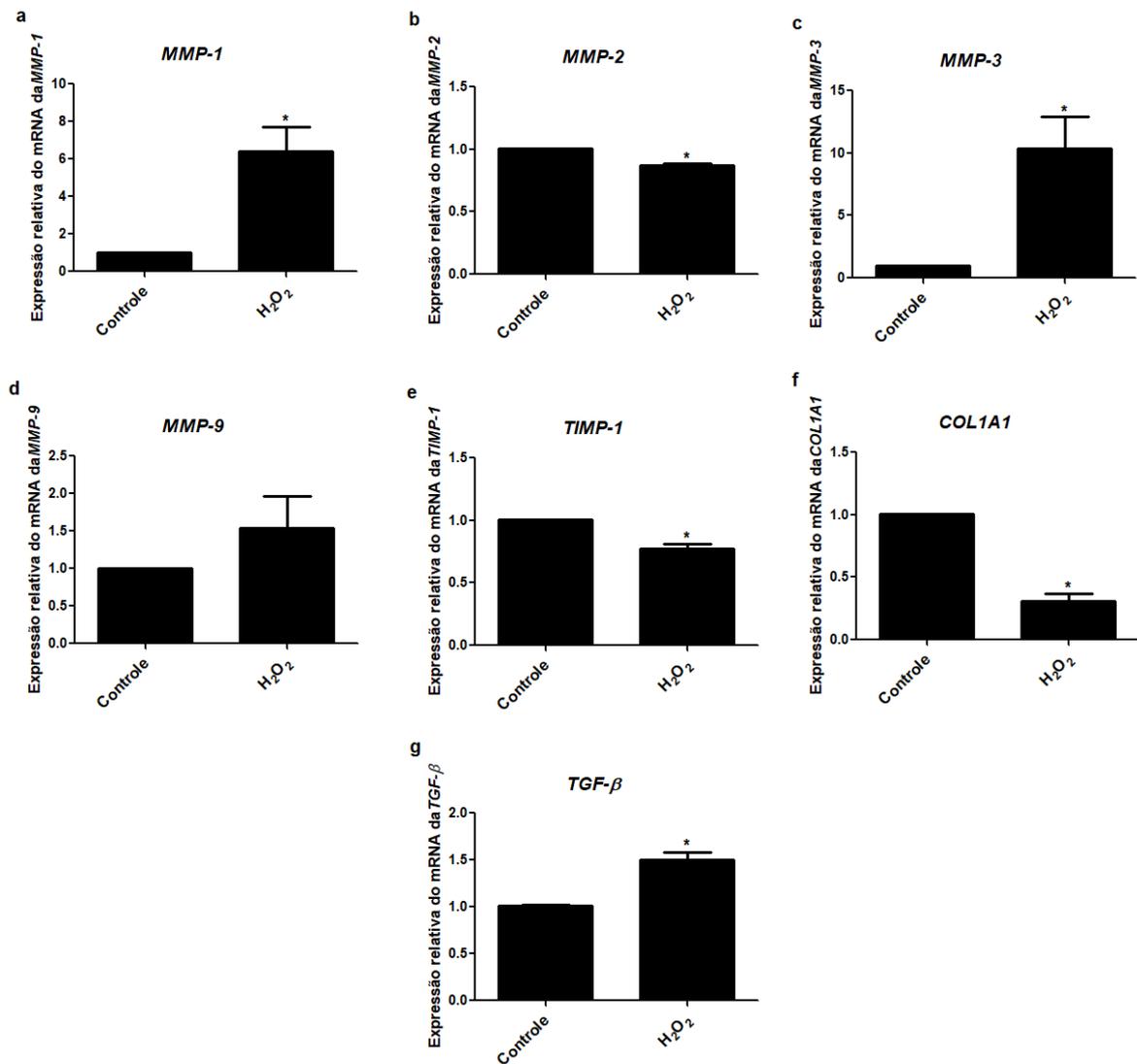


Figura 17. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com peróxido de hidrogênio na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados com a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e o RNA total extraído das amostras foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. A expressão do mRNA dos genes *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *COL1A1*, *TGF-β* e *TIMP-1*, foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da β-actina. A expressão gênica relativa destes genes foi analisada nas amostras submetidas ao estresse oxidativo por tratamento com H₂O₂ em comparação com a do controle não tratado. Os resultados são apresentados como: a) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *MMP-1*; b) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *MMP-2*; c) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *MMP-3*; d) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *MMP-9*; e) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *TIMP-1*; f) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *COL1A1* e g) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *TGF-β*. Os dados representam a média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pelo teste t não-pareado (*, p < 0,05 vs controle).

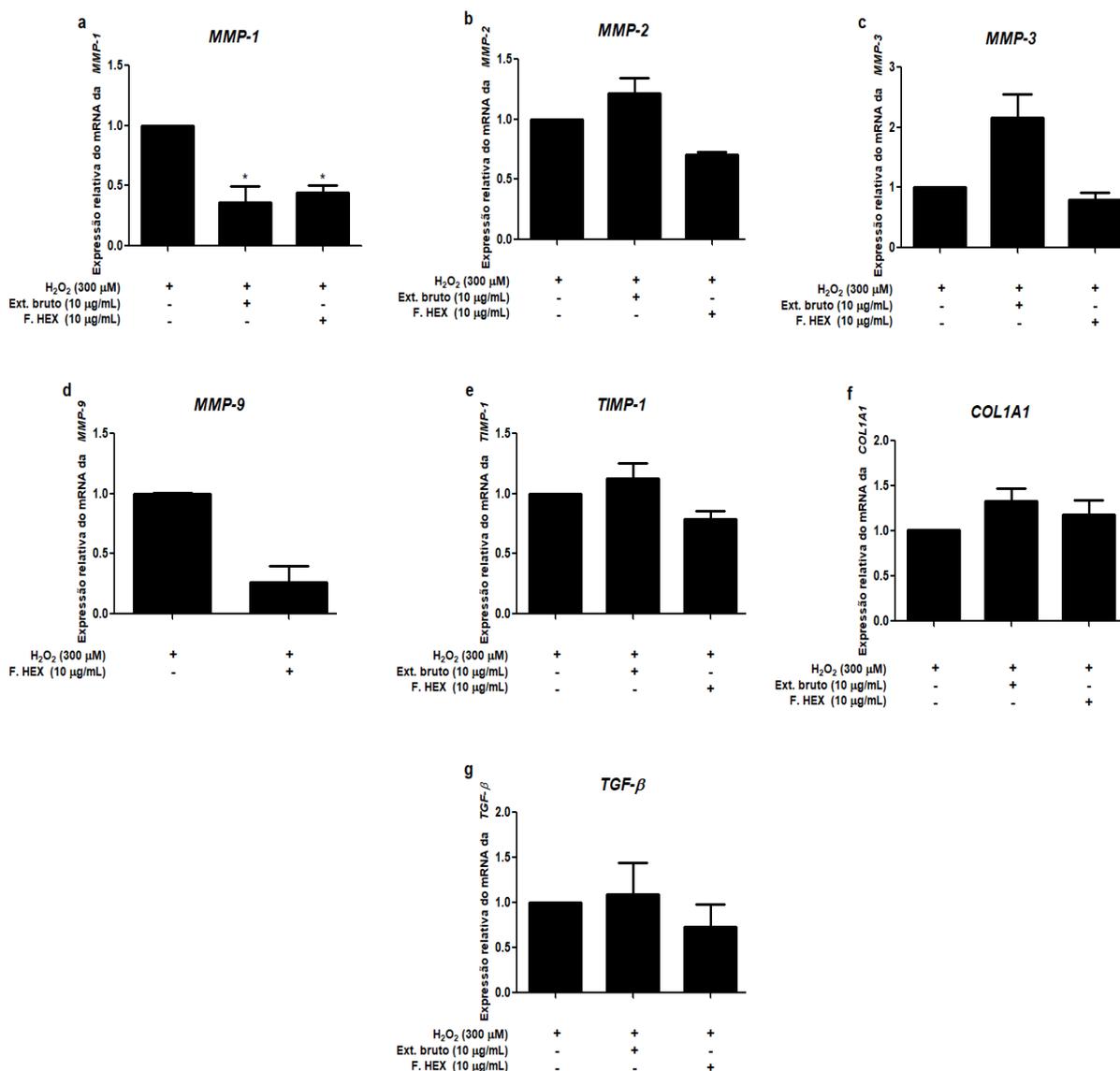


Figura 18. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com o extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados com a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e o RNA total extraído das amostras foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. A expressão do mRNA dos genes *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *COL1A1*, *TGF-β* e *TIMP-1*, foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da β-actina. A expressão gênica relativa destes genes foi analisada nas amostras tratadas com o extrato bruto ou fração hexânica em comparação com as células expostas ao estresse oxidativo por tratamento com H₂O₂ e não-tratadas. Os resultados são apresentados como: a) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *MMP-1*; b) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *MMP-2*; c) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *MMP-3*; d) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *MMP-9*; e) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *TIMP-1*; f) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *COL1A1* e g) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *TGF-β*. Os dados representam a média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, p < 0, vs amostras expostas a 300 μM de H₂O₂).

A expressão da *MMP-1* e do *COL1A1* também foi investigada em células HFF tratadas com agonistas ou antagonistas específicos de cada uma das três isoformas do PPAR, e em células tratadas com o extrato bruto ou fração hexânica na presença dos antagonistas deste receptor nuclear. Os resultados mostraram que o bezafibrato (agonista PPAR α), o L-165041 (agonista PPAR β/δ) e a rosiglitazona (agonista PPAR γ) promoveram diminuição na expressão da *MMP-1*. Apesar de o tratamento com o GW6471 (antagonista PPAR α), o GSK0660 (antagonista PPAR β/δ) e o T0070907 (antagonista PPAR γ) terem apresentado tendência de diminuição da expressão da *MMP-1*, quando utilizados conjuntamente com o agonista específico para cada isoforma do PPAR, houve reversão dos efeitos produzidos pela utilização individual dos agonistas (Figura 19).

Neste ensaio, houve apenas tendência de diminuição da expressão de *MMP-1* nas células HFF tratadas com o extrato bruto, porém o tratamento na presença dos antagonistas do PPAR α e do PPAR γ promoveu tendência de reversão da diminuição na expressão de *MMP-1* produzida pelo tratamento com o extrato bruto. Nas células tratadas com a fração hexânica, a presença dos antagonistas específicos de cada isoforma do PPAR não alterou o efeito de diminuição da expressão de *MMP-1* promovido pelo tratamento com esta fração (Figura 19).

Em relação à expressão do *COL1A1*, o tratamento com os agonistas específicos de cada isoforma do PPAR promoveu aumento na expressão deste gene. O tratamento com os antagonistas do PPAR β/δ e do PPAR γ promoveu diminuição na expressão do *COL1A1* e o tratamento com os agonistas de cada isoforma na presença dos antagonistas específicos reverteu os efeitos promovidos individualmente por cada agonista de PPAR. Não houve diferença significativa na expressão do *COL1A1* nas células tratadas com o extrato bruto ou fração hexânica na presença dos antagonistas específicos de cada isoforma do PPAR, porém houve tendência de diminuição na expressão deste gene nas células tratadas na presença do antagonista do PPAR γ (Figura 20).

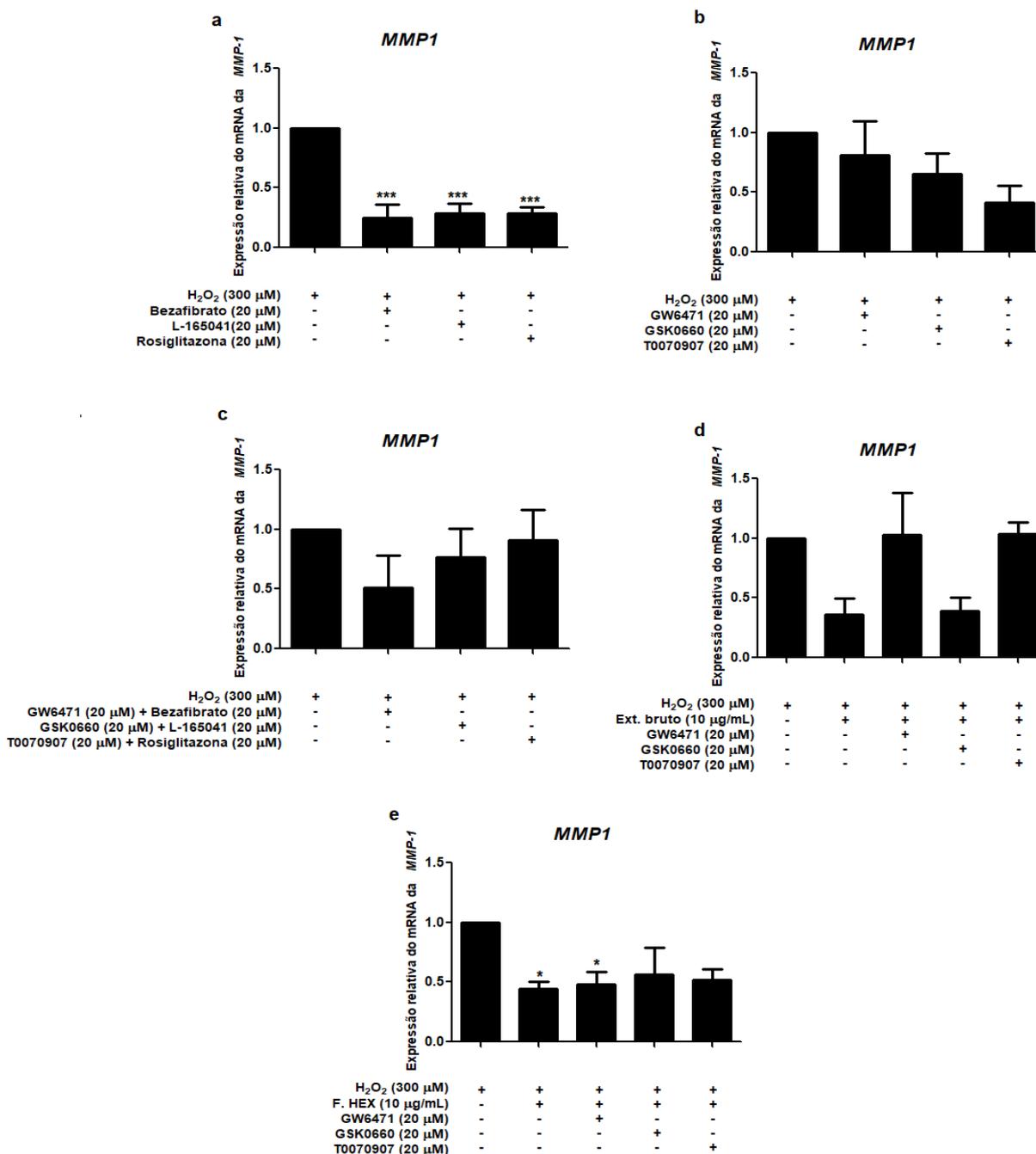


Figura 19. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com agonistas e antagonistas das três isoformas do PPAR na presença ou ausência do extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA da *MMP-1* em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e o RNA total 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. A expressão gênica relativa da *MMP-1* foi analisada nas amostras tratadas e comparada com a das células submetidas ao estresse oxidativo por tratamento com H₂O₂. Os resultados são apresentados como: a) expressão gênica relativa do mRNA da *MMP-1* em amostras tratadas com bezafibrato (agonista PPAR α , 20 μ M), L-165041 (agonista PPAR β/δ , 20 μ M), rosiglitazona (agonista PPAR γ , 20 μ M); b) expressão gênica relativa do mRNA da *MMP-1* em amostras tratadas com GW6471 (antagonista PPAR α , 20 μ M), GSK0660 (antagonista PPAR β/δ , 20 μ M), T0070907 (antagonista PPAR γ , 20 μ M); c) expressão gênica relativa do mRNA da

MMP-1 em amostras tratadas com agonistas e antagonistas das três isoformas do PPAR; d) expressão relativa do mRNA da *MMP-1* em amostras tratadas com o extrato bruto na presença ou ausência de antagonistas das três isoformas do PPAR; e) expressão relativa do mRNA da *MMP-1* em amostras tratadas com a fração hexânica na presença ou ausência dos antagonistas das três isoformas do PPAR. Os dados 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 < 0,05 vs amostras expostas a 300 μ M de H₂O₂; ***, p < 0,0001 vs amostras expostas a 300 μ M de H₂O₂).

