UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação fotoquimiopreventiva do extrato de maçã e da rutina em
modelos de pele *in vitro* e *in vivo***

Silvia de Siqueira

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação fotoquimiopreventiva do extrato de maçã e da rutina em
modelos de pele *in vitro* e *in vivo***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Doutoranda: Silvia de Siqueira

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências no dia 24/10/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, **DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Siqueira, Silvia

Avaliação fotoquimiopreventiva do extrato de maçã e da rutina em modelos de pele *in vitro* e *in vivo*.

179 p.: Il.; 30cm.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Fonseca, Maria José Vieira

1. Polifenóis da maçã 2. Otimização da extração 3. Cultura de fibroblastos humanos 4. Formulação tópica 5. Biópsia de pele humana 6. Pele humana reconstruída 7. Camundongo sem pelos 8. Radiação ultravioleta

Foto da capa disponível em <veja.abril.com.br/blog/genetica/files/2012/08/DNA.jpg>, acessado em 01/08/2014. Arte final elaborada pela autora.

What You Know vs How much you know about it

Imagem disponível em < www.phdcomics.com >, acessado em 01/08/2014. "Piled Higher and Deeper" by Jorge Cham.

Introdução

INTRODUÇÃO

A pele possui a maior área superficial do corpo, delimitando a interface entre o organismo e o meio ambiente (CROSS et al., 1998). Assim, a pele é diretamente exposta à radiação ultravioleta que induz danos diretos ao DNA e formação de espécies reativas de oxigênio. Para manter a integridade das estruturas celulares, a pele é provida de grande número de mecanismos de reparo de DNA e sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (STEENVOORDEN; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1997). Sob condições normais tais mecanismos são suficientes para manter a homeostasia, evitando ou revertendo os danos provocados pela exposição à radiação ultravioleta. Porém, quando há exposição intensa e/ou crônica, esses mecanismos protetores são insuficientes, acarretando em danos a moléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (SHINDO et al., 1994).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer mais freqüente é o de pele, correspondendo à cerca de 25 % de todos os tumores diagnosticados, sendo a radiação ultravioleta o seu maior agente etiológico. Nos últimos anos houve uma maior incidência dos cânceres de pele, apesar do aumento no uso de protetores solares. Isso se deve, provavelmente, à utilização inadequada ou insuficiente do protetor solar e à falsa sensação de segurança, o que leva os indivíduos a não reaplicarem o produto no tempo correto. Estudos conduzidos por Hanson, Gratton e Bardeen (2006) mostram que quando os filtros solares químicos penetram na epiderme viável da pele, o nível de espécies reativas de oxigênio aumenta além daquele produzido naturalmente pelos cromóforos epiteliais sob irradiação. Há, portanto, um crescente interesse pela administração oral ou tópica de antioxidantes provenientes de fontes naturais como agentes fotoquimiopreventivos adjuvantes aos filtros solares, visto que muitos já demonstraram possuir efeitos anticarcinogênico, antimutagênico e baixa toxicidade (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007). Uma opção seria a utilização do extrato de maçã e do flavonol rutina pois estudos indicam que ambos possuem elevada ação antioxidante e anti-inflamatória (AFANAS'EV, et al., 1989; DAVIS et al., 2006; ZESSNER et al., 2008).

O modelo atualmente mais utilizado para avaliação da atividade fotoquimiopreventiva é a irradiação de camundongos sem pelos. Porém, os esforços para diminuir ou mesmo evitar a utilização de animais em experimentos pela comunidade científica tem levado a busca por métodos alternativos à experimentação animal (BENAVIDES et al., 2009).

Este trabalho objetivou a avaliação da eficácia fotoquimiopreventiva de uma formulação contendo extrato de maçã/rutina através do estudo de respostas induzidas por radiação ultravioleta em cultura de células, biópsia de pele humana e pele humana reconstruída *in vitro* e em camundongos sem pelos *in vivo*, visando uma possível redução ou, idealmente, uma substituição do uso de animais.

A primeira etapa deste estudo referiu-se a completa padronização da extração e caracterização do extrato de maçã, bem como de sua otimização quanto a atividade antioxidante e teor de polifenóis. O extrato de maçã foi caracterizado quanto ao perfil cromatográfico, com quantificação do seu teor de rutina. Além disso, o extrato de maçã e a rutina foram estudados quanto a toxicidade e fotoquimioprevenção em cultura celular.

Na segunda etapa do presente estudo, o extrato de maçã e a rutina foram incorporados em uma formulação de uso tópico para avaliação de sua eficácia fotoquimiopreventiva em modelos de pele *in vitro* e em camundongos sem pelos *in vivo* expostos à radiação ultravioleta pela avaliação dos seguintes parâmetros: formação de *sunburn cells*, indução de caspase-3 e dímeros de ciclobutanodipirimidina e determinação dos níveis de peroxidação lipídica, metaloproteinases totais, glutatona reduzida e mieloperoxidase.

CAPÍTULO I

*Estudo e otimização do processo de extração da maçã e
caracterização do extrato de maçã e da rutina pela atividade
antioxidante, perfil cromatográfico e estudo em cultura de
células*

Imagem disponível em < www.phdcomics.com >, acessado em 01/08/2014. "Piled Higher and Deeper" by Jorge Cham.

I.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

I.1.1. O extrato de maçã e a rutina como agentes fotoquimiopreventivos

A maçã (*Malus* sp) pertence à família Rosaceae e vários estudos têm relacionado a ingestão desta fruta com diversas atividades biológicas. Evidências epidemiológicas apontam que o consumo de maçãs reduz o risco de cânceres, principalmente o de pulmão, de doenças cardiovasculares, de distúrbios pulmonares como a asma e de diabetes tipo II. Os derivados da maçã e seus compostos isolados influenciam mecanismos relevantes relacionados à prevenção de diferentes tipos de câncer, incluindo atividade antimutagênica, modulação do metabolismo de carcinógenos, atividades antioxidante e anti-inflamatória, modulação de vias de transdução de sinal anti-proliferativas e anti-apoptóticas (BOYER; LIU, 2004).

As pesquisas apontam uma potente atividade antioxidante *in vitro* da maçã, explicada pela presença de compostos polifenólicos que apresentam em sua estrutura grupos funcionais, visualizados na Figura I.1, capazes de sequestrar ou neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*).

Figura I.1. Grupos funcionais necessários para que haja atividade antioxidante: a presença de um grupo o-dihidroxila (catecol) no anel B (A), uma dupla ligação na posição 2,3 conjugada com um grupamento 4-oxo (B) e a presença de um grupo 3-hidroxila no anel heterocíclico C (C). Retirado de Seyoum, Asres e El-Fiky (2006).