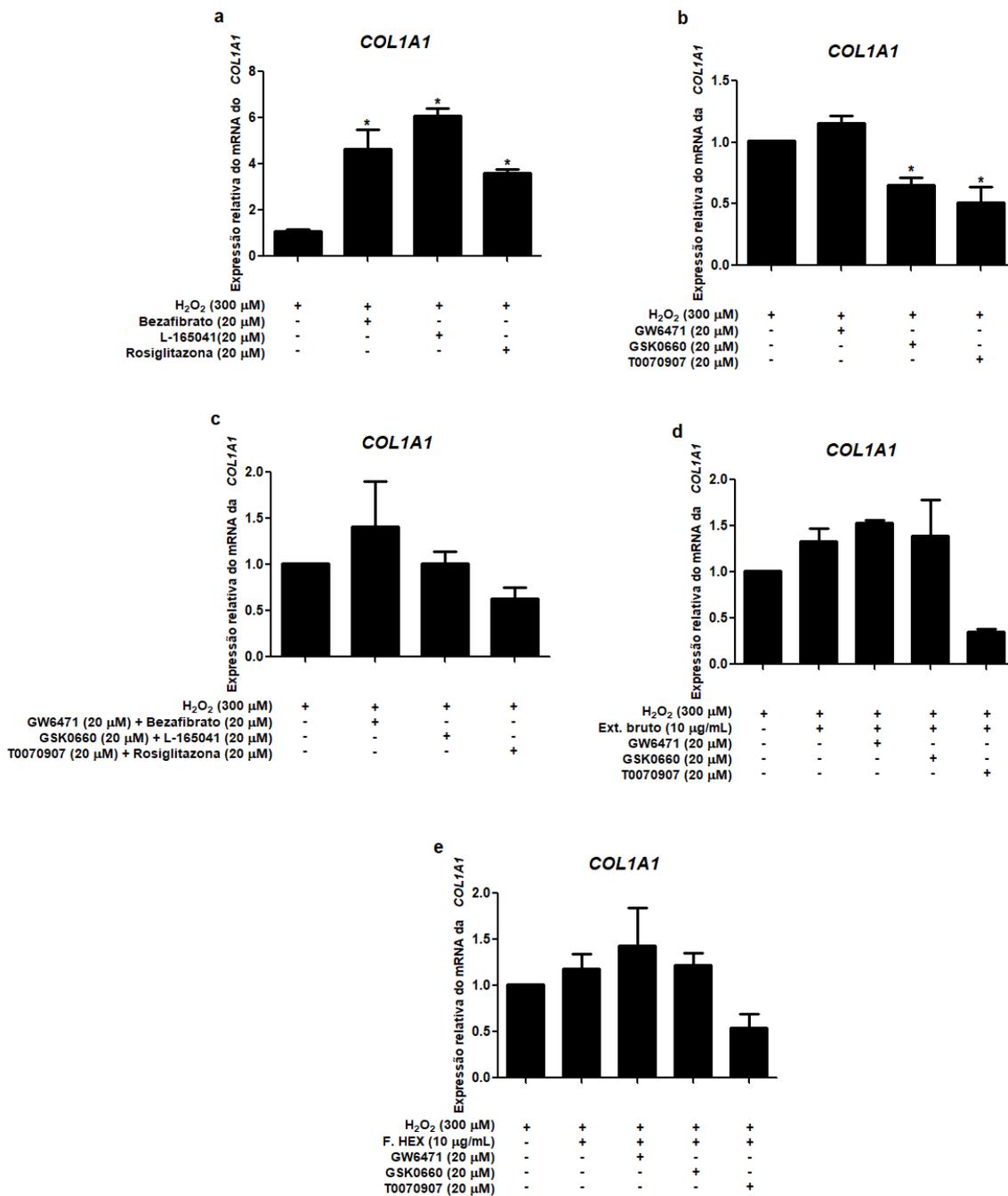


Figura 20. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com agonistas e antagonistas das três isoformas do PPAR na presença ou ausência do extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA do COL1A1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e o RNA total 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. A expressão gênica relativa do COL1A1 foi analisada nas amostras tratadas e comparada com a das células submetidas ao estresse oxidativo por tratamento com H₂O₂. Os resultados são apresentados como: a) expressão gênica relativa do mRNA do COL1A1 em amostras tratadas com bezafibrato (agonista PPAR α , 20 μM), L-165041 (agonista PPAR β/δ , 20 μM), rosiglitazona (agonista PPAR γ , 20 μM); b) expressão gênica relativa do mRNA do COL1A1 em amostras tratadas com GW6471 (antagonista PPAR α , 20 μM), GSK0660 (antagonista PPAR β/δ , 20 μM), T0070907 (antagonista PPAR γ , 20 μM); c) expressão gênica relativa

do mRNA do *COL1A1* em amostras tratadas com agonistas e antagonistas das três isoformas do PPAR; d) expressão relativa do mRNA do *COL1A1* em amostras tratadas com o extrato bruto na presença ou ausência de antagonistas das três isoformas do PPAR; e) expressão relativa do mRNA do *COL1A1* em amostras tratadas com a fração hexânica na presença ou ausência dos antagonistas das três isoformas do PPAR. Os dados 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. (*, $p < 0,05$ vs amostras expostas a $300 \mu\text{M}$ de H_2O_2).

5.12.2. Quantificação relativa da expressão gênica de genes relacionados à inflamação

O tratamento das células HFF com o peróxido de hidrogênio promoveu diminuição na expressão do *NFκB* e da *IL6* e não promoveu alterações significativas na expressão do *TNFα* e da *IL1A* (Figura 21). O tratamento das células expostas ao estresse oxidativo com o extrato bruto promoveu aumento na expressão do *TNFα*, diminuição na expressão de *IL1A* e de *IL6* e tendência de diminuição na expressão do *NFκB*. Já o tratamento com a fração hexânica promoveu diminuição na expressão da *IL1A* e da *IL6* e não alterou a expressão do *NFκB* e do *TNFα* (Figura 22).

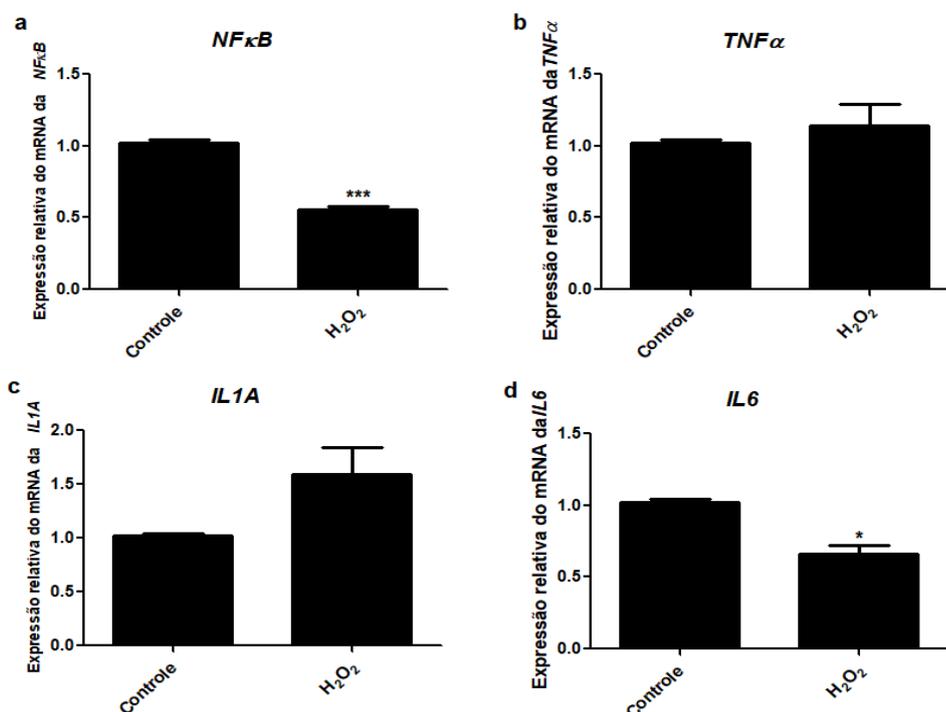


Figura 21. Influência do tratamento com peróxido de hidrogênio na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados à inflamação

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e cDNA das amostras foi submetido ao ensaio qPCR. A expressão do mRNA dos genes *NFκB*, *TNFα*, *IL1A* e *IL6* foi normalizada pela expressão do mRNA do gene *18S*. A expressão gênica relativa destes genes foi analisada nas amostras submetidas ao estresse oxidativo por tratamento com H_2O_2 em comparação com a do controle não tratado. Os resultados são apresentados como: a) expressão gênica relativa do mRNA do gene do

NFκB; b) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *TNFα*; c) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *IL1A*; d) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *IL6*. Os dados representam a média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pelo teste t não-pareado (***, p < 0,0001 vs controle; *, p < 0,05 vs controle).

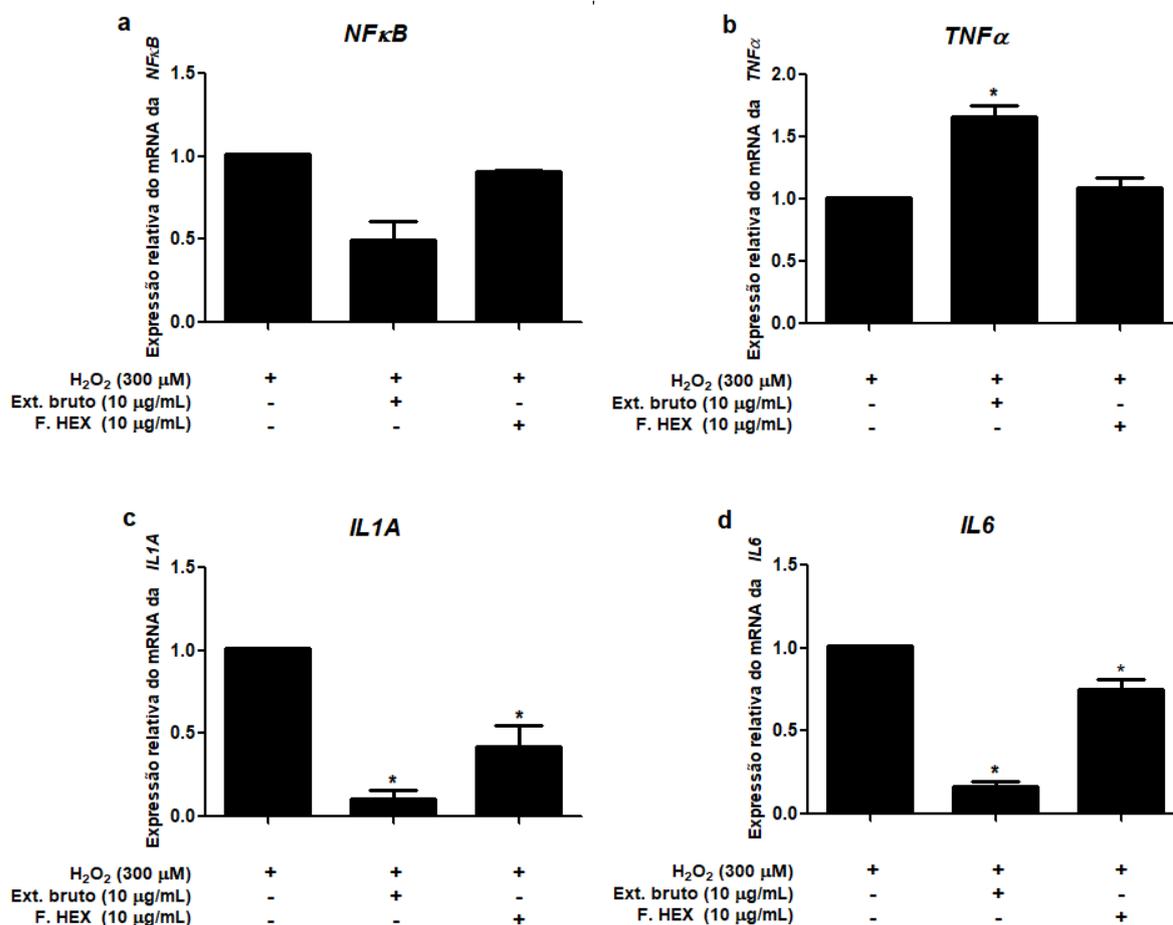


Figura 22. Influência do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com o extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados à inflamação.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e o cDNA das amostras foi submetido ao ensaio de qPCR. A expressão do mRNA dos genes *NFκB*, *TNFα*, *IL1A* e *IL6* foi normalizada pela expressão do mRNA do gene 18S. A expressão gênica relativa destes genes foi analisada nas amostras tratadas com o extrato bruto ou com a fração hexânica em comparação com as células HFF submetidas ao estresse oxidativo por tratamento com H₂O₂. Os resultados são apresentados como: a) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *NFκB*; b) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *TNFα*; c) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *IL1A*; d) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *IL6*. Os dados representam a média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. (*, p < 0,05 vs amostras expostas a 300 μM de H₂O₂).

5.12.3. Quantificação relativa da expressão gênica de genes relacionados à via de sinalização das proteínas-quinases ativadas por mitógenos e do *NFE2L2*

O tratamento das células HFF com o peróxido de hidrogênio na concentração de 300 μ M promoveu diminuição na expressão gênica da *ERK*, do *FOS*, e da *MKP7* e não alterou a expressão gênica de *JNK*, *p38*, *JUN* e da *MAPK1* (Figura 23).

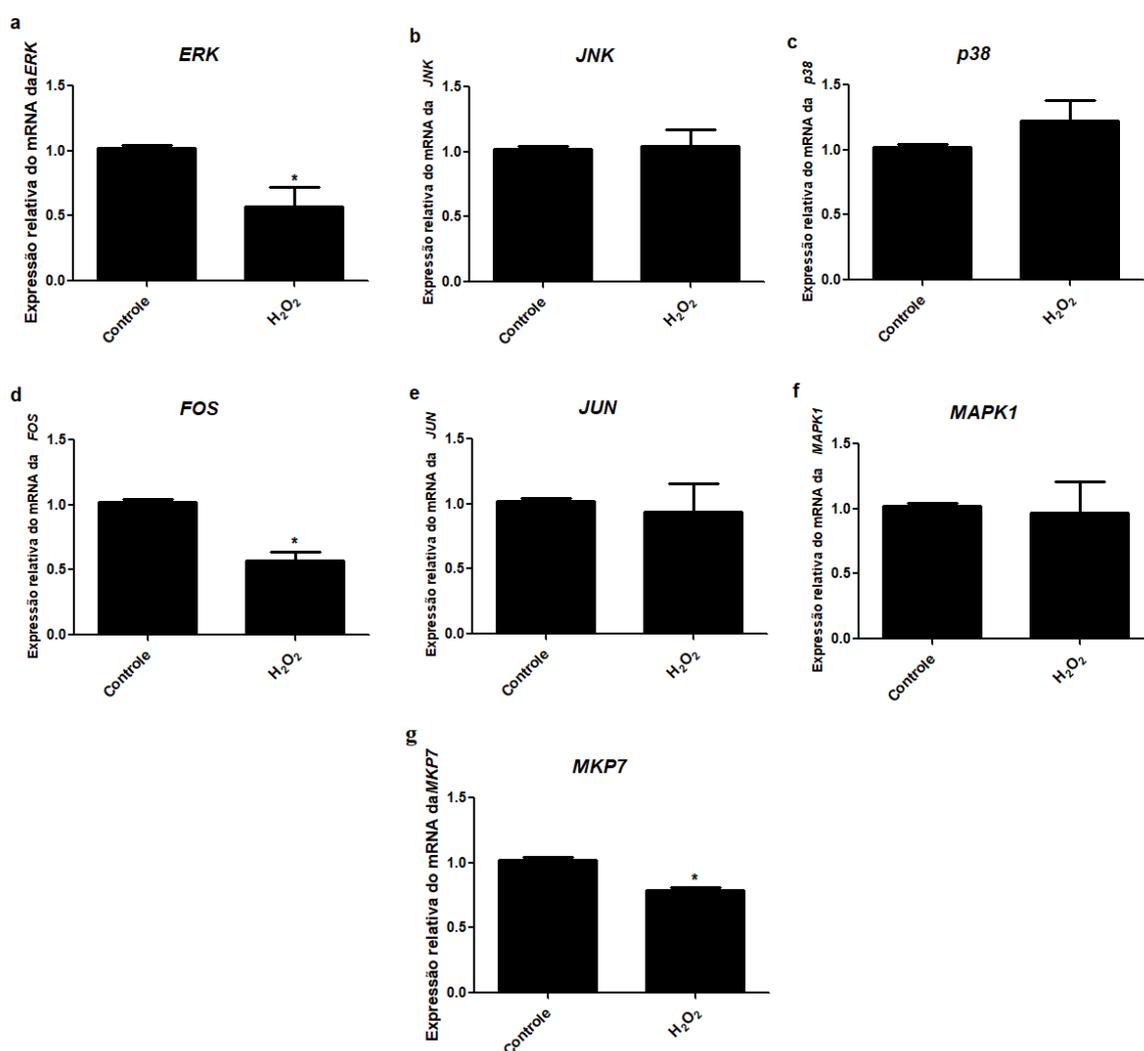


Figura 23. Influência do tratamento com peróxido de hidrogênio na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados à via de sinalização das MAPK. Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e cDNA ou RNA total das amostras foi submetido ao ensaio qPCR ou RT-qPCR. A expressão do mRNA dos genes *ERK*, *JNK* e *p38* foi normalizada pela expressão do mRNA do gene *18S*, e a expressão do mRNA dos genes *FOS*, *JUN* e *MAPK1* foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da *β -actina*. A expressão gênica relativa destes genes foi analisada nas amostras submetidas ao estresse oxidativo por tratamento com H₂O₂ em comparação com a do controle não tratado. Os resultados são apresentados como: a) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *ERK*; b) expressão gênica relativa do mRNA do gene da *JNK*; c) expressão gênica relativa do mRNA do gene da *p38*; d) expressão gênica relativa do mRNA

do gene do *FOS*; e) expressão gênica relativa do mRNA da *JUN*; f) expressão gênica relativa do gene da *MAPK1* e g) expressão gênica relativa do gene da *MKP7*. Os dados representam a média \pm erro médio, n = 3. Resultados avaliados pelo teste t não-pareado (*, p < 0,05 vs controle).

O tratamento com o extrato bruto das células HFF submetidas ao estresse oxidativo induziu aumento na expressão gênica da *p38*, *JUN* e da *MAPK1*, tendência de aumento na expressão do *FOS*, não alterou a expressão de *ERK* e de *JNK*, e diminuiu a expressão da *MKP7*. Em relação às células HFF expostas ao estresse oxidativo e tratadas com a fração hexânica não houve alteração significativas na expressão gênica dos genes relacionados à via de sinalização MAPK, porém houve tendência de aumento na expressão de *ERK*, *p38*, *FOS* e *JUN* e de diminuição da expressão da *MKP7* (Figura 24).