Os principais compostos da maçã são os derivados do ácido hidroxicinâmico, como o ácido clorogênico, monômeros, dímeros e oligômeros de flavonóis e epicatequinas (denominados procianidinas), diidrochalconas, antocianidinas e glicosídeos da quercetina (SCHIEBER; KELLER; CARLE, 2001). As estruturas químicas dos compostos polifenólicos presentes na maçã e sua quantidade aproximada podem ser visualizados nas Figuras I.2 e Tabela I.1, respectivamente.

Figura I.2. Principais compostos polifenólicos presentes na maçã. Retirado de Gerhauser (2008).

Estudos mostram que extratos de maçã, suas frações e seus compostos isolados possuem atividade antioxidante *in vitro* contra radicais peroxila, com consequente inibição da peroxidação lipídica, enquanto que o radical ânion superóxido são fortemente sequestrados por frações contendo glicosídeos da quercetina e procianidinas (ZESSNER et al., 2008). Como atividade anti-inflamatória, os extratos polifenólicos da maçã são potentes inibidores do fator de transcrição nuclear-kappa B, responsável pela ativação de genes envolvidos na produção de diversas substâncias pró-inflamatórias (DAVIS et al., 2006).

Trabalhos com cultura de células cancerosas têm demonstrado que a maçã inibe a proliferação destas. Gerhauser (2008) revisa o papel dos compostos presentes na maçã em todas as etapas do processo de carcinogênese (iniciação, promoção e progressão). Resumidamente, a maçã é capaz de modular as enzimas das fases 1 e 2 do metabolismo de carcinógenos na etapa de iniciação, reduz o estresse oxidativo e a indução de mediadores pró-inflamatórios na etapa de promoção e inibe vias de sinalização relacionadas a proliferação celular descontrolada, a perda de estímulos apoptóticos e ao decaimento da imunidade inata na etapa de progressão da carcinogênese (GERHAUSER, 2008).

Tabela I.1. Teor de polifenóis da maçã (*Malus* sp). Adaptado de Gerhauser (2008).

MAÇÃ (n=8)	PESO FRESCO (mg/Kg)
POLIFENÓIS TOTAIS	662-2119
DERIVADOS DO ÁCIDO HIDROXICINÂMICO	45-384
DIIDROCHALCONAS	20-155
FLAVAN-3-ÓIS	116-411
PROCIANIDINAS	388-1622
FLAVONOLS	34-83

Dentre os glicosídeos da quercetina, tem-se a rutina, que é um flavonol amplamente distribuído no reino vegetal, relativamente barato e acessível, porém bem menos estudado que a quercetina. A rutina, cujo nome segundo a União Internacional da Química Pura e Aplicada é 3, 3', 4', 5, 7, pentahidroxiavona-3-rutinosídeo apresenta um dissacarídeo (raminose + glicose) ligado a posição 3 do anel pirano (RASO et al, 2009), como visto na Figura I.3.

Figura I.3. Estrutura química do flavonol rutina. Retirado de <wikipedia.org/wiki/Rutin>.

Entre as atividades terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos (PATHAK; PATHAK; SINGLA et al., 1991). Em estudos realizados em fêto de cobaias a rutina atuou como um inibidor não competitivo da angiotensina II e prostaglandina E₂ (YILDIZOGLU-ARI et al., 1991). Juntamente com a quercetina, a rutina é um poderoso antioxidante e apresenta baixa toxicidade (AFANAS'EV, et al., 1989). Várias outras atividades da rutina vêm sendo elucidadas como sua eficiência no tratamento da artrite por *Cândida albicans* (HAN, 2009), atividade antihiperlipidêmica (SANTOS et al., 1999), efeito anticonvulsivante em ratos

(NASSIRI-ASL, SHARIATI-RAD, ZAMANSOLTANI, 2008), supressão da imunidade celular (MIDDLETON et al., 2000), atividade anticarcinogênica (MACHADO, 2005) e efeito antiinflamatório (GUARDIA et al., 2001).

O fato do extrato de maçã e da rutina apresentarem potente efeito antioxidante, anti-inflamatório e anticarcinogênico, bem como baixa toxicidade tem resultado no crescente interesse pelo uso desses antioxidantes provenientes de fontes naturais como possíveis candidatos a agentes fotoquimiopreventivos atuando na prevenção/tratamento dos danos induzidos pela radiação ultravioleta (RUV).

I.1.2. A extração por maceração

Para análise de um conjunto de compostos de interesse presentes nos produtos naturais e que geralmente estão em concentrações muito baixas, faz-se necessária a realização de um processo extrativo. Este é realizado para retirar de forma mais seletiva e completa possível as substâncias ou fração ativa contida na matéria-prima vegetal utilizando um solvente extrator (WIJESEKERA, 1991).

O processo de extração começa quando o solvente penetra nas células vegetais expulsando o ar contido no citoplasma. Ocorrem, então, dois processos paralelos, a lixiviação das substâncias solúveis de células rompidas e a dissolução e difusão das substâncias solúveis das células intactas. O processo de lixiviação é rápido, enquanto que a difusão requer etapas de umedecimento e intumescimento, a fim de aumentar a permeabilidade da membrana (SHARAPIN et al., 2000).

Os métodos clássicos de extração utilizando solventes orgânicos (COSE, do inglês *classical organic solvent extraction* –) são amplamente disseminados e incluem as técnicas de percolação, Soxhlet e maceração. A maceração é um dos métodos de extração mais usados devido a sua simplicidade e sua adequação, tanto a pequenas quantidades de drogas quanto a quantidades industriais (WIJESEKERA, 1991). Consiste em deixar a droga em contato com o solvente extrator por períodos de 6 horas a 10 dias. A agitação pode ser ocasional no caso da maceração simples ou constante no caso da maceração dinâmica, que acelera a extração dos compostos. A maceração pode ser executada em temperatura ambiente ou em temperatura elevada, a qual passa a ser denominada digestão. A versatilidade deste método é indiscutível, porém apresenta desvantagens como o longo tempo de extração sem a completa retirada dos princípios ativos da planta (extração parcial). Alguns fatores que influenciam o processo de extração são a proporção solvente:planta, a eficiência e seletividade do solvente extrator, o estado de divisão do material vegetal, a temperatura de extração, entre outros (LIST; SCHMIDT, 1989).

I.1.3. Planejamento experimental e a função de desejabilidade

O planejamento experimental é uma ferramenta que pode ser utilizada quando se têm muitos fatores (variáveis) que se pretende estudar, na tentativa de obter o maior número de informações com o menor número de experimentos (FERREIRA, et al, 2007). Os estudos com planejamentos experimentais evoluíram do método empírico até os métodos estatísticos de planejamento e otimização de experimentos, que têm se mostrado bastante promissores.

Alguns exemplos desses métodos são os planejamentos fatoriais completos e fracionários. Esses métodos estatísticos implicam a elaboração de um planejamento experimental, caracterizado por uma série de fatores que agem sobre a resposta investigada. O resultado final é a identificação, observação e quantificação das alterações nas variáveis. Um planejamento fatorial é aquele em que todos os fatores estudados variam de maneira constante e de forma planejada. Os planejamentos experimentais são representados por uma notação exponencial (x^n), onde a base indica o número de níveis e o expoente, o número de fatores (FERREIRA, et al, 2007).