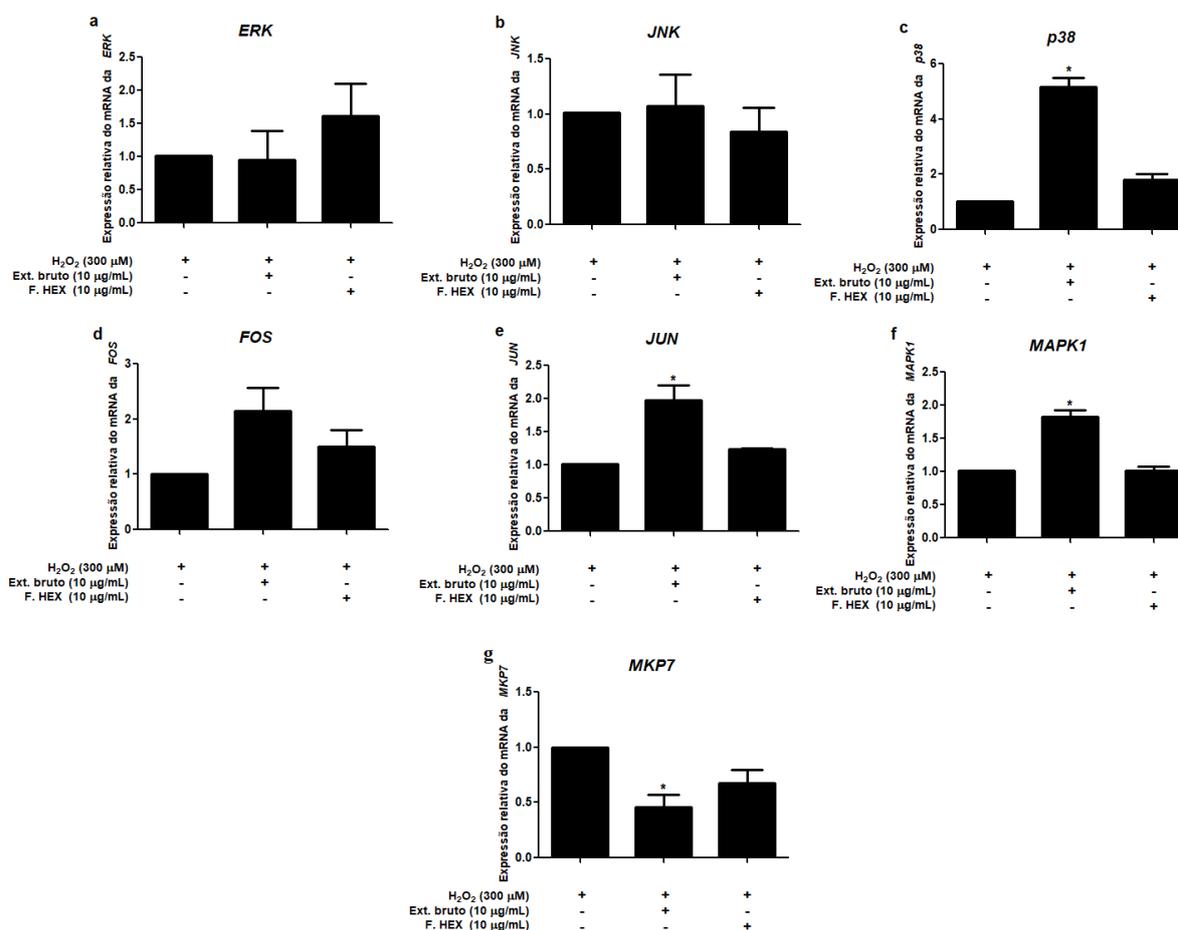


Figura 24. Influência do tratamento com o extrato bruto ou fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA de genes relacionados à via de sinalização das MAPK.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e cDNA ou RNA total das amostras foi submetido ao ensaio qPCR ou RT-qPCR. A expressão do mRNA dos genes *ERK*, *JNK* e *p38* foi normalizada pela expressão do mRNA do gene *18S*, e a expressão do mRNA dos genes *FOS*, *JUN* e *MAPK1* foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da *β-actina*. A expressão gênica

relativa destes genes foi analisada nas amostras tratadas com o extrato bruto ou com a fração hexânica em comparação com as células HFF submetidas ao estresse oxidativo por tratamento com H₂O₂. Os resultados são apresentados como: a) expressão gênica relativa do mRNA do gene da *ERK*; b) expressão gênica relativa do mRNA do gene da *JNK*; c) expressão gênica relativa do mRNA do gene da *p38*; d) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *FOS*; e) expressão gênica relativa do mRNA da *JUN*; f) expressão gênica relativa do gene da *MAPK1* e g) expressão gênica relativa do gene da *MKP7*. Os dados representam a média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. (*, p < 0,05 vs amostras expostas a 300 µM de H₂O₂).

Os resultados obtidos para a expressão de *NFE2L2* mostraram que a exposição das células ao peróxido de hidrogênio promoveu tendência de diminuição na expressão deste gene. Nas células tratadas com o extrato bruto ou com a fração hexânica não houve alteração na expressão gênica do *NFE2L2* (Figura 25).

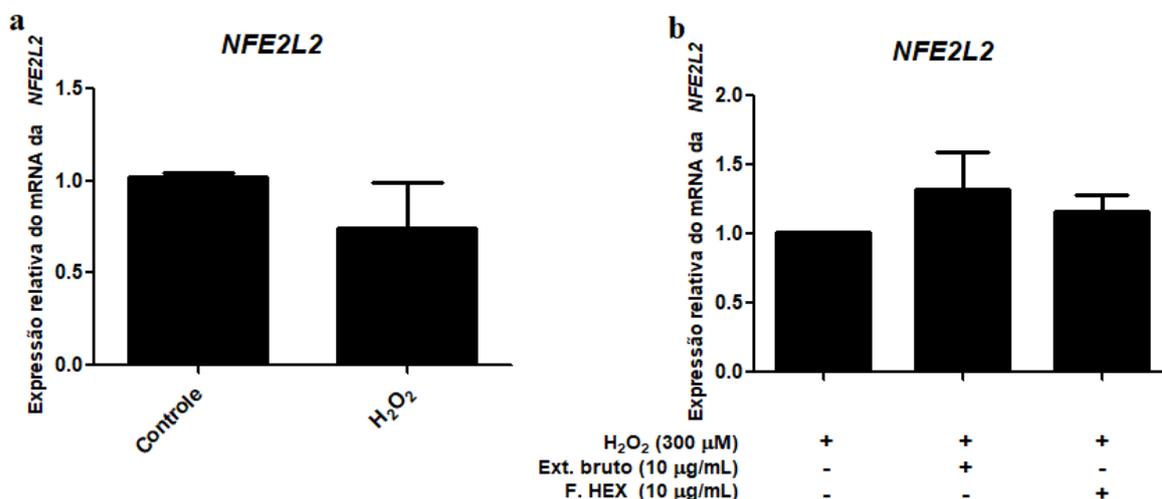


Figura 25. Influência do tratamento com peróxido de hidrogênio, com o extrato bruto e fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA do gene *NFE2L2*.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e o cDNA ou RNA total das amostras foi submetido ao ensaio qPCR ou RT-qPCR. A expressão do mRNA do gene *NFE2L2* foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da *β-actina*. A expressão gênica relativa destes genes foi analisada nas amostras expostas ao estresse oxidativo em comparação às amostras de células não-tratadas e nas células tratadas com o extrato bruto ou com a fração hexânica em comparação com as células HFF submetidas ao estresse oxidativo por tratamento com H₂O₂. Os resultados são apresentados como: a) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *NFE2L2* em comparação ao controle não-tratado; b) expressão gênica relativa do mRNA do gene do *NFE2L2* nas células tratadas em comparação às células expostas ao estresse oxidativo. Os dados representam a média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pelo teste t não-pareado ou pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. (*, p < 0,05 vs controle ou às amostras expostas a 300 µM de H₂O₂).

5.12.4. Quantificação relativa da expressão gênica do *PPAR α* , *PPAR β/δ* e *PPAR γ*

A exposição das células HFF ao tratamento com peróxido de hidrogênio produziu tendência de diminuição na expressão gênica do *PPAR α* , *PPAR β/δ* e *PPAR γ* . Nas células submetidas ao estresse oxidativo e tratadas com o extrato bruto houve aumento na expressão do *PPAR α* e *PPAR β/δ* , e tendência de diminuição na expressão do *PPAR γ* . O tratamento com a fração hexânica não promoveu alterações na expressão gênica nas três isoformas do PPAR, porém houve tendência de diminuição na expressão do *PPAR γ* (Figura 26).

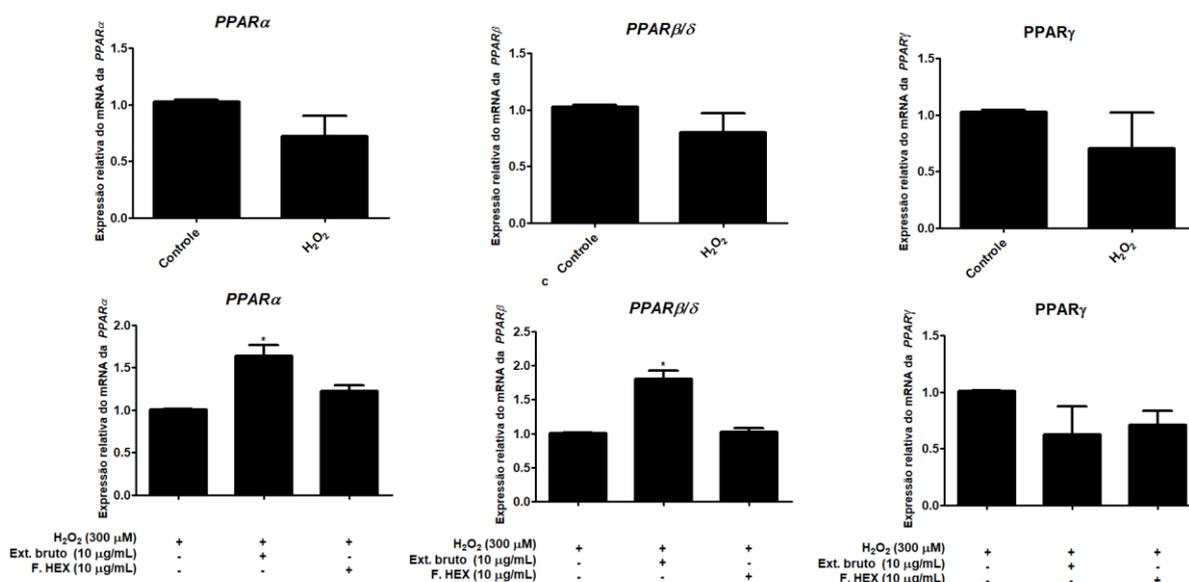


Figura 26. Influência do tratamento com peróxido de hidrogênio, com o extrato bruto e fração hexânica na expressão gênica relativa do mRNA do *PPAR α* , *PPAR β/δ* e *PPAR γ*

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e o RNA total das amostras foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. A expressão do mRNA dos genes *PPAR α* , *PPAR β/δ* e *PPAR γ* foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da *β -actina*. A expressão gênica relativa destes genes foi analisada nas amostras expostas ao estresse oxidativo em comparação às amostras de células não-tratadas e nas células tratadas com o extrato bruto ou com a fração hexânica em comparação com as células HFF submetidas ao estresse oxidativo por tratamento com H₂O₂. Os dados representam a média \pm erro médio, n = 3. Resultados avaliados pelo teste t não-pareado ou pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. (*, p < 0,05 vs controle ou às amostras expostas a 300 μ M de H₂O₂).

5.13. Quantificação de colágeno

Os resultados obtidos para a quantificação de colágeno no meio de cultivo das células HFF mostrou que a exposição destas células ao peróxido de hidrogênio promoveu tendência de diminuição na produção de colágeno, e o tratamento tanto com o extrato bruto quanto com a fração hexânica promoveu tendência de aumento na produção de colágeno quando comparado com as células submetidas ao estresse oxidativo e não tratadas, porém não foi observada diferença significativa entre todos os tratamentos (Figura 27).

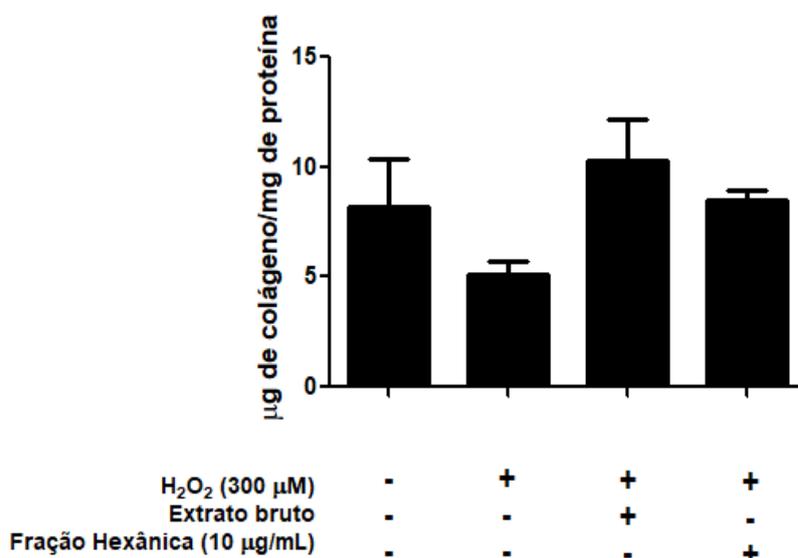


Figura 27. Quantificação de colágeno no meio de cultivo de células HFF expostas ao estresse oxidativo e tratadas com o extrato bruto ou com a fração hexânica.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.16 e o meio de cultivo foi submetido a ensaio colorimétrico para quantificação de colágeno. Os dados 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.

5.14. Avaliação da Senescência

Os resultados obtidos para o ensaio de avaliação da atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência celular mostraram que as células não expostas ao tratamento com peróxido de hidrogênio, que foi utilizado neste experimento com o intuito de induzir a senescência celular por estresse, já apresentavam perfil de senescência celular, porém o tratamento com peróxido provocou aumento no número de células positivas para a β -galactosidase. Nas células tratadas com o extrato bruto houve tendência de diminuição na quantidade de células coradas pela atividade da β -galactosidase e nas células tratadas com a fração hexânica houve diminuição da coloração associada à atividade da β -galactosidase, sendo que esta coloração não apresentou diferença em relação à das células não expostas ao estresse oxidativo (Figura 28).

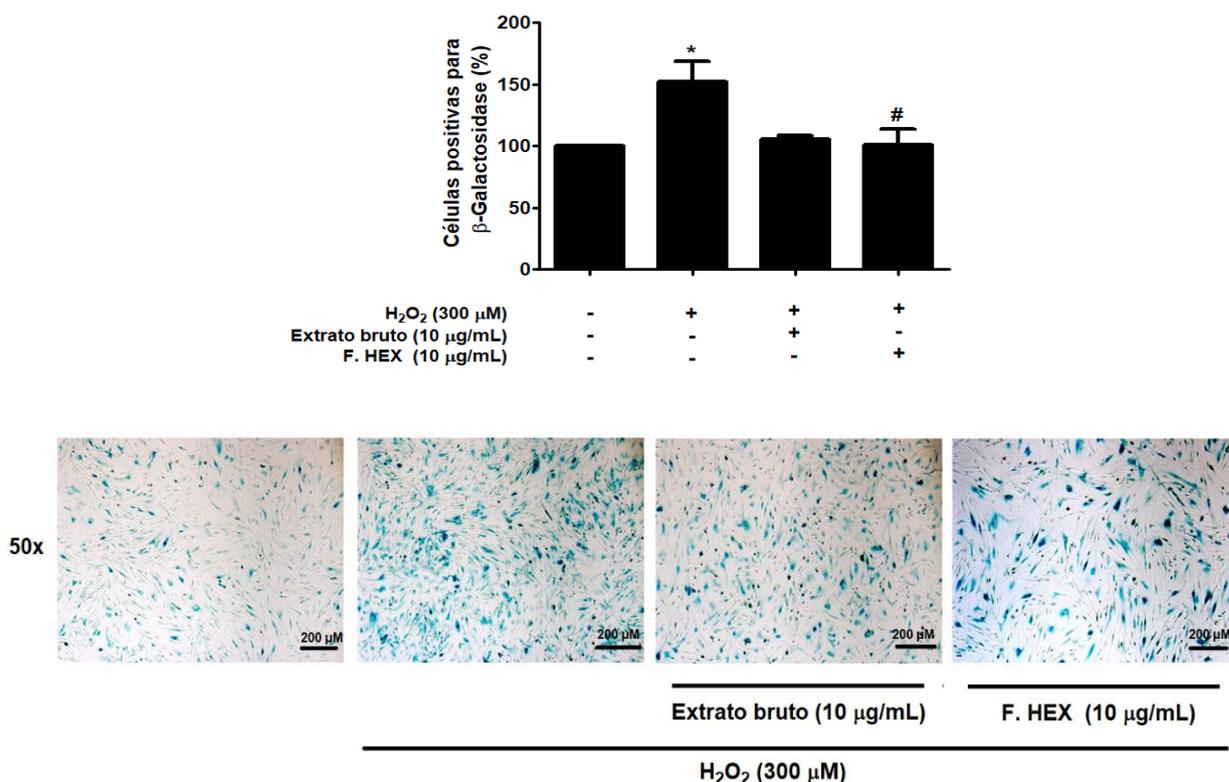


Figura 28. Avaliação da senescência celular associada à atividade da enzima β -galactosidase.

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 4.18 e as células foram fixadas e expostas ao X-GAL para visualização da senescência celular por meio da quantificação da coloração azul associada à atividade da enzima β -galactosidase. Os dados 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. (*, $p < 0,05$ vs células não-tratadas; #, $p < 0,05$ vs células tratadas com 300 μ M de H_2O_2).

5.15. Síntese dos resultados

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o extrato bruto e suas frações são capazes de modular a atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante, com aumento da atividade da SOD nas células tratadas com a F.EtOAc, F.HEX e F.DCM, e aumento da atividade da CAT nas células tratadas com F.HA, F.HEX e F.DCM. Contudo, somente nas células tratadas com o extrato bruto houve diminuição da concentração intracelular de EROs, e não houve alteração dos níveis de glutathiona reduzida e de produtos da peroxidação lipídica para nenhum dos tratamentos testados.

Foi observado que a F.HEX e a F.DCM ativam parcialmente o PPAR α , e somente a F.HEX ativa parcialmente o PPAR γ .

Nos ensaios de avaliação da expressão gênica, a expressão gênica de diversos genes foi comparada em células submetidas ao estresse oxidativo e tratadas com a F.HEX e com o Ext. Bruto em relação às células submetidas ao estresse oxidativo e não-tratadas.

Na avaliação da expressão gênica de genes relacionados à homeostase da matriz extracelular dérmica, foi observado que o tratamento com a F.HEX e com o Ext. bruto promoveu diminuição da expressão gênica da *MMP-1* e não alterou a expressão dos demais genes estudados (*MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1*, *COLIA1* e *TGF- β 1*). E o ensaio de quantificação da produção de colágeno mostrou que ambos os tratamentos não alteraram a quantidade produzida desta proteína.

Na avaliação da expressão gênica de genes relacionados à via de sinalização das MAPK, foi observado que o tratamento com o extrato bruto promoveu aumento na expressão gênica da *MAPK1*, *p38* e *JUN*, e diminuiu a expressão gênica da *MKP7*. E o tratamento com a F.HEX e com o Ext.bruto não alterou a expressão gênica do *ERK*, *JNK* e *FOS*.

Em relação à expressão gênica de genes relacionados à inflamação, observou-se que nas células tratadas com a F.HEX e com o Ext.Bruto houve diminuição da expressão gênica da *IL1A* e da *IL6*, e aumento da expressão de *TNF α* nas células tratadas com o Ext. Bruto. Ambos os tratamentos não alteraram a expressão do *NF κ B*.

Não houve alteração da expressão gênica do *NFE2L2*, importante fator de transcrição envolvido na transcrição de componentes do sistema de defesa antioxidante celular.

Na avaliação da atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência celular, verificou-se que o tratamento com a F.HEX foi capaz de diminuir o número de células coradas pela atividade desta enzima, atenuando o fenótipo senescente das células tratadas com esta fração.

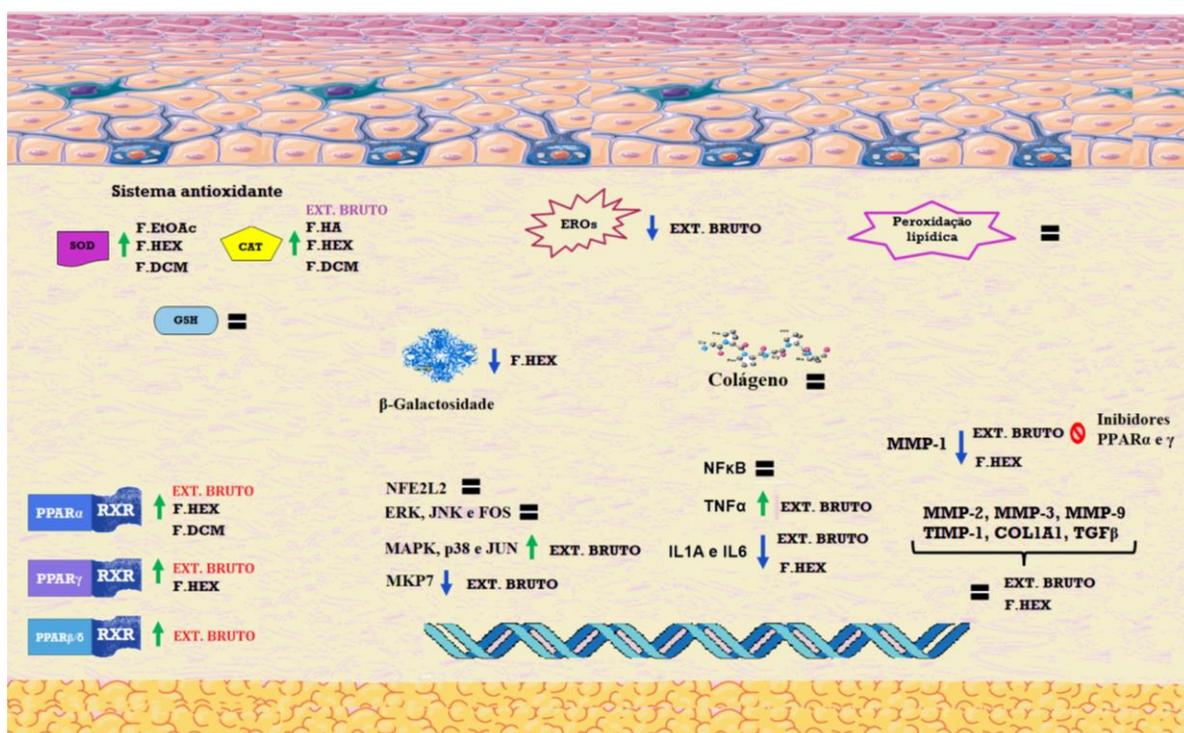


Figura 29. Síntese dos resultados

Ilustração dos resultados obtidos nos ensaios realizados neste trabalho e dos resultados obtidos com o extrato bruto em trabalhos anteriores do mesmo grupo de estudo. Resultado em roxo: Araújo, 2015; Resultados em vermelho: Mesquita, 2016.

6. DISCUSSÃO

A pele é o órgão que provê a proteção primária para o organismo contra danos causados por fatores externos e é essencial para a manutenção da homeostase do organismo de forma geral. Durante o envelhecimento, as células que constituem a pele tornam-se senescentes e a matriz extracelular dérmica é progressivamente danificada o que altera a organização e a capacidade de reparo da pele. Diversos mecanismos estão envolvidos no envelhecimento cutâneo, sendo um deles, o estresse oxidativo que desempenha papel importante nas modificações da pele envelhecida (Finkel e Holbrook, 2000; Rittié e Fisher, 2002; Bonté et al., 2019).

Uma abordagem que tem sido explorada para prevenir ou retardar o envelhecimento cutâneo é a utilização de produtos naturais, que historicamente já vêm sendo amplamente utilizados para o tratamento de diversas patologias (Koehn e Carter, 2005; Newmann e Cragg, 2016). Uma das possíveis fontes de obtenção de produtos naturais são os fungos endofíticos que são capazes de produzir diversidade ampla de metabólitos secundários que apresentam diferentes atividades biológicas (Strobel e Daisy, 2003; Gunatilaka, 2006; Gutierrez et al., 2012).

Neste sentido, foi explorado neste trabalho a capacidade do fungo endofítico BvFII produzir metabólitos secundários capazes de atuar em aspectos que são importantes para o envelhecimento cutâneo. O primeiro passo deste estudo foi realizar a quantificação de polifenóis e flavonoides nas frações do extrato, considerando que estes compostos são conhecidos por apresentarem atividade antioxidante que pode ser explorada no tratamento de desordens cutâneas (Chiang et al., 2012; Petruk et al., 2017).

Foi verificado que o teor de polifenóis foi diferente entre as frações do extrato (Tabela 2), porém para todas elas a quantidade de polifenóis encontrada foi maior que a encontrada no extrato metanólico do fruto da planta *Euterpe oleracea Martius* ($1,92 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato) que é capaz de proteger fibroblastos da derme humana contra os efeitos deletérios promovidos por sua exposição à radiação UV por diminuir a concentração intracelular de EROs e aumentar os níveis de glutathione (Petruk et al., 2017). Quando comparado com o teor de polifenóis encontrado no extrato etanólico

da raiz da planta *Angelica acutiloba* (28,6 µg/mg de extrato), que promoveu aumento da síntese de colágeno do tipo I e diminuição da expressão de MMPs (Park et al., 2017), o teor de polifenóis da F. HA foi maior que o da referida planta. A presença de compostos polifenólicos nas frações do extrato indicam que elas podem atuar em variáveis importantes para o processo de envelhecimento cutâneo.

Tendo sido demonstrado que as frações do extrato apresentam compostos polifenólicos em sua composição, o próximo passo foi avaliar a atividade antioxidante das frações do extrato e os resultados obtidos mostraram que as frações diferem quanto à sua capacidade antioxidante. A maior atividade antioxidante foi encontrada para a F.EtOAc que foi a que apresentou o maior teor de flavonoides. A fração DCM apresentou atividade antioxidante maior que a fração HA, mesmo tendo apresentado menor teor de polifenóis e flavonoides que essa fração, o que sugere que a presença de outros compostos com atividade antioxidante deve ser investigada na fração DCM. A menor atividade antioxidante foi encontrada para a fração hexânica, que também foi a que apresentou menor teor de polifenóis totais.

A atividade antioxidante das frações F.EtOAc, F.HA e F.DCM foi maior que a apresentada pelo extrato da planta *Michelia alba* (IC₅₀: > 1000 µg/mL) que possui ação protetora em células expostas ao UVB, sendo capaz de diminuir a expressão de MMPs e aumentar a produção de colágeno (Chiang et al., 2012). Em relação ao extrato bruto, os resultados foram obtidos em trabalho anterior (Araújo, 2015) e este também apresentou quantidade significativa de compostos polifenólicos e apresentou atividade antioxidante maior que a apresentada por todas as frações obtidas (IC₅₀: 288,6 µg/mL).

Com o intuito de investigar o efeito do tratamento com o extrato bruto ou com suas frações em parâmetros importantes para o envelhecimento cutâneo foi utilizada cultura de fibroblastos dérmicos humanos, por estes serem o principal tipo de célula presente na derme e serem responsáveis por produzir os principais componentes da MEC (Tracy et al., 2014; Quan e Fisher, 2015). Algumas das alterações apresentadas na pele envelhecida refletem o comprometimento da função destas células e correspondente remodelamento anormal da MEC dérmica e, por isso, os fibroblastos

são amplamente utilizados como modelo celular para o estudo do envelhecimento cutâneo (Tigges et al., 2014).

A investigação dos efeitos do tratamento com as frações do extrato sobre a viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos mostrou que não houve estímulo da proliferação destas células, mas houve diminuição de sua atividade metabólica (Figura 7). Contudo, para todas as concentrações utilizadas, a viabilidade celular permaneceu acima de 80%, fato pelo qual o tratamento com as frações foi considerado não-citotóxico.

Um dos parâmetros de atividade das frações que foi avaliado foi a sua função em relação à modulação da atividade dos PPAR, pois estes receptores estão relacionados a diversos fatores importantes para o envelhecimento cutâneo, tendo sido demonstrado que a ativação de suas três isoformas está associada à regulação da expressão de componentes da MEC e de genes envolvidos com processos de resposta ao estresse oxidativo (Kwok et al., 2012; Ham et al., 2013; Briganti et al., 2014; Jeon et al., 2015; Shin et al., 2016). Considerando que em trabalho anterior foi demonstrado que o extrato bruto do fungo *Phomopsis* sp. é capaz de ativar as três isoformas do PPAR (Mesquita, 2016), foi levantada a hipótese de que as frações deste extrato também apresentariam esta atividade.

Como demonstrado no ensaio do gene repórter, somente a fração hexânica e a fração diclorometano ativaram o PPAR α promovendo uma ativação correspondente a 66,4% e 70,8% da atividade de luciferase obtida pelo tratamento das células com o bezafibrato, respectivamente (Figura 9). Contudo, os efeitos observados não ocorreram de forma dose dependente. Estes resultados sugerem a presença de moléculas nestas frações que atuam como agonistas parciais deste receptor. Essa ação agonista de PPAR α apresentada por estas frações do extrato estimula a avaliação quanto a sua ação protetora em modelos de envelhecimento cutâneo devido ao fato da ativação do PPAR α já ter sido implicada na diminuição da ativação do AP-1 e do NF- κ B, fatores que regulam a expressão de MMPs, sendo que esta diminuição ocorre devido a um mecanismo de transrepressão, em que o PPAR α se liga, via interação proteína-proteína, com a c-Jun ou com a subunidade p65 do NF- κ B

(Delerive et al., 1999), impedindo a ligação destes fatores aos seus elementos responsivos.

Além disso, já foi demonstrado que a utilização de agonista do PPAR α protege fibroblastos dérmicos humanos dos danos induzidos pela radiação UV, de modo que sua utilização é capaz de promover diminuição da concentração de EROs intracelular, diminuir a expressão da MMP-1 e aumentar a expressão do pró-colágeno do tipo I (Shin et al., 2016). Em outro estudo realizado em ratos que apresentavam mutação no DNA mitocondrial, modelo animal de envelhecimento, foi mostrado que o tratamento desses animais por 8 meses com o bezafibrato foi capaz de retardar o surgimento de algumas características do envelhecimento, como a perda de pêlos, e promoveu melhora no fenótipo da pele desses animais (Dillon et al., 2012).

O PPAR β/δ também é importante em vias que modulam o remodelamento da MEC dérmica no processo de envelhecimento cutâneo. A ativação do PPAR β/δ é capaz de promover a diminuição da fosforilação de sinalizadores da via da MAPK e, por consequência, diminuir a expressão de MMP-1 e de MMP-2, diminuir a concentração intracelular de EROs e aumentar a síntese de colágeno do tipo I e do tipo III e da elastina (Kwok et al., 2012; Ham et al., 2013; Ham et al., 2014). Contudo, diferente dos resultados obtidos para o extrato bruto (Mesquita, 2016), o tratamento com as frações não promoveu alterações na ativação desta isoforma do PPAR (Figura 10).

A ativação do PPAR γ tem sido associada à restauração da atividade de enzimas do sistema antioxidante de fibroblastos expostos ao UV e à diminuição da expressão de MMP-1 e, por isso, este receptor tem sido visto como potencial alvo terapêutico para tratar os danos foto-oxidativos da pele (Briganti et al., 2014). Os resultados do ensaio de gene repórter obtido para as diferentes frações mostraram que a fração EtOAc, a fração HA e a fração DCM não apresentam atividade no PPAR γ , ao passo que, em células tratadas com a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ da fração hexânica a atividade da luciferase correspondeu a 40,87% da atividade apresentada nas células tratadas com a rosiglitazona, agonista total do PPAR γ (Figura 11).

Dessa forma, o tratamento com a fração DCM foi capaz de modular a atividade do PPAR α e a fração hexânica apresentou agonismo parcial duplo para as isoformas PPAR α e PPAR γ . Esta atividade é interessante, pois já foi demonstrado que compostos que apresentam atividade em ambos os receptores apresentam capacidade de prevenir o envelhecimento dérmico por meio da estimulação da proliferação de fibroblastos e aumento da expressão do colágeno do tipo I (Jeon et al., 2016).

Outro aspecto avaliado foi a capacidade do tratamento com as frações modular a atividade de enzimas e alterar a concentração de moléculas pertencentes ao sistema de defesa antioxidante celular em células expostas ao estresse oxidativo, considerando que a diminuição da capacidade de defesa antioxidante associada ao envelhecimento tem sido amplamente relatada na literatura. Estudos indicam que com o aumento da idade os níveis de EROs aumentam devido à redução da capacidade antioxidante da pele, representada pela diminuição da atividade de enzimas como a CAT e a SOD e depleção dos níveis de glutathiona na derme e epiderme (Kohen e Gati, 2000; Tigges et al., 2014).

Já foi demonstrado que a deficiência de SOD2 está relacionada ao surgimento de disfunção mitocondrial e senescência celular nas células da epiderme, sendo que a deficiência desta enzima provoca o aparecimento precoce do fenótipo do envelhecimento na pele de camundongos (Velarde et al., 2012). Em relação à CAT já foi demonstrado que a atividade desta enzima é menor na pele envelhecida (Shin et al., 2005), e que o aumento da expressão dessa enzima é capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos e diminuir a incidência de patologias relacionadas ao envelhecimento como cardiopatias e a catarata (Schriner et al., 2005).

O modelo de indução do estresse oxidativo pelo tratamento das células com 300 μ M de H₂O₂ utilizado no presente estudo provocou tendência de aumento nos níveis de produtos da peroxidação lipídica (Figura 15), aumento da concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio (Figura 16) e diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT (Figuras 12 e 13), o que condiz com resultados que mostram que o acúmulo intracelular de EROs provoca a inativação da maior parte das enzimas

antioxidantes, como a CAT, glutathiona peroxidase e SOD (Shin et al., 2006; Kim et al., 2017).

O tratamento das células HFF expostas ao estresse oxidativo com as frações EtOAc, HEX e DCM promoveu aumento da atividade da SOD e o tratamento com as frações HEX, HA, DCM promoveu aumento na atividade da enzima CAT, porém não foi identificada diminuição dos níveis de EROs intracelulares nas células tratadas com as diferentes frações, tendo ocorrido somente tendência de diminuição na concentração intracelular de EROs nas células tratadas com a F.HEX e tendência de diminuição da peroxidação lipídica nas células tratadas com a F.EtOAc, F.HA e F.DCM.

Em relação ao tratamento com o extrato bruto, foi demonstrado em trabalho anterior que este é capaz de promover aumento na atividade da CAT (Araújo, 2015) e no presente estudo foi demonstrado que o tratamento com o extrato bruto promove diminuição dos níveis intracelulares de EROs, mas não é capaz de diminuir a formação de produtos da peroxidação lipídica. Quanto aos níveis de glutathiona reduzida não houve alterações de seus níveis tanto nos fibroblastos expostos ao estresse oxidativo quanto nos tratados com o extrato bruto ou com suas frações (Figura 14).

O sistema de defesa antioxidante da pele é regulado por uma rede intimamente interligada, e tem se tornado claro que os antioxidantes interagem de forma complexa, assim mudanças no estado redox ou na concentração de um componente pode afetar diversos outros componentes do sistema (Finkel e Holbrook, 2000; Bickers e Athar, 2006). Apesar das frações terem sido capazes de modular de forma positiva a atividade de enzimas do sistema antioxidante, esta ação parece não ser mediada pela modulação da transcrição gênica do Nrf2, uma vez que tanto o tratamento com a fração hexânica quanto com o extrato bruto não alteraram a expressão deste fator de transcrição (Figura 25).