Os planejamentos fatoriais completos utilizam experimentos que têm como atributo principal incluir em cada ensaio todas as combinações possíveis entre os diferentes fatores. No entanto, este procedimento é demorado, de custo muito alto (quando envolve grande número de experimentos) e desnecessário. Além disso, por não ter nenhum ensaio repetido não se pode calcular o erro padrão, sendo um método desvantajoso (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Os planejamentos fatoriais fracionários são usados quando o número de fatores a ser investigado é alto e não se conhece, *a priori*, a relação completa de todas as variáveis que afetam a resposta, otimizando o número de ensaios sem que haja perda de informações significativas para o estudo. Neste caso, a região de estudo é maior com um menor número de ensaios a serem realizados, podendo-se calcular o erro experimental quando se repete pelo menos três vezes a condição do ponto central, o qual é indispensável para avaliar a reprodutibilidade do processo. Além disso, é possível elaborar um modelo matemático que pode ser usado para a obtenção da superfície de resposta e através desta análise determinarem-se as condições otimizadas, a qual é fornecida pela significância estatística das respostas (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

O planejamento fatorial fracionário do tipo Box-Benhken é caracterizado por um conjunto de pontos em três níveis situados no ponto médio de cada aresta de um cubo multidimensional e com réplicas no ponto central. Este planejamento segue um modelo

de segunda ordem porque possui não só níveis alto (+1) e baixo (-1), como também um nível médio (0), permitindo a detecção de interações quadráticas entre os fatores estudados (CHOPRA et al, 2007). Segundo Ferreira e colaboradores (2007), o número de experimentos (N) requeridos para o desenvolvimento de um planejamento fatorial do tipo Box-Benhken é determinado pelo número de fatores estudados (k) e pelo número de repetições no ponto central (C_0), de acordo com a fórmula:

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad \text{Equação 1}$$

As repetições no ponto central têm dois objetivos principais: fornecer o erro do experimento e normalizar a variância do valor predito, sendo recomendadas de 2 a 4 repetições. Assim, quando se trabalha com três fatores, existem doze pontos nos centros das arestas mais três pontos centrais, como esquematizado no cubo da Figura I.4. Portanto, o planejamento Box-Behnken não contém combinações em que todos os fatores estejam em seus níveis altos (+1,+1,+1) ou baixos (-1,-1,-1), evitando condições experimentais extremas as quais geralmente fornecem resultados insatisfatórios (GUO et al., 2008).

Figura I.4. Representação esquemática dos pontos do planejamento Box Behnken e distribuição dos níveis e dos fatores. Modificado de < www.me.udel.edu/old-meeg401/06/bb2.gif>. Arte final elaborada pela autora.

Os planejamentos experimentais, principalmente o do tipo Box Behnken, possuem diversas vantagens, eles podem determinar qual fator influencia mais em uma determinada resposta, quais as possíveis interações entre os fatores e o grau de influência

das mesmas; tudo isto com um número reduzido de experimentos e um menor tempo de análise. (CHOPRA et al, 2007).

Um processo que possui múltiplas respostas em que cada uma tem sua influência na qualidade final, pode ser otimizado pelo método da função de desejabilidade (COLOMBARI, 2004). Para cada característica (x), existe uma resposta (y) e uma função de desejabilidade (d) que varia de 0 a 1, quanto mais próximo de 1 for a função de d mais desejável a resposta (DERRINGER; SUICH, 1980). Existem diferentes tipos de função de desejabilidade, a classificação é feita baseada no objetivo da resposta, a minimização, a maximização ou atingir um determinado valor alvo. Para cada objetivo, precisa-se definir o alvo e/ou o limite inferior e superior, como visto na Figura I.5, que mostra um esquema dos tipos de desejabilidade. Por exemplo, na minimização determina-se um valor alvo, assim respostas abaixo deste valor possuem um y próximo de 1 enquanto que respostas acima deste valor ficam próximas de zero, ou seja, são respostas não desejáveis, pois este tipo de função de desejabilidade determina que quanto menor o valor, mais desejável é a resposta.

Figura I.5. Tipos de função de desejabilidade. Adaptado de Colombari (2004).

O formato da função de desejabilidade vai depender do peso atribuído a cada característica, quanto maior o peso, mais facilmente o valor alvo é alcançado. Por exemplo, na função de maximização, quanto maior o peso dado a característica, mais acentuada será a curva em direção ao valor alvo (DELCASTILLO; MONTGOMERY; MCCARVILLE, 1996). A Figura I.6 mostra um esquema destes diferentes formatos para os tipos das funções de desejabilidade. Desta forma, a idéia básica da função de desejabilidade é transformar um problema de múltiplas respostas em um problema com uma resposta, facilitando a resolução da situação.

Figura I.6. Formatos das funções de desejabilidade. Adaptado de Colombari (2004).

I.1.4. Atividade antioxidante

É amplamente reconhecida a importância da oxidação no organismo. O metabolismo oxidativo gera as ROS que estão relacionadas com a produção de energia, fagocitose, controle do crescimento celular e sinalização intercelular e síntese de compostos biologicamente importantes. No entanto, quando produzidas em grande quantidade, essas espécies podem causar uma série de danos celulares. As ROS mais importantes nos organismos vivos incluem hidroxila ($\bullet\text{OH}$), radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), radical peroxila ($\text{LO}_2\bullet$), peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio no estado singlete (frequentemente simbolizado como $^1\text{O}_2$) (ARUOMA, 1999).

Quando ROS são geradas nos seres vivos, uma ampla variedade de antioxidantes endógenos protege o organismo de seus efeitos danosos (STEENVOORDEN et al., 1997). No entanto, a exposição do organismo a agentes agressores como álcool, fumo, drogas, poluição, RUV, entre outros, associada a produção de ROS pelo metabolismo celular provoca um quadro denominado estresse oxidativo que desequilibra as defesas antioxidantes endógenas e danifica proteínas, carboidratos, DNA e lipídios nas membranas celulares, modificando a sua fluidez e ocasionando a perda de funções essenciais (PIETTA, 2000).

Um antioxidante pode ser definido como uma substância ou conjunto de substâncias que, em baixa concentração, diminuem ou previnem a oxidação de substratos presentes em nosso organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os mecanismos de ação antioxidante podem incluir: supressão da formação de ROS, tanto pela inibição de enzimas ou pela quelação de elementos envolvidos na produção destes; sequestro de ROS e aumento ou proteção das defesas antioxidantes do organismo (PIETTA, 2000). Portanto, a atividade antioxidante deve ser avaliada por diversos métodos envolvendo diferentes mecanismos, pois o potencial de um composto pode ser diferente de acordo

com o ensaio empregado (MOURE et al., 2001). Experimentos antioxidantes *in vitro* são importantes para estimar a eficácia que determinado fitocomplexo/fitofármaco terá no organismo, visto que um composto que é pouco efetivo *in vitro* possivelmente não terá melhor ação *in vivo* (ARUOMA, 1999).

I.1.5. Toxicidade celular

A segurança na utilização de produtos de origem vegetal sempre foi um fator de grande importância. A avaliação da citotoxicidade de uma planta medicinal pode indicar se um produto elaborado com esta possuirá efeitos tóxicos indesejáveis ou não (KUSUMOTO et al., 1995). Os métodos que utilizam tecidos e células vivas são os mais empregados, pois a complexidade celular intrínseca é mantida. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, sendo que a sobrevivência e/ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais. A incorporação de radioisótopos, formação de colônias, aderência celular, produtos de metabolismo entre outros são parâmetros que também podem ser utilizados (RIDDELL et al., 1986; SAOTOME et al., 1989; HUSOY et al., 1993). Muitos métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos e validados para compor a bateria de testes alternativos ao uso de animais. Ensaio em cultura celular são adequados para avaliar preliminarmente a toxicidade de novas drogas, visto que a utilização de linhagens celulares permanentes oferece uma série de vantagens, tais como disponibilidade, reprodutibilidade e facilidade de manutenção.

o.

CAPÍTULO II

*Avaliação fotoquimiopreventiva do EEP.M e da rotina
adicionados em formulação sobre modelos de pele humana “in
vitro” e modelo de camundongo sem pelos “in vivo”*

II.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

II.1.1. A pele e sua função de barreira

A pele atua como barreira protetora contra ataques físicos, químicos e microbiológicos, mantém a temperatura corporal, impede a perda de água, além de possuir funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato), promovendo a homeostasia do organismo (AZULAY; AZULAY, 1999). Cobre uma área de aproximadamente 2 m² em um homem de estatura média e apresenta espessura variável (1 a 4 mm) conforme a região (DANGELO; FATTINI, 2005). A pele é formada por três camadas, conforme mostrado na Figura II.1: epiderme (estrato córneo e epiderme viável), derme e hipoderme, da mais externa para a mais profunda, respectivamente (AZULAY; AZULAY, 1999).

Figura II.1. As camadas da pele: epiderme (dividida em estrato córneo, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal), derme e hipoderme. Modificado de <creepypasta.wikia.com/wiki/File:Layers-of-Skin-shutterstock.jpg> e <www.doctor-hill.com/mesa-arizona/obagi_arizona.htm>. Arte final elaborada pela autora.

O estrato córneo funciona como uma barreira física e química, sendo formado por uma camada compacta de células (corneócitos) alongadas, mortas e desidratadas, as quais são o produto final da morte dos queratinócitos produzidos na epiderme viável. Dentro dos corneócitos são encontradas substâncias hidrofílicas de baixa massa molecular, como aminoácidos, açúcares e queratina, que fornece resistência a estas células. Cada corneócito do estrato córneo é envolto por um envelope protéico e entre eles está presente a maioria do material lipídico na forma de lipídios neutros (BOUWSTRA et al., 2003; ZATZ, 1993). As células queratinizadas são embebidas em uma matriz lipídica,

organizada em bicamadas e composta por ceramidas (45-50 %), colesterol (25 %), ácidos graxos (10-15 %) entre outros lipídios (5 %) (MADISON, 2003).

Abaixo do estrato córneo está a epiderme viável, que é formada por queratinócitos em vários estágios de diferenciação bioquímica. Na epiderme há um constante movimento dos queratinócitos recém-formados partindo da camada basal em direção ao estrato córneo, sendo que a taxa de renovação celular é igual à taxa de desprendimento das células mais externas do estrato córneo (descamação). Os folículos pilosos e as glândulas sebáceas são estruturalmente partes da epiderme, porém nesta camada não existem vasos sanguíneos, e os nutrientes precisam se difundir partindo da derme (BOUWSTRA et al., 2003; SMITH; MAIBACH; SURBER, 2000; ZATZ, 1993). Além disso, estão presentes na epiderme as células de Langerhans (envolvidas no sistema imune), células de Merkel (sensoriais) e os melanócitos (responsáveis pela pigmentação da pele) (AZULAY; AZULAY, 2008). A epiderme viável está dividida em três camadas sendo elas, da mais externa para a mais interna:

- a) As células da **camada granulosa** são poligonais, mais achatadas, e têm grânulos de querato-hialina em seu citoplasma, que são precursores da queratina do estrato córneo;
- b) As células da **camada espinhosa** são mais poligonais, e apresentam projeções citoplasmáticas que ancoram as células umas às outras, dando resistência ao atrito;
- c) A **camada basal**, também chamada de camada germinativa, ou proliferativa, é formada por células jovens, colunares, em multiplicação constante e são responsáveis por renovar as células da epiderme.

A derme, localizada imediatamente sob a epiderme, é um tecido conjuntivo que contém fibras protéicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. A derme é responsável pela maioria da força mecânica e das sensações da pele. As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*). Sob a derme, há uma camada de tecido conjuntivo frouxo, o tecido subcutâneo, rico em fibras e em células que armazenam gordura (células adiposas ou adipócitos). A camada subcutânea, denominada hipoderme, atua como reserva energética, proteção contra choques mecânico e isolante térmico (SMITH; MAIBACH; SURBER, 2000; ZATZ, 1993).

II.1.2. A radiação ultravioleta e os danos causados à pele

As mudanças no estilo de vida, as atividades de lazer e esportes ao ar livre e a destruição da camada de ozônio são alguns dos fatores que têm provocado o aumento da exposição diária da pele à RUV, que pode causar distúrbios cutâneos, como

fototoxicidade, envelhecimento cutâneo, fotossensibilidade, doenças auto-imunes e câncer de pele (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006). As respostas da pele à RUV dependem de muitas variáveis, incluindo comprimento de onda, dose, características da pele, idade e suscetibilidade genética (SLEIJFFERS et al., 2003).

A exposição excessiva às radiações ultravioleta A (320-400 nm), B (280-320 nm) e C (200-280 nm) é capaz de limitar a capacidade natural dos sistemas de defesa da pele. Felizmente, a camada de ozônio da atmosfera terrestre absorve eficientemente os comprimentos de onda da radiação solar menores que 310 nm, eliminando a UVC e grande parte da UVB. Assim, apesar de ser a mais energética e conseqüentemente a mais danosa biologicamente, o papel da UVC nas patogenias humanas causadas pela exposição à radiação solar é irrisório. Desta forma, a RUV que chega à superfície terrestre consiste de UVB (1-10%) e de UVA (90-99%) (INAL; KAHRAMAN, 2000), conforme a Figura II.2.

Figura II.2. Profundidade de penetração da radiação solar na pele humana em função do comprimento de onda. Desenho esquemático das camadas da pele retirado de <www.doctor-hill.com/mesa-arizona/obagi_arizona.htm>. Arte final elaborada pela autora.