Considerando que a fração hexânica apresentou atividade agonista parcial do PPAR α e PPAR γ e aumentou a atividade da SOD e CAT, e que o extrato bruto apresentou atividade agonista dos PPAR α , β/δ , e γ (Mesquita, 2016), aumentou a atividade da CAT (Araújo, 2015) e diminuiu os níveis de EROs intracelular, estes

tratamentos foram escolhidos para avaliação de sua influência na expressão gênica de genes relacionados à manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica, à via de sinalização MAPK, à via pró-inflamatória e das três isoformas do PPAR.

Como a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica compreende a coordenação entre a produção e a degradação de seus diversos componentes, neste trabalho foi avaliado o efeito exercido pela exposição das células HFF ao peróxido de hidrogênio e de seu tratamento com a fração hexânica ou com o extrato bruto na expressão gênica dos principais genes relacionados à produção e degradação de compostos da MEC dérmica.

Já tem sido bem demonstrado que as EROs modulam o equilíbrio entre a degradação e a produção de colágeno, que é o maior componente da derme e cuja expressão é dependente da via de sinalização do TGF- β (Quan et al., 2002; Luo et al., 2016). O tratamento das células HFF com o peróxido de hidrogênio produziu aumento na expressão do TGF- β 1 (Figura 17), que é uma citocina multifuncional que desempenha papel importante na regulação do crescimento celular, diferenciação e biossíntese do tecido conectivo extracelular, além disso, estimula a proliferação de fibroblastos na derme para melhorar a síntese de colágeno (Quan et al., 2002, Iizuka et al., 2017).

A expressão do TGF- β 1 pode ser aumentada pelo estresse oxidativo em vários tecidos, incluindo as glândulas mamárias (Barcellos-Hoff, 1993) e células mesangiais humanas (Cruz et al., 2001). Luo e colaboradores (2016) mostraram que em fibroblastos da pele de camundongos o tratamento com peróxido induziu aumento na expressão do TGF- β e conseqüente aumento na expressão dos colágenos do tipo I e III. Quan e colaboradores também demonstraram que na pele exposta ao UVB há aumento progressivo na expressão do TGF- β 1 por até 72h após a exposição à radiação (Quan et al., 2002).

Apesar de aumentar a expressão do TGF- β 1, o tratamento com peróxido diminuiu a expressão gênica do COL1A1 (Figura 17) e produziu tendência de diminuição na quantidade de colágeno nas culturas de fibroblastos (Figura 27), demonstrando que a indução do estresse oxidativo foi capaz de induzir uma das

principais características observada no processo de envelhecimento cutâneo. Contudo, outros estudos são necessários para avaliar se o resultado obtido para a diminuição na expressão gênica e na produção de colágeno nas células submetidas ao estresse oxidativo está relacionado com a diminuição da expressão e atividade do receptor II do TGF- β e com a via de sinalização das SMADS, que são outros pontos que regulam a produção celular de colágeno (Bicker e Athar, 2006).

Na análise de expressão gênica o tratamento com peróxido aumentou a expressão de MMP-1 (Figura 17). O aumento da expressão deste gene 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. A alteração no estado de equilíbrio do H₂O₂ aumenta a sinalização de quinases que modificam componentes de iniciação do complexo de transcrição da MMP-1 levando a uma alta produção desta enzima (Nelson et al., 2006; Briganti et al., 2008; Bartling et al., 2014). Além de modificar a expressão da MMP-1, a exposição dos fibroblastos ao peróxido de hidrogênio também provocou aumento na expressão gênica da MMP-3, diminuição da expressão gênica da MMP-2 e TIMP-1 e não alterou a expressão da MMP-9 (Figura 17).

Desta forma, a indução do estresse oxidativo foi capaz de induzir alterações no perfil de expressão gênica dos fibroblastos dérmicos humanos que são importantes para o envelhecimento cutâneo, por ter aumentado a expressão gênica de metaloproteinases, diminuído a expressão do inibidor tecidual da MMP-1 e diminuído a expressão gênica do COL1A1.

Considerando que o aumento da expressão de MMP-1 e a diminuição da expressão de COL1A1 estão relacionados com a ação de espécies reativas do oxigênio sobre a propagação da transdução de sinal da via de sinalização das proteínas quinases e suas fosfatases inibitórias correspondentes e na produção de mediadores pró-inflamatórios (Bartling et al., 2014; Du et al., 2016), foram avaliados neste trabalho a influência do tratamento com o peróxido de hidrogênio na expressão de genes pertencentes a estas vias.

O tratamento com peróxido de hidrogênio promoveu diminuição da expressão gênica de *ERK* e *FOS* e não alterou a expressão gênica de *JNK*, *JUN*, *MAPK1* e de

p38 (Figura 23). Desta forma, o aumento da expressão da MMP-1 e a diminuição da expressão gênica do COL1A1 mediada pelo tratamento das células HFF com peróxido de hidrogênio parece não ocorrer por meio da modulação da expressão gênica dos principais mediadores envolvidos na via de sinalização MAPK. Porém, é necessário avaliar futuramente se na expressão em nível pós-traducional houve aumento da forma fosforilada desses componentes, pois o tratamento com peróxido de hidrogênio diminuiu a expressão da *MKP7* (Figura 25), uma fosfatase que regula negativamente da via de sinalização da MAPK (Ham et al, 2013). É possível que apesar da ausência de aumento na expressão gênica dos componentes da via MAPK tenha havido uma maior ativação desses mediadores por meio da diminuição de sua desfosforilação por ação da *MKP7*.

O tratamento com peróxido diminuiu a expressão do *NFκB* e *IL6* e produziu tendência de aumento na expressão da *IL1A* e não alterou a expressão do *TNFα* (Figura 21). Apesar da ativação do NFκB ser regulada pelo estado redox, sua ativação direta pelo H₂O₂ não ocorre em todos os tipos celulares, já tendo sido demonstrado que o H₂O₂ é capaz de suprimir a ativação do NFκB em neutrófilos murinos e em astrócitos (Zmijewski et al., 2007; Choi et al., 2007, Oliveira-Marques et al., 2009).

Os resultados obtidos para a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória em células HFF expostas ao tratamento com peróxido de hidrogênio indicam que não houve a indução de um estado pró-inflamatório nessas células. Desta forma, não foi possível estabelecer associação entre a modulação da expressão de genes da via de sinalização da MAPK e da expressão de genes pró-inflamatórios com o aumento observado na expressão gênica de MMP-1 e MMP-3 e diminuição da expressão do COL1A1 observado nas células expostas ao estresse oxidativo.

Na análise da expressão gênica dos genes relacionados à manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica, foi identificado que nas células HFF tratadas com o extrato bruto houve diminuição da expressão de *MMP-1* e tendência de aumento na expressão de *MMP-2*, *MMP-3*, *TIMP-1*, *COL1A1* e na produção de colágeno, e não houve alteração da expressão do *TGF-β1*, e o tratamento com a fração hexânica diminuiu a expressão de *MMP-1*, produziu tendência de diminuição

da expressão de *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1* e *TGF-β1*, e tendência de aumento na expressão do *COL1A1* e na produção de colágeno (Figura 18).

Desta forma, tanto o extrato bruto quanto a fração hexânica apresentaram efeitos similares na expressão gênica da *MMP-1* e do *COL1A1*, e devido ao fato de ambos os tratamentos terem apresentado atividade agonista parcial nas diferentes isoformas do PPAR, foi investigado se esta ativação é importante para os efeitos observados na expressão gênica destes genes.

Estudos demonstram que a ativação das três isoformas do PPAR é capaz de promover a diminuição da expressão da *MMP-1* e aumentar a expressão de *COL1A1*. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os dados da literatura ao mostrar que os agonistas das três isoformas do PPAR diminuíram a expressão de *MMP-1* e aumentaram a expressão gênica do *COL1A1*. Já o tratamento com os antagonistas das três isoformas do PPAR produziu tendência de diminuição na expressão de *MMP-1* e os antagonistas do PPAR β/δ e PPAR γ diminuíram a expressão do *COL1A1*. O tratamento conjunto dos agonistas com antagonistas das três isoformas do PPAR foi capaz de reverter os efeitos produzidos pelos agonistas das três isoformas do PPAR indicando a eficácia do antagonismo destes receptores (Figuras 19 e 20).

Na presença do inibidor do PPAR α e do PPAR γ houve reversão da diminuição da expressão de *MMP-1* promovida pelo tratamento com o extrato bruto e o tratamento das células HFF com o extrato bruto na presença dos antagonistas das três isoformas não promoveu alterações significativas na expressão do *COL1A1*. A presença dos antagonistas das três isoformas do PPAR não interferiu nos efeitos mediados pelo tratamento com a fração hexânica na expressão de *MMP-1* e do *COL1A1*. Estes resultados sugerem que a ativação do PPAR α e do PPAR γ é importante para a atividade do extrato bruto sobre a expressão gênica da *MMP-1*. Além de atuar na ativação das três isoformas do PPAR o extrato bruto também promoveu aumento da expressão gênica do PPAR α e do PPAR β/δ , reforçando que o extrato bruto é capaz de modular tanto a atividade quanto a expressão gênica dos PPARs.

O extrato bruto não alterou a expressão de *ERK* e *JNK*, e promoveu aumento na expressão de *p38*, de *JUN* e *MAPK1* e tendência de aumento no *FOS* (Figura 24).

Desta forma, a diminuição na expressão de *MMP-1* observada não pode ser atribuída à regulação da expressão de genes da via de sinalização da MAPK, pois com o aumento observado na expressão de *p38*, de *JUN* e *MAPK1* o esperado seria que houvesse aumento concomitante da expressão da *MMP-1*. Estudos das proteínas da via da MAPK e de sua fosforilação devem ser realizados para melhor elucidação dos efeitos do extrato bruto nesta via.

A fração hexânica não alterou de forma significativa nenhum dos componentes da via da MAPK (Figura 24), assim também não foi possível estabelecer relação entre alterações na expressão de mediadores da via de sinalização MAPK e a diminuição da expressão de *MMP-1* promovida pela fração hexânica.

Na avaliação da expressão de genes pró-inflamatórios, foi mostrado que o tratamento com o extrato bruto diminuiu a expressão da *IL1A* e da *IL6*, produziu tendência de diminuição da expressão do *NFκB* e aumentou a expressão do *TNFα*. O tratamento com a fração hexânica não alterou a expressão de *NFκB* e de *TNFα*, e diminuiu a expressão da *IL1A* e da *IL6* (Figura 22). Estes resultados indicam que tanto o extrato bruto quanto a fração hexânica podem apresentar atividade anti-inflamatória por diminuir a expressão da *IL1A* e da *IL6* que são citocinas que estimulam a expressão de *MMP-1* (Du et al., 2016; Inoue et al., 2017).

Por fim, foi avaliada a capacidade do tratamento com peróxido de hidrogênio induzir o fenótipo de senescência celular nas células HFF. A senescência celular induzida por estresse é caracterizada pela alteração do estado redox da célula que induz a expressão de marcadores do envelhecimento, mudanças morfológicas e aumento na coloração associada à atividade da β-galactosidase, representando assim uma ferramenta útil na análise do envelhecimento induzido pelo estresse oxidativo (de Magalhães et al., 2018).

O ensaio de avaliação da coloração associada à atividade da β-galactosidase mostrou que os fibroblastos utilizados no experimento já se encontravam no estado de senescência, porém quando essas células foram expostas ao peróxido de hidrogênio houve exacerbação do fenótipo de senescência celular, e o tratamento com a fração hexânica diminuiu a coloração associada à senescência e o extrato bruto produziu somente tendência de diminuição (Figura 28).

A compilação dos resultados obtidos neste trabalho sugerem que tanto a fração hexânica quanto o extrato bruto podem ser explorados na prevenção do envelhecimento cutâneo precoce, porém os resultados obtidos na investigação da atuação dos extratos nas principais vias de sinalização envolvidas na modulação da produção de componentes importantes da matriz extracelular dérmica foram inconclusivos, indicando que são necessários mais estudos para melhor compreensão dos mecanismos de proteção promovido por esses metabólitos secundários.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que as frações do extrato bruto são ricas em compostos polifenólicos, porém o processo de fracionamento provocou diminuição da atividade antioxidante das frações quando comparado com a atividade antioxidante apresentada pelo extrato bruto (Araújo, 2015). A fração diclorometano do extrato foi capaz de modular a ativação do PPAR α e a fração hexânica foi capaz de ativar parcialmente duas isoformas do PPAR, α e γ , porém esta fração não foi capaz de promover alterações significativas na expressão gênica das três isoformas do PPAR, ao passo que o extrato bruto além de ativar as três isoformas do PPAR (Mesquita, 2016), também aumentou a expressão gênica do PPAR α e do β/δ .

Além disso, foi demonstrado que as frações acetato de etila, diclorometano e hexânica são capazes de modular positivamente a atividade da enzima SOD, e as frações diclorometano, hidroalcoólica e hexânica modulam positivamente a atividade da enzima CAT, e o extrato bruto, além de aumentar a atividade da CAT (Araújo, 2015), foi capaz de diminuir a concentração intracelular de EROs. Tanto a fração hexânica quanto o extrato bruto diminuíram a expressão gênica da MMP-1, sendo que a ativação dos PPAR α e γ foi importante para mediar essa ação no caso do tratamento com o extrato bruto. Por fim, somente a fração hexânica foi capaz de promover diminuição significativa no fenótipo associado a senescência celular.

Desta forma, os resultados deste trabalho sugerem que tanto a fração hexânica quanto o extrato bruto podem atuar em aspectos importantes para prevenir ou retardar o processo de envelhecimento cutâneo e podem ser explorados como potenciais compostos ativos contra o envelhecimento precoce da pele. Contudo, novos estudos são necessários para elucidar se as atividades sobre a expressão gênica encontradas nesse trabalho também ocorrem em nível proteico. Além disso, é necessário avaliar se o tratamento com esses metabólitos secundários provoca alterações no padrão de fosforilação dos mediadores da via de sinalização MAPK.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelin, E. *et al.* Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA. **Phytochemistry**, England, v. 72, n. 18, p. 2406-2412, Sept. 2011. ISSN: 1873-3700.

Aebi, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, United States, v. 105, p. 121-126, Feb. 1984. ISSN: 1557-7988.

Agati, G. *et al.* Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 72, p. 35-45, Nov. 2013. ISSN: 1873-2690.

Alge-Priglinger, C. S. *et al.* Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, United States, v. 50, n. 11, p. 5495-5503, Nov. 2009. ISSN: 1552-5783.

Altabas, V.; Berković, M. C.; Zjačić-Rotkvić, V. Glitazones and skin aging: May they stop the ticking clock? **Medical Hypotheses**, United States, v. 71, n. 3, p. 459-460, Sept. 2008. ISSN: 1532-2777.

Araújo, L. M. **Avaliação da expressão gênica de colágeno, metaloprotease e inibidor de metaloprotease em fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos.** 2015. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Bailey, A. J.; Paul, R. G.; Knott, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of Ageing and Development**, Ireland, v. 106, n. 1-2, p. 1-56, Dec. 1998. ISSN: 1872-6216.

Bartling, T. R. *et al.* Redox-sensitive gene-regulatory events controlling aberrant matrix metalloproteinase-1 expression. **Free Radical Biology and Medicine**, United States, v. 74, p. 99-107, Sept. 2014. ISSN: 1873-4596.

Baumann, L. Skin ageing and its treatment. **The Journal of Pathology**, England, v. 211, n. 2, p. 241-251, Feb. 2007. ISSN: 1096-9896.

Berger, J.; Moller, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**, United States, v. 53, n. 1, p. 409-435, Feb. 2002. ISSN: 1545-326X.

Bickers, D. R.; Athar, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 126, n. 12, p. 2565-2575, Dec. 2006. ISSN: 1523-1747.

Birben, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, United States, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan. 2012. ISSN: 1939-4551.

Bonté, F. *et al.* Skin Changes During Ageing. In: Harris, J. R.; Korolchuk, V. I. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science*. 1 ed. **Subcellular Biochemistry**, United States, v.91, p.249-280, 2019. ISSN: 0306-0225.

Brand, R. M. *et al.* A Topical Mitochondria-Targeted Redox-Cycling Nitroxide Mitigates Oxidative Stress-Induced Skin Damage. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 137, n. 3, p. 576-586, Mar. 2017. ISSN: 1523-1747.

Brenneisen, P., *et al.* Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. **Free Radical Biology and Medicine**, United States, v. 22, n. 3, p. 515-524, 1997. ISSN: 1873-4596.

Briganti, S., *et al.* Modulation of PPAR γ provides new insights in a stress induced premature senescence model. **PLoS One**, United States, v. 9, n.8, p. e104045, Aug. 2014. ISSN: 1932-6203.

Briganti, S.; Picardo, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, England, v. 17, n. 6, p. 663-669, Nov. 2003. ISSN: 1468-3083.

Briganti, S. *et al.* Small molecular antioxidants effectively protect from PUVA-induced oxidative stress responses underlying fibroblast senescence and photoaging. **Free Radical Biology and Medicine**, United States, v. 45, n. 5, p. 636-644, Sept. 2008. ISSN: 1873-4596.

Brink, T. C. *et al.* Age-related transcriptional changes in gene expression in different organs of mice support the metabolic stability theory of aging. **Biogerontology**, Netherlands, v. 10, n. 5, p. 549-564, Oct. 2009. ISSN: 1573-6728

Burn, S. F. Detection of β -galactosidase activity: X-gal staining. **Methods in Molecular Biology**, United States, v. 886, p. 241-250, Feb. 2012. ISSN: 1940-6029.

Calabrese, V. *et al.* Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. **Neurochemical Research**, United States, v. 33, n. 12, p. 2444-2471, Dec. 2008. ISSN: 1573-6903.

Calleja-Agius, J.; Brincat, M.; Borg, M. Skin connective tissue and ageing. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Netherlands, v. 27, n. 5, p. 727-740, Oct. 2013. ISSN: 1532-1932.

Cavinato, M.; Jansen-Dürr, P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. **Experimental Gerontology**, England, v. 94, p. 78-82, Aug. 2017. ISSN: 1873-6815.

Chang, C. C. *et al.* Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, China, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002. ISSN: 1021-9498.