A radiação UVB que atinge a Terra é suficientemente energética para penetrar no estrato córneo e epiderme causando eritemas ou queimaduras severas. A UVB é cerca de 1000 vezes mais efetiva em causar queimaduras solares que a UVA e atua majoritariamente na camada basal (germinativa) da epiderme. Embora a radiação UVA seja a menos energética, é a que mais atinge a Terra e possui o maior potencial penetrante; alcança a derme estimulando a formação de melanina, a qual deixa a pele bronzeada e a protege de queimaduras imediatas (MATSUI; DELEO, 1991).

A radiação UVB possui energia suficiente para induzir diretamente lesões às moléculas de DNA, e pode, também, gerar ROS. Os dímeros de ciclobutanodipirimidina (CPDs, Figura II.3.A) e os pirimidina-pirimidona (6,4) fotoprodutos (6-4 PPs, Figura II.3.B) são denominados *fingerprint* ou *signature lesions* por serem causados unicamente pela UVB (NISHIGORI, 2006).

Figura II.3. Fotolesões induzidas pela exposição à radiação UVB (em verde): dímeros de ciclobutanodipirimidina (A), pirimidina-pirimidona (6,4) fotoprodutos (B) e isômeros de Dewar (C). Modificado de Sinha e Häder (2002) e <www.cosmobio.co.jp>. Arte final elaborada pela autora.

A formação de CPDs ocorre quando bases pirimidínicas vizinhas absorvem a energia da UVB, formando um anel ciclobutano pela ligação covalente entre os átomos de carbono C5 e C6 de ambas as bases nitrogenadas. No caso dos 6-4 PPs, embora

também se trate de uma ligação covalente entre pirimidinas da mesma fita, esta não é cíclica, envolvendo os carbonos C6 e C4 das pirimidinas (citosinas e, em menor proporção, timinas) 5' e 3', respectivamente. (NISHIGORI, 2006). Os produtos do tipo 6,4-PP são prontamente convertidos nos isômeros de Dewar (Figura II.3.C), que são moderadamente fotoativáveis e podem ser revertidos à 6,4-PP quando expostos a radiação UVB de ondas curtas. Os CPDs são de três a cinco vezes mais frequentes que os 6-4 PPs, causando uma distorção de 30° na dupla hélice do DNA, enquanto que os 6-4 PPs provocam distorções de 44°. Essas distorções na dupla fita do DNA comprometem sua função e levam ao aparecimento de sítios mutagênicos (RASTOGI et al., 2010).

Dentre os fatores importantes que regulam o processo de reparo dos danos causados ao DNA, pode-se citar a proteína p53, codificada pelo gene supressor de tumor *p53*, que participa da regulação do ponto de checagem em G1 do ciclo celular. De fundamental importância para a manutenção da integridade do genoma, a p53 permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose (YU; ZHANG, 2005). Danos no DNA promovem a expressão exacerbada e consequente ativação da p53, resultando na parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA. Depois de realizado o reparo, a p53 modula positivamente a transcrição da proteína mdm-2 (do inglês *murine double minute*), uma proteína que se associa à p53 inibindo-a. Consequentemente, ocorre reversão do bloqueio do ciclo celular e avanço para a fase S (SHERR, 2000).

Quando o dano causado ao DNA e/ou outros cromóforos é severa e irreparável ocorre a formação de *sunburn cells* (SBC), o que assegura o descarte das células lesionadas. As SBC são queratinócitos apoptóticos que serão posteriormente eliminados por células fagocitárias do sistema imune de modo a evitar o aparecimento de um fenótipo canceroso. As características morfológicas das SBC são as mesmas encontradas em células apoptóticas: encolhimento celular, condensação e fragmentação da cromatina, formação de bolhas citoplasmáticas (denominadas *blebs*) e formação dos corpos apoptóticos (CLAERHOUT et al., 2005). Na formação de SBC, a integridade estrutural das organelas, incluindo a mitocôndria, é mantida, provavelmente devido ao fato do processo apoptótico ser dependente de energia. As SBC acumulam-se principalmente na camada basal, responsável pela proliferação e renovação dos queratinócitos da epiderme. Apesar de ser um mecanismo de proteção, a formação de grande quantidade SBC pode inevitavelmente levar a perda da capacidade germinativa da camada basal, desequilibrando a homeostasia da pele (VAN LAETHEM et al., 2005).

Do ponto de vista bioquímico, as características morfológicas da célula apoptótica são causadas por uma família de cisteína proteases denominadas caspases, que clivam substratos celulares assegurando o rápido desarranjo da célula. As caspases são sintetizadas como zimogênios (precursores inativos), que são clivados em um sítio proteolítico interno para formar enzimas ativas. As caspases relacionadas ao processo de apoptose podem ser divididas em dois subgrupos de acordo com sua função: caspases iniciadoras (caspases -2, -8, -9, e -10) e caspases efetoras (caspases -3, -6, e -7). Uma vez ativadas, as caspases iniciadoras ativam as caspases efetoras no final da via de sinalização que clivam substratos protéicos, levando a interrupção do ciclo celular, inativação do reparo do DNA, inativação dos supressores de apoptose e desarranjo do citoesqueleto celular (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). Entre os diversos substratos das caspases pode-se citar a mdm-2 que é responsável por manter a proteína p53 no citoplasma. Ao ser clivada pelas caspases, a mdm-2 libera a p53 que se transloca para o núcleo e passa a ser intensamente fosforilada por diversas quinases, ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos. Existem, portanto, fortes evidências da participação da proteína p53 na supressão da tumorigênese. Além disso, a maioria dos cânceres apresenta mutações no gene *p53* ou defeitos na sua regulação (FEARON; GRUBER, 2001).

A família das proteínas Bcl-2 é responsável pelo ponto de checagem do processo apoptótico. Essa família possui tanto proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-XS, Bik, Bim e Hrk) como anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 e A1) e seu balanço de ativação/desativação é o que determina a indução da via de sinalização das caspases. Em células de mamíferos, esta segue dois mecanismos distintos, porém convergentes: a via extrínseca ou iniciada por receptores, e a via intrínseca, ou mitocondrial (Figura II.4) (SHEEHAN; YOUNG, 2002)

A via extrínseca é mediada pela ativação dos receptores de morte celular localizados na membrana plasmática, que são pertencentes a superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral (rTNF). Por um mecanismo ainda não totalmente elucidado, a radiação UVB provavelmente ativa os receptores de morte Fas (denominado também CD95 ou APO-1) e fator de necrose tumoral (TNFR, do inglês *tumor necrosis factor receptor*) que se oligomerizam recrutando proteínas adaptadoras, como a proteína do domínio de morte associada a Fas (FADD, também chamada de MORT-1). Esta recruta a pró-caspase-8 (e possivelmente a pró-caspase 10) formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*). A interação com o DISC induz a auto-clivagem proteolítica das pro-caspases 8 e 10 que, uma vez ativadas,

iniciam a cascata de sinalização das caspases, culminando na caspase 3, a primeira caspase efetora a ser ativada. A caspase 3 ativa outras caspases efetoras (caspases 6 e 7) e cliva substratos protéicos importantes, o que leva à morte celular (BUDIHardjo et al., 1999). A caspase 8 pode ainda conectar a via extrínseca à via intrínseca de apoptose pela clivagem da proteína Bid, resultando no Bid truncado (tBid), que pode inativar a proteína anti-apoptótica Bcl-2 na membrana mitocondrial, levando a modificação de sua permeabilidade e ativando a via intrínseca (Hengartner, 2000).

A via intrínseca de sinalização apoptótica é ativada por estresse celular, como geração de ROS e danos ao DNA, que converge diretamente para a mitocôndria, onde uma série de eventos bioquímicos levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e conseqüente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma, como citocromo *c*, o fator indutor de apoptose (AIF, do inglês *apoptosis-inducing factor*) e proteínas de choque térmico. O citocromo *c* liberado no citoplasma se liga a uma proteína citosólica denominada fator de ativação de protease apoptótica 1 (Apaf 1, do inglês *apoptotic protease activating factor 1*) que, na presença de dATP (deoxiadenosina trifosfato), facilita a formação de uma estrutura quaternária protéica denominada apoptossoma. O apoptossoma pode então recrutar e clivar a pró-caspase 9, que na forma de caspase 9 ativa a caspase 3 efetora que, como explanado na via extrínseca, leva a morte celular (Gottlieb, 2001).

Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do $\Delta\Psi$ e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de ROS. O aumento nos níveis de ROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, aumentando o colapso do $\Delta\Psi$. A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que as ROS induzem a ativação direta das caspases -9 e -3 (Green; Kroemer, 2004). Devido a capacidade da UVB em promover danos ao DNA, oligomerização de receptores de morte celular e geração de ROS, as SBC induzidas por UVB podem se originar de ambas as vias extrínseca e intrínseca de ativação das caspases. Estudos recentes, no entanto, indicam que a irradiação de queratinócitos com doses fisiologicamente relevantes de UVB induz apoptose majoritariamente pela via de sinalização intrínseca (Van Laethem et al., 2005).

Figura II.4. Esquema simplificado das vias extrínseca e intrínseca de ativação das caspases em humanos. Inspirado em <www.ilbe.com/index.php?listStyle=webzine&mid=jjal&document_srl=233989608>. Arte elaborada pela autora.

O insucesso no reparo dos danos ao DNA juntamente com a falha no processo de morte celular programada perpetua e amplifica as mutações nas células epidérmicas, o que pode provocar uma lesão tecidual pré-cancerosa, denominada queratose actínica, que leva ao desenvolvimento do câncer de pele (LUCINDA, 2009). Três tipos principais de câncer de pele podem ser mencionados (Figura II.5): carcinoma basocelular, carcinoma celular escamoso (ambos originados de queratinócitos) e o melanoma cutâneo maligno (originado de melanócitos) que assomam, respectivamente, cerca de 80, 16 e 4 % de todos os cânceres de pele (CLAERHOUT et al., 2005).

Figura II.5. Principais tipos de câncer de pele e sua profundidade de alcance, de acordo com as camadas da pele: o carcinoma celular escamoso e o carcinoma basocelular atingem, respectivamente, as camadas escamosa e basal da epiderme, enquanto que o melanoma maligno é o mais profundo, atingindo a derme. Modificado de <anatomyandphysiologyi.com/skin-cancer> e <www.riversideonline.com/health_reference/Cancer>. Arte final elaborada pela autora.

Há fortes evidências de que a radiação UVB seja o principal fator de risco ambiental que proporciona o desenvolvimento de carcinoma basocelular e carcinoma celular escamoso (também denominados cânceres do tipo não melanoma), sendo essa fração da RUV um carcinógeno completo. Já o desenvolvimento de melanoma cutâneo maligno está diretamente relacionado à indução de danos oxidativos na pele provocados

pela geração ROS, o que indica uma ação conjunta das radiações UVB e UVA. A radiação UVA, mais efetiva que a UVB em gerar ROS, está comprovadamente ligada a 67 % dos casos de melanoma maligno (WITTGEN; VAN KEMPEN, 2007).

Para que ocorra a formação de ROS é preciso que haja um processo de fotossensibilização dos cromóforos presentes na pele, como os ácidos nucléicos, aminoácidos aromáticos, quinonas, flavinas, porfirinas, carotenoides, 7-dehidrocolesterol (que absorvem UVB) melanina e ácido urocânico (que absorvem UVB e UVA). Estes capturam fótons da RUV o que, por sua vez, modifica sua distribuição de elétrons, fazendo com que passem para um estado singlete excitado. Nesse estado, o cromóforo pode emitir fluorescência, perder energia na forma de calor, sofrer reação formando fotoprodutos ou passar para o estado triplete excitado, que possui meia vida mais longa.

O dano celular causado por um cromóforo no estado excitado pode acontecer por dois mecanismos: no tipo I, o cromóforo transfere elétrons para outras biomoléculas endógenas, resultando em formação de ROS de maneira independente da presença de O_2 ; no tipo II, a formação de ROS ocorre por transferência de elétrons do cromóforo para O_2 com formação majoritária de oxigênio singlete (1O_2), um estado excitado do oxigênio com grande poder oxidante e cuja meia vida é relativamente longa. A completa redução do 1O_2 à água requer quatro elétrons, sendo que as espécies reduzidas de oxigênio incluem o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) (SCANDALIOS, 2005).

As ROS interagem facilmente com as células do tecido humano e possuem grande potencial destrutivo. Vários efeitos tóxicos atribuídos ao radical ânion $O_2^{\bullet-}$ podem ser devidos à reação deste, catalisada por metais de transição presentes no meio fisiológico, com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para produção do radical hidroxila. Esta é a espécie de oxigênio mais reativa e reage com biomoléculas capazes de ceder elétrons, como enzimas, açúcares, aminoácidos, ácidos nucléicos ou fosfolipídeos de membrana, levando à sua desorganização, ao formar radicais alcóxila ($LO^{\bullet}$), radicais peróxila ($LOO^{\bullet}$) e hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$). Além disso, o radical ânion $O_2^{\bullet-}$ gera alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso ($HOCl$) e peroxinitrito ($ONOO^-$), que são os principais responsáveis pelo combate a patógenos no organismo (SCANDALIOS, 2005; JAY et al., 2006; VALKO et al., 2007; PIAO et al., 2008). Um resumo das ROS e suas principais características está apresentado na Figura II.6.