Chang, T. M. *et al.* Extract from *Periostracum cicadae* Inhibits Oxidative Stress and Inflammation Induced by Ultraviolet B Irradiation on HaCaT Keratinocytes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, United States, v. 2017, p. 8325049, Mar. 2017. ISSN:1741-4288.

Chen, Q.; Ames, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 91, n. 10, p. 4130-4134. May 1994. ISSN: 1091-6490.

Chen, J. H.; Ozanne, S. E.; Hales, C. N. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. **Methods in Molecular Biology**, United States, v. 371, p. 179-189, 2007. ISSN: 1940-6029.

Chiang, H. M. *et al.* *Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. **Food and Chemical Toxicology**, England, v. 50, n. 12, p. 4260-4269, Dec. 2012. ISSN: 1873-6351.

Choi, J. J. *et al.* Hydrogen peroxide induces the death of astrocytes through the down-regulation of the constitutive nuclear factor-kappaB activity. **Free Radical Research**, England, v. 41, n. 5, p. 555-562, May 2007. ISSN: 1029-2470.

Choung, B. *et al.* Extracellular superoxide dismutase tissue distribution and the patterns of superoxide dismutase mRNA expression following ultraviolet irradiation on mouse skin. **Experimental Dermatology**, Denmark, v. 13, n. 11, p. 691-699, Nov. 2004, **13**(11):691-699. ISSN: 1600-0625.

Dalby, B. *et al.* Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. **Methods**, United States, v. 33, n. 2, p. 95-103, June 2004. ISSN: 1095-9130.

De Jager, T. L.; Cockrell, A. E.; Du Plessis, S. S. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, United States, v. 996, p. 15-23, 2017. ISSN: 2214-8019.

De Lima, C. L. **Análise dos efeitos de agonistas dos PPAR γ E PPAR β/δ sobre aspectos celulares e moleculares relacionados com a resposta inflamatória e com reparo em células da polpa dentária humana.** 2017. 129f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2017.

De Magalhães, J. P. How ageing processes influence cancer. **Nature Reviews Cancer**, England, v. 13, n. 5, p. 357-365, May 2013. ISSN: 1474-1768.

De Magalhães, J. P.; Passos, J. F. Stress, cell senescence and organismal ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, Ireland, v. 170, p. 2-9, Mar. 2018. ISSN: 1872-6216.

De Souza, A. P. B. **Influência da L-arginina na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos dérmicos humanos**. 2016. 89 f. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Delerive, P. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 274, n. 45, p. 32048-32054, Nov. 1999. ISSN: 1067-8816.

Dhale, D. A. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Bauhinia variegata* Linn. **Journal of Ecobiotechnology**, India, v. 3, n. 9, p. 4-7, Oct. 2011. ISSN: 2077-0464.

Dillon, L. M. *et al.* Long-term bezafibrate treatment improves skin and spleen phenotypes of the mtDNA mutator mouse. **PLoS One**, United States, v. 7, n. 9, p. e44335, Sept. 2012. ISSN: 1932-6203.

Du, G. *et al.* Induction of matrix metalloproteinase-1 by tumor necrosis factor- α is mediated by interleukin-6 in cultured fibroblasts of keratoconus. **Experimental Biology and Medicine**, England, v. 241, n. 18, p. 2033-2041, Dec. 2016. ISSN: 1535-3699.

El-Domyati, M. *et al.* Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. **Experimental Dermatology**, Denmark, v. 11, n. 5, p. 398-405, Oct. 2002. ISSN: 1600-0625.

Elewa, R. M.; Abdallah, M. A.; Zouboulis, C. C. Age-associated skin changes in innate immunity markers reflect a complex interaction between aging mechanisms in the sebaceous gland. **The Journal of Dermatology**, England, v. 42, n. 5, p. 467-476, May 2015. ISSN: 1346-8138.

El-Jamal, N. *et al.* In vivo imaging reveals selective PPAR activity in the skin of peroxisome proliferator-activated receptor responsive element-luciferase reporter mice. **Experimental Dermatology**, Denmark, v. 22, n. 2, p. 137-140, Feb. 2013. ISSN: 1600-0625.

Enns, G. M.; Cowan, T. M. Glutathione as a Redox Biomarker in Mitochondrial Disease—Implications for Therapy. **Journal of Clinical Medicine**, Switzerland, v. 6, n. 5, p. e50, May 2017. ISSN: 2077-0383.

Farage, M. *et al.* Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, England, v. 30, n. 2, p. 87-95, Apr. 2008. ISSN: 1468-2494.

F'guyer, S.; Afaq, F.; Mukhtar, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, England, v. 19, n. 2, p. 56-72, Apr. 2003. ISSN: 1600-0781.

Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, England, v. 408, n. 6809, p. 239-247, Nov. 2000. ISSN: 1476-4687.

Fisher, G. J. *et al.* Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**, United States, v. 138, n. 11, p. 1462-1470, Nov. 2002. ISSN: 1538-3652.

Fisher, G. J. *et al.* Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. **The American Journal of Pathology**, United States, v. 174, n. 1, p. 101-114, Jan. 2009. ISSN: 1525:2191.

Fisher, G. J. *et al.* Reduction of fibroblast size/mechanical force down-regulates TGF- β type II receptor: implications for human skin aging. **Aging Cell**, England, v. 15, n. 1, p. 67-76, Feb.2016. ISSN: 1474-9726.

Fisher, G. J.; Varani, J.; Voorhees, J. J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. **Archives of Dermatology**, United States, v. 144, n. 5, p. 666-672, May 2008. ISSN: 1538-3652.

Furue, M. *et al.* Antioxidants for Healthy Skin: The Emerging Role of Aryl Hydrocarbon Receptors and Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor-2. **Nutrients**, Switzerland, v. 9, n. 3, p. e223, Mar. 2017. ISSN: 2072-6643.

Gaschler, M. M.; Stockwell, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, United States, v. 482, n. 3, p. 419-425, Jan. 2017. ISSN: 1090-2104.

Gaur, M.; Dobke, M.; Lunyak, V. V. Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue in Clinical Applications for Dermatological Indications and Skin Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 18, n. 1, p. e208, Jan. 2017. ISSN: 1422-0067.

Gęgotek, A. *et al.* Time-dependent effect of rutin on skin fibroblasts membrane disruption following UV radiation. **Redox Biology**, Netherlands, v. 12, p. 733-744, Aug. 2017. ISSN: 2213:2317.

Gilchrest, B. A review of skin ageing and its medical therapy. **British Journal of Dermatology**, England, v. 135, n. 6, p. 867-875, Dec. 1996. ISSN: 1365-2133.

Gilchrest, B. A. Photoaging. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 133, n. E1, p. E2-E6, Jul. 2013. ISSN: 1523-1747.

Godic, A. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, United States, v. 2014, p. 860479, Mar. 2014. ISSN: 1942-0994.

Grabacka, M. *et al.* PPAR γ regulates MITF and β -catenin expression and promotes a differentiated phenotype in mouse melanoma S91. **Pigment Cell & Melanoma Research**, England, v. 21, n. 3, p. 388-396, Jun. 2008. ISSN: 1755-148X.

Gunatilaka, A. L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products**, United States, v. 69, n. 3, p. 509-526, Mar. 2006. ISSN: 1520-6025.

Gupta, A. *et al.* Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: novel targets in photocarcinoma therapy. **Ageing Research Reviews**, England, v. 13, p. 65-74, Jan. 2014. ISSN: 1872-9649.

Gutierrez, R. P. M.; Gonzalez, A. M. N.; Ramirez, A. M. Compounds derived from endophytes: a review of phytochemistry and pharmacology. **Current Medicinal Chemistry**, United Arab Emirates, v. 19, n. 18, p. 2992-3030, Apr. 2012. ISSN: 1875-533X.

Ham, S. A. *et al.* PPAR δ inhibits UVB-induced secretion of MMP-1 through MKP-7-mediated suppression of JNK signaling. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 133, n. 11, p. 2593-2600, Nov. 2013. ISSN: 1523-1747.

Ham, S. A. *et al.* PPAR δ promotes wound healing by up-regulating TGF- β 1-dependent or-independent expression of extracellular matrix proteins. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, England, v. 14, n. 6b, p. 1747-1759, Jun. 2010. ISSN: 1582-4934.

Ham, S. A. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor δ modulates MMP-2 secretion and elastin expression in human dermal fibroblasts exposed to ultraviolet B radiation. **Journal of Dermatological Science**, Netherlands, v. 76, n. 1, p. 44-50, Oct. 2014. ISSN: 1973-569X.

He, T.; Quan, T.; Fisher, G. J. Ultraviolet irradiation represses TGF- β type II receptor transcription through a 38 base pair sequence in the proximal promoter in human skin fibroblasts. **Experimental Dermatology**, Denmark, v. 23, n. 01, p. 2-6, Oct. 2014. ISSN: 1600-0625.

Hissin, P. J.; Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, United States, v. 74, n. 1, p. 214-226, July 1976. ISSN: 1096-0309.

Hu, W. *et al.* Protective effect of the methanolic extract from *Duchesnea indica* against oxidative stress in vitro and in vivo. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Netherlands, v. 31, n. 1, p. 42-50, Jan. 2011. ISSN: 1872-7077.

Huang, Q. *et al.* Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Kadsura angustifolia*. **Research in Microbiology**, France, v. 166, n. 1, p. 45-55, Jan. 2015. ISSN: 1769-7123.

Inoue, A. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-1 and alpha-smooth muscle actin expression by interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor alpha in hepatic stellate cells. **Cytotechnology**, United States, v. 69, n. 3, p. 461-468, Jun. 2017. ISSN: 1573-0778.

lizuka, D. *et al.* Hydrogen peroxide enhances TGF β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition in human mammary epithelial MCF-10A cells. **Anticancer Research**, Greece, v. 37, n. 3, p. 987-995, Mar. 2017. ISSN: 1791-7530.

International Organization for Standardization. **ISO 10993-5:2009(E)**: Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Switzerland, 2009.

Jackson, M. *et al.* Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. I. Production, taxonomy of the producing organism and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, Japan, v. 46, n. 1, p. 34-38, Jan. 1993. ISSN: 0021-8820.

Jeon, H. *et al.* A Mixture of Extracts of *Kochia scoparia* and *Rosa multiflora* with PPAR α/γ Dual Agonistic Effects Prevents Photoaging in Hairless Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 17, n. 11, p. e1919, Nov. 2016. ISSN: 1422-0067.

Jeon, Y. *et al.* Abietic acid inhibits UVB-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblast cells through PPAR α/γ dual activation. **Experimental Dermatology**, Denmark, v. 24, n. 2, p. 140-145, Feb. 2015. ISSN: 1600-0625.

Kalyanaraman, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, United States, v. 52, n. 1, p. 1-6, Jan. 2012. ISSN: 1873-4596.

Kammeyer, A.; Luiten, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, England, v. 21, p. 16-29 May 2015. ISSN: 1872-9649.

Kanaki, T.; Makrantonaki, E.; Zouboulis, C. C. Biomarkers of skin aging. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, Germany, v. 17, n. 3, p. 433-442, Sept. 2016. ISSN: 1573:2606.

Kilgore, K. S.; Billin, A. N. PPAR β/δ ligands as modulators of the inflammatory response. **Current Opinion in Investigational Drugs**, England, v. 9, n. 5, p. 463-469, May 2008. ISSN: 2040-3429.

Kim, K.; Park, H.; Lim, K. Phototoxicity: Its mechanism and animal alternative test methods. **Toxicological Research**, Korea (South), v. 31, n. 2, p. 97-104, June 2015. ISSN: 2234-2753.

Kim, J. *et al.* Protective Effects of Standardized *Siegesbeckia glabrescens* Extract and Its Active Compound Kirenol Against UVB-induced Photoaging through Inhibition of MAPK/NF- κ B Pathways. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Korea (South), v. 27, n. 2, p. 242-250, Feb. 2017. ISSN: 1738-8872.

Kirkman, H. N.; Gaetani, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in Biochemical Sciences**, England, v. 32, n. 1, p. 44-50, Jan. 2007. ISSN: 0968-0004.

Koehn, F. E.; Carter, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, England, v. 4, n. 3, p. 206-220, Mar. 2005. ISSN: 1474-1784.

Kohen, R.; Gati, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, Ireland, v. 148, n. 2-3, p. 149-157, Aug. 2000. ISSN: 1879-3185.

Krtolica, A. *et al.* Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 98, n. 21, p. 12072-12077, Oct. 2001. ISSN: 1091-6490.

Kuenzli, S.; Saurat, J. H. Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. **British Journal of Dermatology**, England, v. 149, n. 2, p. 229-236, Aug. 2003. ISSN: 1365-2133.

Kumar, A. *et al.* Evaluation of antioxidant potential of alcoholic stem bark extracts of *Bauhinia variegata* Linn. **Journal of Applied and Natural Science**, Mar 2019, 11(1):235-239. ISSN: 2231-5209.

Kwok, H. H. *et al.* Ginsenoside Rb 1 induces type I collagen expression through peroxisome proliferator-activated receptor-delta. **Biochemical Pharmacology**, England, v. 84, n. 4, p. 532-539, Aug. 2012.

Kwon, M. J. *et al.* Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. **Journal of Dermatological Science**, Netherlands, v. 67, n. 2, p. 81-87, Aug. 2012. ISSN: 1873-569X.

Lei, X. G. *et al.* Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. **Physiological Reviews**, United States, v. 96, n. 1, p. 307-364, Jan. 2016. ISSN: 1522-1210.

Lephart, E. D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. **Ageing Research Reviews**, England, v. 31, p. 36-54, Feb. 2016. ISSN: 1872-9649.

Lima, E. S.; Abdalla, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Brazil, v. 37, n. 3, p. 293-303, Sept./Dec. 2001. ISSN: 1516-9332.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods: A Companion to Methods in Enzymology**, United States, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001. ISSN: 1095-9130.

Lowry, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951. ISSN: 1083-351X.

Lu, J. *et al.* Tiron Inhibits UVB-Induced AP-1 Binding Sites Transcriptional Activation on MMP-1 and MMP-3 Promoters by MAPK Signaling Pathway in Human Dermal Fibroblasts. **PLoS ONE**, United States, v. 11, n. 8, p. e0159998, Aug. 2016. ISSN: 1932:6203.

Luo, J. *et al.* Activation of TGF- β 1 by AQP3-mediated H₂O₂ transport into fibroblasts of a bleomycin-induced mouse model of scleroderma. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 136, n. 12, p. 2372-2379, Dec. 2016. ISSN: 1523-1747.

Makrantonaki, E. *et al.* Identification of Biomarkers of Human Skin Ageing in Both Genders. Wnt Signalling - A Label of Skin Ageing? **PLoS ONE**, United States, v. 7, n. 11, p. e50393, Nov. 2012. ISSN: 1932:6203.

Mancini, M. *et al.* MicroRNAs in human skin ageing. **Ageing Research Reviews**, England, v. 17, p. 9-15, Sept. 2014. ISSN: 1872-9649.

Martini, A. G. **GQ-16, agonista parcial de PPAR γ , diminui proliferação de células mesangiais humanas.** 2012. 61f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

Martinez, R.M. *et al.* Trans-chalcone added in topical formulation inhibits skin inflammation and oxidative stress in a model of ultraviolet B radiation skin damage in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Switzerland, v. 171, p. 139-146, June 2017. ISSN: 1873-2682.

Masaki, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. **Journal of Dermatological Science**, Netherlands, v. 58, n. 2, p. 85-90, May 2010. ISSN: 1873-569X.

McCarty, M. F.; Barroso-Aranda, J.; Contreras, F. The “rejuvenatory” impact of lipoic acid on mitochondrial function in aging rats may reflect induction and activation of PPAR- γ coactivator-1 α . **Medical Hypotheses**, United States, v. 72, n. 1, p. 29-33, Jan. 2009. ISSN: 1532-2777.

Menon, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Netherlands, v. 54, n. Suppl 1, p. S3-S17, Nov. 2002. ISSN: 1872-8294.

Mesquita, P. G. **Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata*: busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes.** 2011. 102 f. (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

Mesquita, P. G. **Avaliação de atividade antioxidante e atividade agonista em receptores nucleares PPAR α , β/δ , γ de metabólitos de fungos endofíticos isolados de folhas da *Bauhinia variegata*.** 2015. 82 f. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Michalik, L.; Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Netherlands, v. 1771, n. 8, p. 991-998, Aug. 2007. ISSN: 1878-2434.

Mine, S. *et al.* Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. **PLoS One**, United States, v. 3, n. 12, p. e4066, Dec. 2008. ISSN: 1932-6203.

Mohsin, S.; Akhtar, N. Formulation and stability evaluation of *Bauhinia variegata* extract topical emulsion. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, Poland, v. 74, n. 3, p. 945-954, May 2017. ISSN: 0001-6837.

Montagner, A.; Wahli, W.; Tan, N. S. Nuclear receptor peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) β/δ in skin wound healing and cancer. **European Journal of Dermatology**, France, v. 25, n. Suppl 1, n. 4-11, Apr. 2015. ISSN: 1952-4013.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983. ISSN: 1872-7905.

Murakami, K. *et al.* Skin atrophy in cytoplasmic SOD-deficient mice and its complete recovery using a vitamin C derivative. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, United States, v. 382, n. 2, p. 457-461, May 2009. ISSN: 1090-2104.

Natarajan, V. T. *et al.* Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature Chemical Biology**, United States, v. 10, n. 7, p. 542-551, July 2014. ISSN: 1552-4469.

Nelson, K. K. *et al.* Elevated Sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression. **Clinical Cancer Research**, United States, v. 9, n. 1, p. 424-432, Jan. 2003. ISSN: 1078-0432.

Nelson, K. K. *et al.* Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 281, n. 20, p. 14100-14110, May 2006. ISSN: 1083-351X.

Newman, D. J.; Gragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, United States, v. 79, n. 3, p. 629-661, Mar. 2016. ISSN: 1520-6025.

Oeckinghaus, A.; Hayden, M. S.; Ghosh, S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature Immunology**, United States, v. 12, n. 8, p. 695-708, July 2011. ISSN: 1529-2916.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, United States, v. 95, n. 2, p. 351-358, June 1979. ISSN: 1096-0309.

Oliveira-Marques, V. *et al.* Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. **Antioxidant and Redox Signaling**, United States, v. 11, n. 9, p. 2223-2243, Sept. 2009. ISSN: 1557-7716.

Park, J. E. *et al.* The protective effect of Kaempferia parviflora extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, England, v. 30, n. 5, p. 237-245, Oct. 2014. ISSN: 1600-0781.

Park, M. A.; Sim, M. J.; Kim, Y. C. Anti-Photoaging Effects of Angelica acutiloba Root Ethanol Extract in Human Dermal Fibroblasts. **Toxicological Research**, Korea (South), v. 33, n. 2, p. 125-134, Apr. 2017. ISSN: 2234-2753.

Park, M. H. *et al.* The Novel PPAR α/γ Dual Agonist MHY 966 Modulates UVB-Induced Skin Inflammation by Inhibiting NF- κ B Activity. **PLoS One**, United States, v. 8, n. 10, p. e76820, Oct. 2013. ISSN: 1932-6203.

Pereira, C. B. *et al.* Endophytic fungal compounds active against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. **The Journal of Antibiotics**, Japan, v. 68, n. 7, p. 436-444, July 2015. ISSN: 0021-8820.

Pérez-Jiménez, J. *et al.* Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. **European Journal of Clinical Nutrition**, England, v. 64, n. Suppl. 3, p. S112-S120, Nov. 2010. ISSN: 1476-5640.

Petrini, O. Fungal endophytes of tree leaves. *In: Andrews, J. H.; Hirano, S. S.; editors. Microbial Ecology of Leaves. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience*, New York, p. 179-197, 1991. ISBN: 978-1-4612-3168-4.

Petruk, G. *et al.* Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in normal immortalized fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Switzerland, v. 172, p. 42-51, July 2017. ISSN: 1873-2682.

Pittayapruerk, P. *et al.* Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 17, n. 6, p. e868, June 2016. ISSN: 1422-0067.

Pizzorno, J. Glutathione! **Integrative Medicine**, United States, v. 13, n. 1, p. 8-12, Feb. 2014. ISSN 1945-7081.

Poljšak, B.; Dahmane, R. Free radicals and extrinsic skin aging. **Dermatology Research and Practice**, Egypt, 2012, v. 2012, p. 135206. ISSN: 1687-6113.

Premi, S. *et al.* Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Science**, United States, v. 347, n. 6224. P. 842-847, Feb. 2015. ISSN: 1095-9203.

Quan, T.; Fisher, G. J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review. **Gerontology**, Switzerland, v. 61, n. 5, p. 427-434, Feb. 2015. ISSN: 1423-0003.

Quan, T. *et al.* Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor β /Smad pathway in human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 119, n. 2, p. 499-506, Aug. 2002. ISSN: 1523-1747.

Quan, T. *et al.* Ultraviolet irradiation induces CYR61/CCN1, a mediator of collagen homeostasis, through activation of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 130, n. 6, p. 1697-1706, June 2010. ISSN: 1523-1747.

Rahimi, V. B.; Askari, V. R.; Mousavi, S. H. Ellagic acid reveals promising anti-aging effects against D-galactose-induced aging on human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y: A mechanistic study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, France, v. 108, p. 1712-1724, Dec. 2018. ISSN: 1950-6007.

Rai, P. *et al.* Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 106, n. 1, p. 169-174, Jan 2009. ISSN: 1091-6490.

Rando, T. A.; Chang, H. Y. Aging, Rejuvenation, and Epigenetic Reprogramming: Resetting the Aging Clock. **Cell**, United States, v. 148, n. 1-2, p. 46-57, Jan 2012. ISSN: 1097-4172.

Ratz-Lyko, A. *et al.* Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin. **Phytotherapy Research**, England, v. 29, n. 4, p. 509-517, Apr. 2015. ISSN: 1099-1573.

Rhie, G. *et al.* Aging-and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 117, n. 5, p. 1212-1217, Nov. 2001. ISSN: 1523-1747.

Rinnerthaler, M. *et al.* Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules**, Switzerland, v. 5, n. 2, p. 545-589, Apr. 2015. ISSN: 2218-273X.

Rittié, L.; Fisher, G. J. Natural and sun-induced aging of human skin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, United States, v. 5, n. 1, p. a015370, Jan. 2015. ISSN: 2157-1422.

Rogers, H. W. *et al.* Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer (keratinocyte carcinomas) in the US population, 2012. **JAMA Dermatology**, United States, v. 151, n. 10, p. 1081-1086, Oct. 2015. ISSN: 2168-6084.

Rukachaisirikul, V. *et al.* Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry**, England, v. 69, n. 3, p. 783-787, Feb. 2008. ISSN: 1873:3700.

Rünger, T. M. C→ T transition mutations are not solely UVB-signature mutations, because they are also generated by UVA. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 128, n. 9, p. 2138-2140, Sept. 2008. ISSN: 1523-1747.

Sbardella, D. *et al.* Human matrix metalloproteinases: an ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. **Molecular Aspects of Medicine**, England, v. 33, n. 2, p. 119-208, Apr. 2012. ISSN: 1872-9452.

Schriner, S. E. *et al.* Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. **Science**, United States, v. 308, n. 5730, p. 1909-1911, Jun. 2005. ISSN: 1095-9203.

Sertznig, P. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the human skin. **American Journal of Clinical Dermatology**, New Zeland, v. 9, n. 1, p. 15-31, 2008. ISSN: 1179-1888.

Shibuya, S. *et al.* Palladium and platinum nanoparticles attenuate aging-like skin atrophy via antioxidant activity in mice. **PLoS One**, United States, v. 9, n. 10, p. e109288, Oct. 2014. ISSN: 1932-6203.

Shin, M. H. *et al.* Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Improves Aged and UV-Irradiated Skin by Catalase Induction. **PLoS One**, United States, v. 11, n. 9, p. e0162628, Sept. 2016, ISSN: 1932-6203.

Shin, M. H. *et al.* H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin in vivo. **Journal of General Internal Medicine**, United States, v. 20, n. 5, p. 221-229, Aug. 2005. ISSN: 1523-1747.

Shindo, Y. *et al.* Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 102, n. 1, p. 122-124, Jan. 1994. ISSN: 1523-1747.

Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, Netherlands, v. 11, p. 613-619, Apr. 2017. ISSN: 2213-2317.

Singleton, V.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, United States, v. 16, n. 3, p. 144-158, Jan. 1965. ISSN: 0002-9254.

Soeur, J. *et al.* Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: from Nrf2 activation to GSH biosynthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, United States, v. 78, p. 213-223, Jan. 2015. ISSN: 1973-4596.

Soobrattee, M. A. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular**

Mechanisms of Mutagenesis, Netherlands, v. 579, n. 1, p. 200-213, Nov. 2005. ISSN: 1873-135X.

Sorrentino, J. A.; Sanoff, H. K.; Sharpless, N. E. Defining the toxicology of aging. **Trends in Molecular Medicine**, England, v. 20, n. 7, p. 375-384, July 2014. ISSN: 1471-499X.

Soto, M. L.; Falqué, E.; Domínguez, H. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. **Cosmetics**, Switzerland, v. 2, n. 3, p. 259-276, Aug, 2015. ISSN: 2079-9284.

Steward, W.; Brown, K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. **British Journal of Cancer**, England, v. 109, n. 1, p. 1-7, July 2013. ISSN: 1532-1827.

Strobel, G. A. Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons. **Natural Product Reports**, England, v. 31, n. 2, p. 259-272, Jan. 2014. ISSN: 1460-4752.

Sun, Z. *et al.* Thymus vulgaris alleviates UVB irradiation induced skin damage via inhibition of MAPK/AP-1 and activation of Nrf2-ARE antioxidant system. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, England, v. 21, n. 2, p. 336-348, Feb. 2017. ISSN: 1582-4934.

Tan, R. X.; Zou, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, England, v. 18, n. 4, p. 448-459, Aug. 2001. ISSN: 1460-4752.

Tigges, J. *et al.* The hallmarks of fibroblast ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, Ireland, v. 138, p. 26-44, Jun. 2014. ISSN: 1872-6216.

Tracy, L. E.; Minasian, R. A.; Catterson, E. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. **Advances in Wound Care**, United States, v. 5, n. 3, p. 119-136, Mar. 2016. ISSN: 2162-1934.

Uitto, J.; Bernstein, E. F. Molecular mechanisms of cutaneous aging: connective tissue alterations in the dermis. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v. 3, n. 1, p. 41-44, Aug. 1998. ISSN: 1529-1774.

Varani, J. *et al.* Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. **The American Journal of Pathology**, United States, v. 168, n. 6, p. 1861-1868, June 2006. ISSN: 1525-2191.

Velarde, M. C. *et al.* Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. **Ageing (Albany NY)**, United States, v. 4, n. 1, p. 3-12, Jan 2012. ISSN: 1945-4589.

Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. **Swiss Medical Weekly**, Switzerland, v. 132, n. 7-8, p. 83-91, Feb. 2002. ISSN: 1424-3997.

Weydert, C. J.; Cullen, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**, England, v. 5, n. 1, p. 51-66, Jan. 2010. ISSN: 1750-2799.

Yan, L. *et al.* Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Germany, v. 103, n.8, p. 3327-3340, Apr. 2019. ISSN: 1432-0614.

Yang, J. *et al.* Metabolites from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. (# zsu-H76). **European Journal of Organic Chemistry**, Germany, v. 2010, n. 19, p. 3692-3695, July 2010. ISSN: 1099-0690.

Yin, K.; Smith, A. G. Nuclear receptor function in skin health and disease: therapeutic opportunities in the orphan and adopted receptor classes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v. 73, n. 20, p. 3789-3800, Oct. 2016. ISSN: 1420-9071.

Yu, B. *et al.* An elastic second skin. **Nature Materials**, England, v. 15, n. 8, p. 911-918, Aug. 2016. ISSN: 1476-1122.

Zhang, S.; Duan, E. Fighting against skin aging: the way from bench to bedside. **Cell Transplantation**, United States, v. 27, n. 5, p. 729-738, May 2018. ISSN: 1555-3892.

Zhang, L. *et al.* Signal transduction, ageing and disease. **Subcellular Biochemistry**, United States, v. 91, p. 227-247, 2019. ISSN: 0306-0225.

Zmijewski, J. W. *et al.* Exposure to hydrogen peroxide diminishes NF-kappaB activation, IkappaB-alpha degradation, and proteasome activity in neutrophils. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, United States, v. 293, n. 1, p. C255-266, July 2007. ISSN: 1522-1563.

Zouboulis, C. C.; Makrantonaki, E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clinics in Dermatology**, United States, v. 29, n. 1, p. 3-14, Jan./Feb. 2011. ISSN: 1879-1131.

APÊNDICE A – INFORMAÇÕES SOBRE OS *PRIMERS* E SONDAS TAQMAN

Os *primers* utilizados neste estudo foram padronizados por meio de construção de curvas padrões para cada par de *primers*, partindo-se de uma amostra de RNA de 30 ng ou 20 ng que foram diluídas sucessivamente com fator de diluição de 5 vezes para obtenção das concentrações desejadas. Os resultados estão representados como as médias dos valores dos ciclos limiares (Ct) dos genes em função do log da concentração de RNA correspondente. A curva de dissociação dos *primers* (*Melt Curve*) foi construída com o intuito de demonstrar a especificidade de amplificação dos *primers*, sendo que a especificidade de amplificação é demonstrada pela presença de um único pico na curva de dissociação.

A inclinação angular da reta (*slope*), obtida por meio da equação de regressão linear, foi utilizada para calcular a eficiência dos *primers*, de acordo com a seguinte equação:

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

As eficiências de amplificação do gene alvo e de referência foram consideradas semelhantes quando variaram de 90% a 110%.

A validação dos *primers* *MMP-2*, *MMP-9* e *PPAR β/δ* foi previamente realizada por de Lima 2017, o *primer* da *β -actina* foi validado por Martini 2013, e o *primer* do *PPAR α* foi validado por Mariella Guimarães Lacerda.

COL1A1

COL1A1 (Forward) - 5' – CCCCAGAGGCTCTGAAGGTC – 3'

COL1A1 (Reverse) – 5' – GGAGCACCATTTGGCACCTTT – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 131 pares de bases

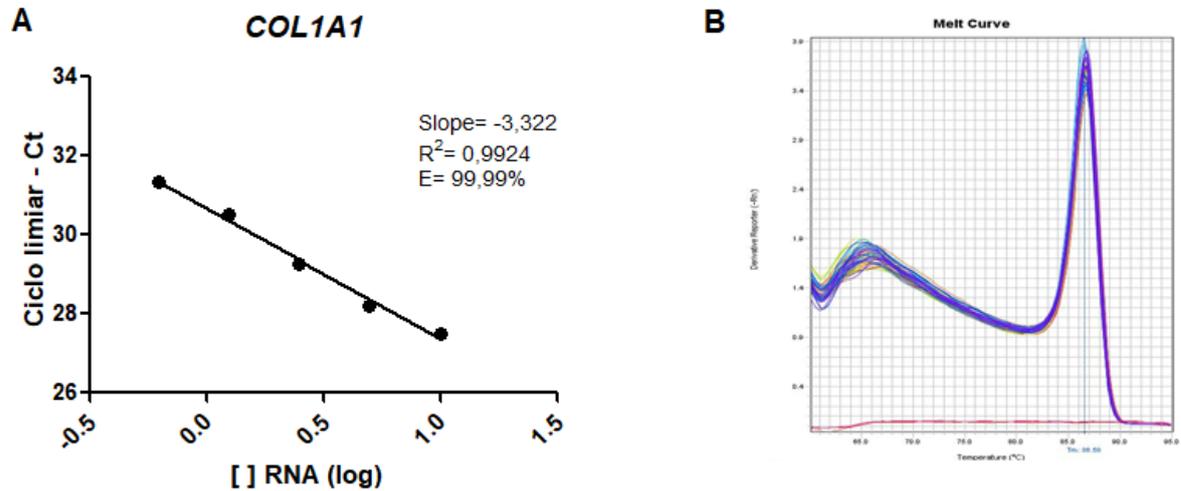


Figura 1. A) Curva de padronização do COL1A1; B) curva de dissociação do COL1A1.

FOS

FOS (Forward) – 5' – GATACACTCCAAGCGGAGACA – 3'

FOS (Reverse) – 5' – CAGGTTGGCAATCTCGGTCT – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 72 pares de bases

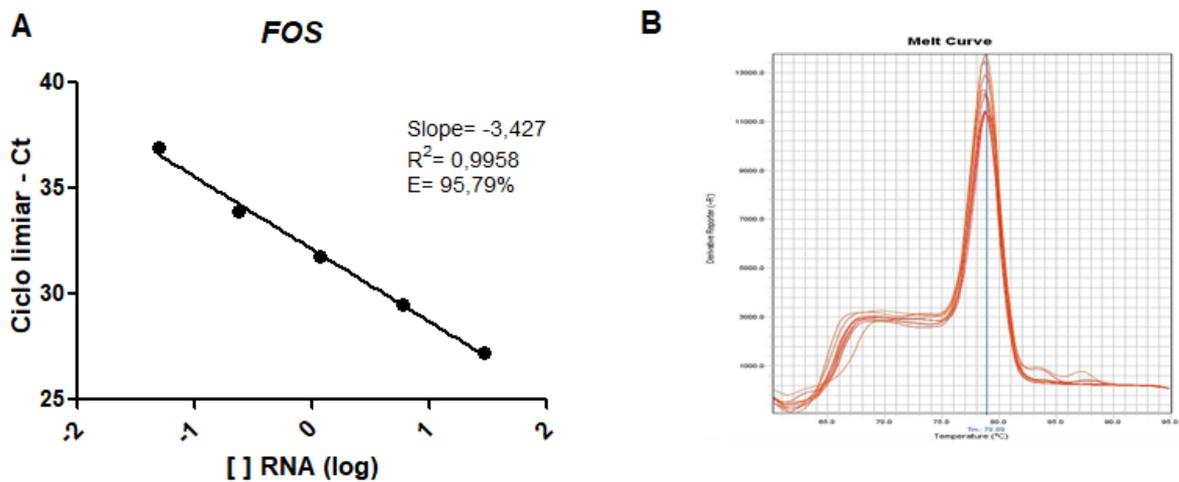


Figura 2. A) Curva de padronização do FOS; B) curva de dissociação do FOS.

JUN

JUN (Forward) – 5' – ACGGCGGTAAAGACCAGAAG – 3'

JUN (Reverse) – 5' – CTCGCCCAAGTTCAACAACC – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 94 pares de base

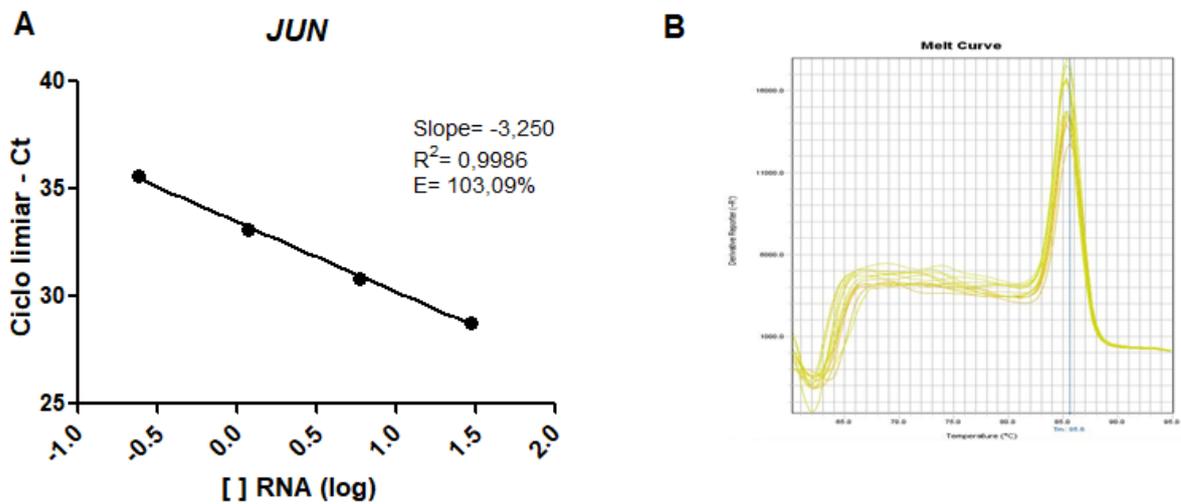


Figura 3. A) Curva de padronização do *JUN*; B) curva de dissociação do *JUN*.