ROS	DESCRIÇÃO
<p>RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO</p>	<p>ESTADO DE REDUÇÃO UNIVALENTE DO O_2, FORMADO EM DIVERSAS REAÇÕES DE AUTOOXIDAÇÃO E PELA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS. É RELATIVAMENTE POUCO REATIVO MAS SOFRE DISMUTAÇÃO FORMANDO H_2O_2 ESPONTANEAMENTE OU ATRAVÉS DE CATÁLISE ENZIMÁTICA E É UM PRECURSOR DA FORMAÇÃO DE $OH^\bullet$ MEDIADA POR METAIS DE TRANSIÇÃO.</p>
<p>PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO</p>	<p>ESTADO DE REDUÇÃO DIVALENTE DO O_2, FORMADO ATRAVÉS DA DISMUTAÇÃO DO $O_2^{\bullet-}$ OU PELA REDUÇÃO DIRETA DO O_2. É LIPOSSOLÚVEL, PODENDO PORTANTO PASSAR ATRAVÉS DE MEMBRANAS POR DIFUSÃO.</p>
<p>RADICAL HIDROXILA</p>	<p>ESTADO DE REDUÇÃO TRIVALENTE, FORMADO PELA REAÇÃO DE FENTON E DECOMPOSIÇÃO DO PEROXINITRITO. É EXTREMAMENTE REATIVO E ATACA A MAIORIA DOS COMPONENTES CELULARES.</p>
<p>PERÓXIDO LIPÍDICO</p>	<p>FORMA-SE ATRAVÉS DE REAÇÕES RADICALES COM COMPONENTES CELULARES TAIS COMO LIPÍDIOS E BASES NUCLEOTÍDICAS.</p>
<p>RADICAL ALCOXILA</p>	<p>SÃO RADICAIS ORGÂNICOS QUE POSSUEM O ELÉTRON DESEMPARELHADO NO ÁTOMO DE OXIGÊNIO. AS FORMAS LIPÍDICAS SÃO GERADAS EM REAÇÕES DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA. SÃO PRODUZIDOS NA PRESENÇA DE OXIGÊNIO POR ADIÇÃO RADICALAR A LIGAÇÕES DUPLAS OU ABSTRAÇÃO DE HIDROGÊNIO.</p>
<p>RADICAL PEROXILA</p>
<p>ÁCIDO HIPOCLOROSO</p>	<p>FORMADO A PARTIR DO H_2O_2 PELA ENZIMA MIELOPEROXIDASE. LIPOSSOLÚVEL E MUITO REATIVO. OXIDA FACILMENTE GRUPOS PRESENTES EM PROTEÍNAS, COMO GRUPOS TIOL E GRUPOS AMINA.</p>
<p>PEROXINITRITO</p>	<p>FORMADO ATRAVÉS DE UMA REAÇÃO RÁPIDA ENTRE O $O_2^{\bullet-}$ E O $NO^\bullet$. LIPOSSOLÚVEL E DE REATIVIDADE SIMILAR AO ÁCIDO HIPOCLOROSO. A SUA FORMA PROTONADA, O ÁCIDO PEROXINITROSO, PODE SOFRER QUEBRA HOMOLÍTICA FORMANDO RADICAL HIDROXILA E DIÓXIDO DE NITROGÊNIO.</p>

Figura II.6. Espécies reativas de oxigênio e suas principais características. Arte elaborada pela autora.

Para cumprir sua função de proteção contra os danos causados pelas ROS, a pele possui grande número de mecanismos de defesa antioxidante (KOHEN; GATI, 2000). Os antioxidantes endógenos podem ser sistemas enzimáticos (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione redutase) e não-enzimáticos (glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno) (STEENVOORDEN et al., 1997) e estão em maior concentração na epiderme, indicando ser esta mais susceptível que a derme ao estresse oxidativo (SHINDO et al., 1994). Sabe-se que em condições fisiológicas as enzimas antioxidantes são muito eficazes em neutralizar as ROS gerados no organismo, sendo que a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), o sistema enzimático das glutathiones e a mieloperoxidase (MPO) estão entre os mais potentes antioxidantes encontrados na natureza (Figura II.7) (RATNAM et al., 2006).

Nos seres humanos, existem três tipos desta enzima, chamadas de Cu/ZnSOD citosólica, MnSOD mitocondrial e SOD extracelular, as quais são responsáveis pela dismutação de dois radicais ânions $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 (RATNAM et al., 2006; SCANDALIOS, 2005). A SOD, assim como a maioria das enzimas antioxidantes, depende essencialmente de co-fatores externos para que possa desempenhar suas atividades e possui meia vida curta. Na epiderme humana, a atividade da Cu/ZnSOD parece ser de cinco a dez vezes menor que a da MnSOD (THIELE; DREHER, 2005). A hidropoxidase CAT é um tetrâmero com quatro grupamentos heme encontrado em todos os organismos aeróbicos (RATNAM et al., 2006; SCANDALIOS, 2005), é predominantemente presente nos peroxissomos, sendo responsável pela conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 . Estudos indicam que há atividade elevada desta enzima na epiderme humana, o que não acontece na derme (CHAUDIERE; FERRARI-ILIOU, 1999).

O H_2O_2 também pode ser eliminado pela ação da glutathione peroxidase (GPX) presente no citoplasma, na mitocôndria ou no meio extracelular. Sua ação é converter o H_2O_2 em H_2O e os hidroperóxidos lipídicos oriundos da membrana, em álcoois estáveis (FRIDOVICH, 1998; CHAUDIERE; FERRARI-ILIOU, 1999). A ação desta enzima é desempenhada através da utilização da glutathione reduzida (GSH), em reação catalisada pela glutathione peroxidase. Após a doação de elétrons, a GSH passa a sua forma oxidada (GSSG), mas poderá ser regenerada através da glutathione redutase (GR), com transferência do hidrogênio da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). Outra via de neutralização do H_2O_2 seria sua conversão em ácido hipocloroso (HClO) pela enzima MPO, uma heme peroxidase abundantemente encontrada nos

lisossomos de neutrófilos. O HClO produzido possui importante atividade na defesa contra patógenos invasores (TRUSH; EGNER; KENSLER, 1994).

Figura II.7. Mecanismo de neutralização das ROS geradas no organismo pelos antioxidantes endógenos superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR), glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG), catalase (CAT) e mieloperoxidase (MPO). R^* = fotossensibilizantes endógenos. Inspirado em <ebm.sagepub.com/content/233/6/753/F1.expansion>. Arte elaborada pela autora.