MAPK1

C

MAPK1 (Reverse) – 5' – GGATAAGCCAAGACGGGCTG – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 107 pares de bases

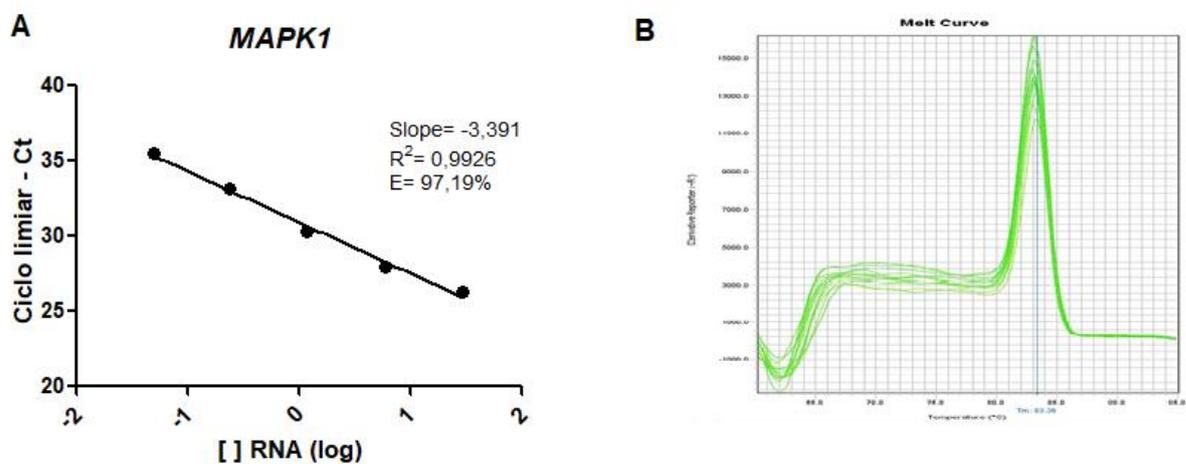


Figura 4. A) Curva de padronização do *MAPK1*; B) curva de dissociação do *MAPK1*.

MMP-1

MMP-1 (Forward) – 5' – GGGGTATCCGTGTAGCACAT – 3'

MMP-1 (Reverse) – 5' – CAGAGATGAAGTCCGTTTTC – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 76 pares de bases

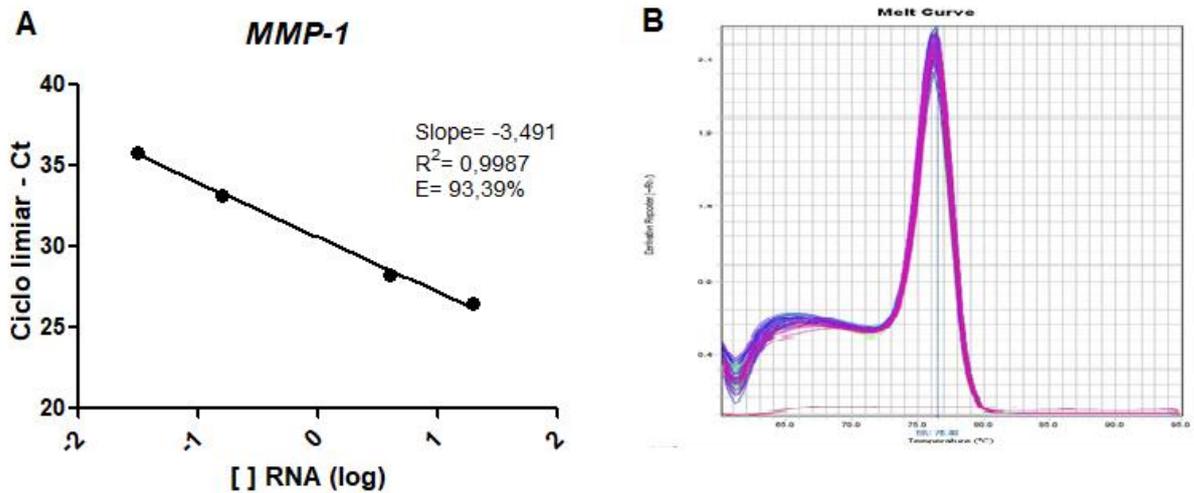


Figura 5. A) Curva de padronização do MMP-1; B) curva de dissociação do MMP-1.

MMP-3

MMP-3 (Forward) – 5' – TTCAGCTATTTGCTTGGGAA – 3'

MMP-3 (Reverse) – 5' – CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 91 pares de bases

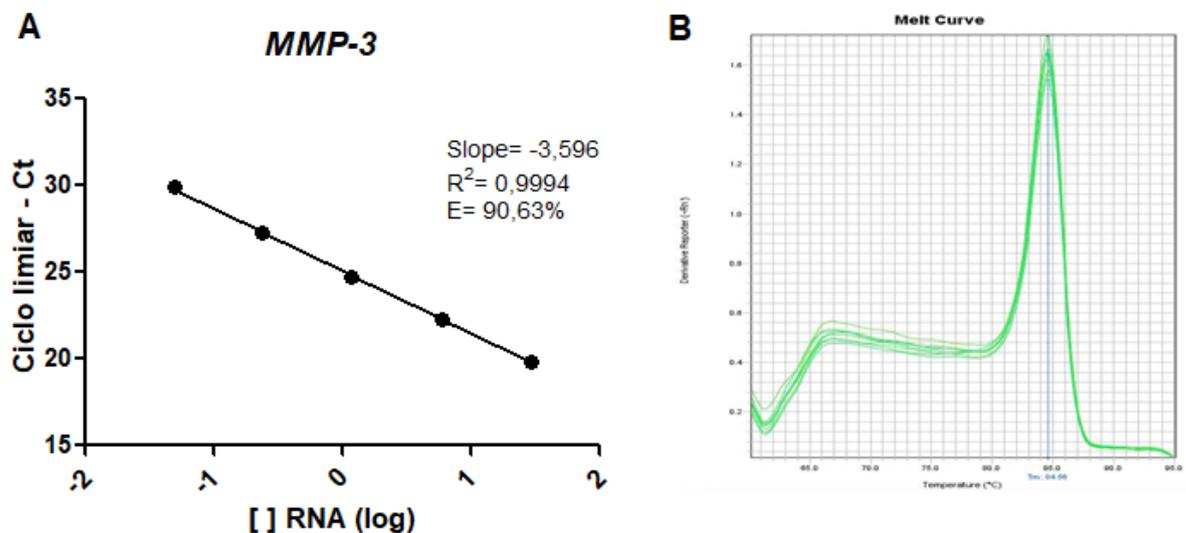


Figura 6. A) Curva de padronização do MMP-3; B) curva de dissociação do MMP-3.

NFE2L2

NFE2L2 (Foward) – 5' – AGGTTGCCACATTCCCAA – 3'

NFE2L2 (Reverse) – 5' – ACGTAGCCGAAGAAACCTCA – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 108 pares de bases

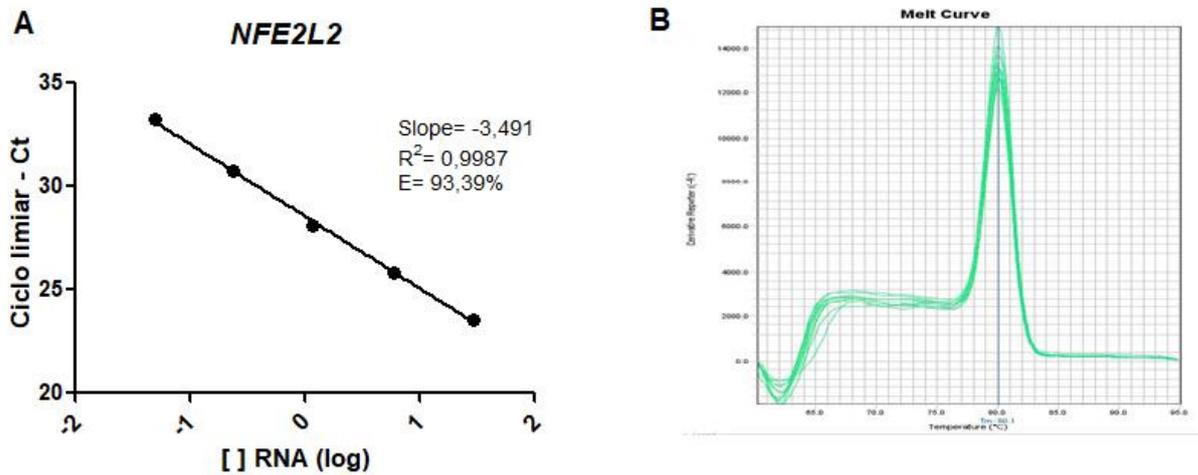


Figura 7. A) Curva de padronização do NFE2L2; B) curva de dissociação do NFE2L2.

TGF-β

TGF-β (Foward) – 5' – TTGAGGGCTTTGCGCTTAGC – 3'

TGF-β (Reverse) – 5' – GTAGTGAACCCGTTGATGTCC – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 82 pares de bases

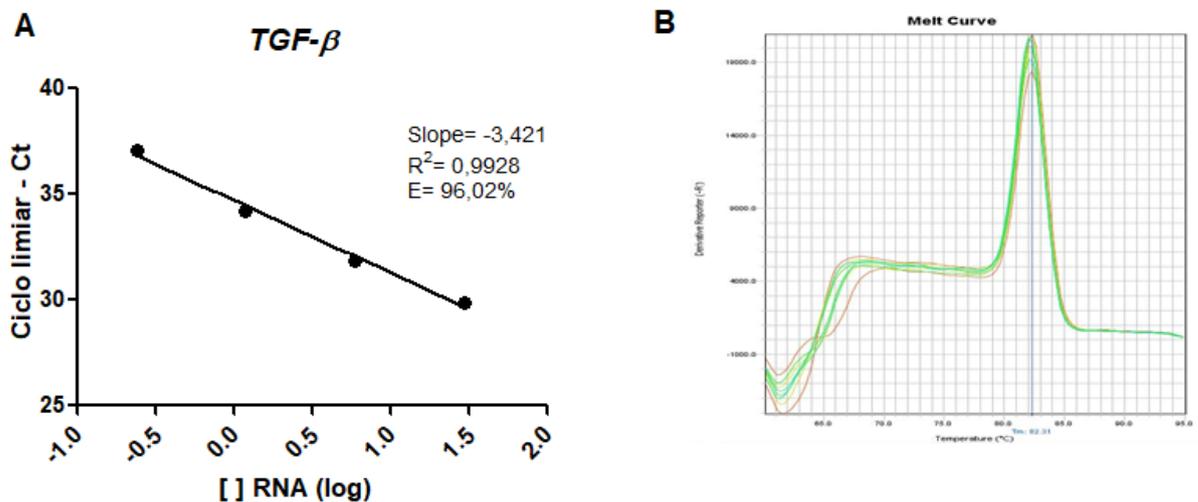


Figura 8. A) Curva de padronização do TGF-β; B) curva de dissociação do TGF-β.

TIMP-1

TIMP-1 (Forward) – 5' – GAATGCACAGTGTTCCTGTTT – 3'

TIMP-1 (Reverse) – 5' – GTCCGTCCACAAGCAATGAG – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 72 pares de base

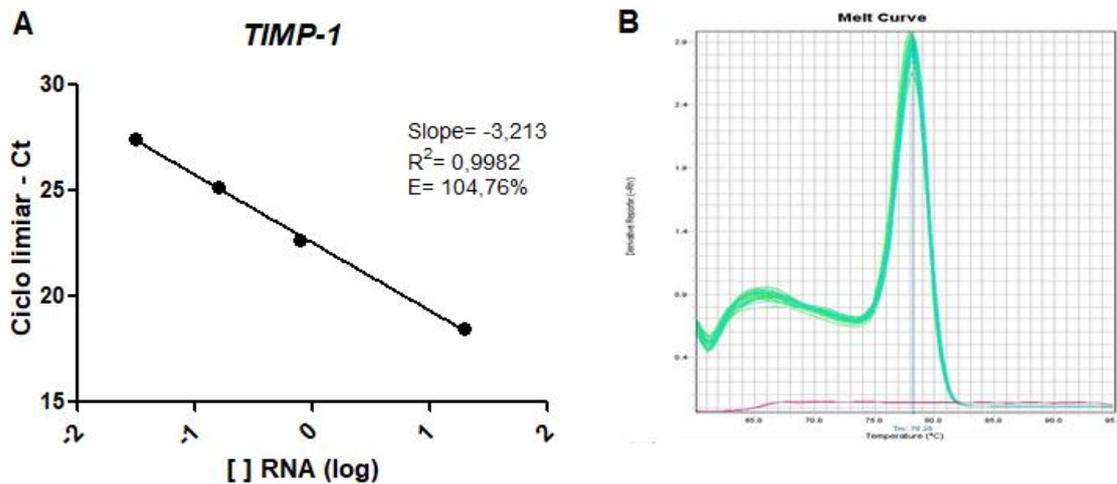


Figura 9. A) Curva de padronização do TIMP-1; B) curva de dissociação do TIMP-1.

PPAR γ

PPAR γ (Forward) – 5' – CTGTCAGCTAGCCAAGTAGCA – 3'

PPAR γ (Reverse) – 5' – GCCCGATGTAGAATTTGCTGG – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 263 pares de base

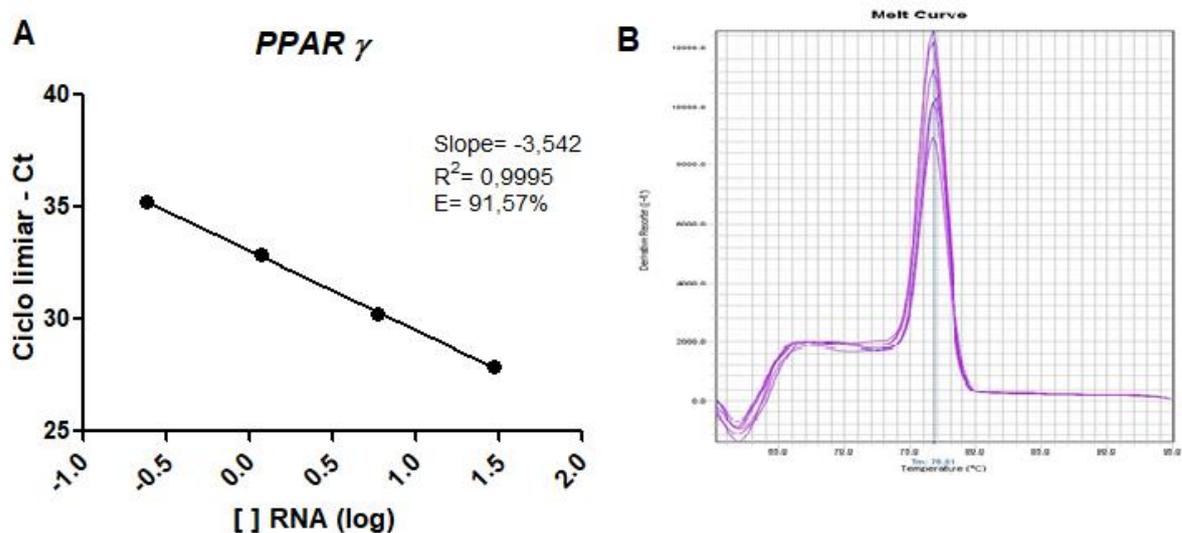


Figura 10. A) Curva de padronização do PPAR γ ; B) curva de dissociação do PPAR γ .

Tabela 1. Informações sobre os primers

Gene alvo	Sequência do primer (5'-3')	Tamanho do Produto de Amplificação	Eficiência dos primers
<i>β-actina (F)</i>	CGGCATCGTCACCAACTG	51 pb	97,48% (Martini, 2012)
<i>β-actina (R)</i>	AAGGTGTGGTGCCAGATTTTCT		
<i>MMP-2 (F)</i>	GCTACGATGGAGGCGCTAATG	169 pb	96,06% (de Lima, 2017)
<i>MMP-2 (R)</i>	TCAGGTATTGCACTGCCAACTC		
<i>MMP-9 (F)</i>	GAACCAATCTCACCGACAGG	67 pb	97,45% (de Lima, 2017)
<i>MMP-9 (R)</i>	GCCACCCGAGTGTAACCATA		
<i>PPARα (F)</i>	TTCGCAATCCATCGGCGAG	146 pb	103,00% (Primers padronizados pela aluna Mariella Guimarães)
<i>PPARα (R)</i>	CCACAGGATAAGTCACCGAGG		
<i>PPARβ/δ (F)</i>	ACTGAGTTCGCCAAGAGCATC	77 pb	94,62% (de Lima, 2017)
<i>PPARβ/δ (R)</i>	ACGCCATACTTGAGAAGGGTAA		

Legenda: F, *primer forward*; R, *primer reverse*; bp, pares de bases.

TABELA 2. Informações sobre as sondas TAQMAN

Gene	Código identificador
<i>IL-1A</i>	Hs00899844_m1
<i>IL-6</i>	Hs00985639_m1
<i>NF-κB</i>	Hs00765730_m1
<i>TNF-α</i>	Hs00174128_m1
<i>p38</i>	Hs01047704_m1
<i>ERK</i>	Hs00385075_m1
<i>JNK</i>	Hs01548508_m1
<i>MKP7</i>	Hs00411837_m1
<i>18S</i>	Hs99999901_s1