Sob tensão normal de oxigênio tais mecanismos são suficientes para manter a homeostasia, removendo as ROS produzidas. No entanto, sob exposição intensa e/ou crônica à RUV, a concentração de ROS aumenta incontrolavelmente, rompendo o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante no organismo, em favor do primeiro (SIERENS et al., 2001). Assim, ocorre uma série de efeitos prejudiciais às células da pele humana, com aumento massivo da peroxidação lipídica nas membranas biológicas. A peroxidação lipídica pode conduzir a uma desorganização da membrana celular com liberação de fosfolipídios que atuam sinergicamente a um aumento das atividades da fosfolipase A_2 e da ciclooxygenase-2 induzidas pela RUV, resultando em níveis maiores de produção de prostaglandinas, incluindo a prostaglandina E_2 , responsáveis pela inflamação epitelial. Os peróxidos lipídicos formados possuem as seguintes ações deletérias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990):

- a) Ruptura das membranas celulares;
- b) Mutações no DNA;
- c) Oxidação dos lipídios insaturados;

d) Formação de produtos tóxicos;

e) Comprometimento dos componentes da ECM (proteoglicanas, colágeno e elastina).

Na LPO ocorre uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. As etapas de iniciação e propagação estão apresentadas na Figura II.8.

Figura II.8. Representação esquemática da LPO. Lipídio (LH), radical hidroxila (OH•), radical lipídico (L•), radical peroxila (LOO•), radical alcoxila (LO•), hidroperóxidos lipídicos (LOOH/LOH), malondialdeído (MDA). Modificado de Minotti e Aust (1989). Arte final elaborada pela autora.

A etapa de iniciação da LPO ocorre com a abstração de um hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios da membrana (LH) pelo radical hidroxila (OH•), gerando um radical lipídico (L•). Esse radical reage com o oxigênio molecular para formar o radical peroxila (LOO•). Este, por sua vez, pode abstrair um hidrogênio do ácido graxo vizinho produzindo um hidroperóxido lipídico (LOOH) e um segundo radical lipídico (L•). O LOOH pode sofrer redução por metais presentes no meio, como o Fe²⁺, produzindo o radical alcoxila (LO•). Tanto o LOO• como o LO• propagam a reação em

cadeia por abstração de mais átomos de hidrogênio que atacam as membranas mitocondriais, amplificando a LPO (ARUOMA, 1999). Os hidroperóxidos lipídicos podem sofrer redução pelo Fe^{2+} produzindo aldeídos citotóxicos e pró-inflamatórios como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE) e acroleína. Além disso, esses compostos intercalam-se entre as bases de ácidos nucleicos do DNA promovendo mutações e quebra da fita de DNA (FUCHS; PACKER, 1991). Essa reação em cadeia acaba quando a concentração de espécies radicalares é alta o suficiente para que dois radicais reajam produzindo espécies não-radicalares (ARUOMA, 1999). A LPO pode ser suprimida por antioxidantes que inativam enzimas envolvidas na formação de ROS, por quelação do Fe^{2+} , por inibição da etapa de iniciação e/ou aceleração da etapa de terminação. Dessa forma, a LPO pode ser prevenida no estágio inicial por sequestradores de espécies radicalares e retiradores de oxigênio no estado singlete e a propagação da reação em cadeia pode ser quebrada por sequestradores de radical peroxila, alcoxila e quelantes de Fe^{2+} (COOK; SAMMAN, 1996).

O processo inflamatório resultante da incidência da RUV sobre a pele promove a liberação de fatores de crescimento, de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos (GOODMAN, 2002). Sugere-se que a modulação de fatores de transcrição como o fator nuclear-kappa B (NF-kB) e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAP quinase) pelas ROS são eventos precoces e essenciais na indução de reações inflamatórias (FUCHS et al., 2001). Quando não estimulado, o fator NF-kB encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória denominada I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF-kB para o núcleo, sendo a fosforilação e a degradação do I κ B necessárias para que ocorra tal translocação. O NF-kB é sensível ao estresse oxidativo e capaz de ativar genes envolvidos na produção de substâncias pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-1 α , IL-1 β e IL-6) que promovem a ativação de outras células efetoras como leucócitos e células endoteliais (FUCHS, 1998; CARINI et al., 2000) (Figura II.9).

As citocinas liberadas pela exposição à RUV podem, então, atuar de modo autócrino e parácrino sobre células epidermais e leucócitos infiltrados, estimulando a sinalização intracelular e alterando a expressão gênica. Por exemplo, a IL-1 pode prontamente induzir a via de sinalização intracelular das MAP quinases (JANSSENS e BEYAERT, 2003). MAP quinases compreendem um grande número de proteínas serina/treonina quinases envolvidas na regulação de diferentes processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse e apoptose. A quinase

regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e as quinases p38 são subfamílias multi-membros das MAP quinases e são ativadas nos queratinócitos, em resposta ao dano oxidativo e à indução por citocinas inflamatórias, podendo, potencialmente, influenciar a sobrevivência celular (AFAQ et al., 2005). A ativação destas subfamílias resulta no aumento da expressão do fator de transcrição c-Jun na pele humana que juntamente com o fator de transcrição constitutivamente expresso c-Fos formam um complexo denominado fator de transcrição proteína ativadora AP-1. Evidências sugerem o envolvimento da família de proteínas AP-1 na proliferação e sobrevivência celular pela regulação da expressão e função de grande número de proteínas reguladoras do ciclo celular (KIM et al., 2005; XU; FISHER, 2005). A atividade aumentada de AP-1 é necessária para a indução de membros chave da família das metaloproteinases, as quais são responsáveis pela degradação de colágeno e fibras elásticas na pele. Além de AP-1 ser a principal força condutora da expressão de metaloproteinases de matriz em queratinócitos e fibroblastos de pele, induzindo a transcrição das mesmas, esse fator de transcrição também tem demonstrado inibir a expressão gênica de procolágeno tipo I, pela ligação direta em sítios de regulação negativa de promotores de genes de colágeno (KIM et al., 2005; XU; FISHER, 2005).

As metaloproteinases da matriz (MMP) são uma família de endopeptidases dependentes de zinco capazes de degradar estruturas protéicas como colágeno, elastina e outras proteínas presentes na ECM. Baseado em similaridades estruturais e especificidade ao substrato, as MMPs são divididas em sub-classes, incluindo collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases entre outras (LAHMANN et al., 2004; VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006). Em humanos há três collagenases distintas: MMP-1 (colagenase 1 ou colagenase intersticial), MMP-8 (colagenase 2 ou colagenase de neutrófilos) e MMP-13 (colagenase 3). A MMP-1 é expressa por queratinócitos e fibroblastos no *turnover* normal do colágeno e remodelamento da matriz durante a cicatrização de feridas. A MMP-8 é expressa, predominantemente por neutrófilos e liberada durante processo inflamatório. MMP-13 é expressa em vários cânceres epiteliais e por fibroblastos em úlceras cutâneas crônicas, mas diferentemente de MMP-1, não é expressa por queratinócitos ou fibroblastos durante a cicatrização (FISHER et al., 1996; FISHER et al., 2001). Sob condições fisiológicas normais, as MMPs ativadas são controladas por inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) e são geralmente expressas em baixas concentrações. No entanto, os níveis de algumas destas MMPs podem ser elevados rapidamente quando o tecido é submetido à radiação UV, durante a inflamação, a cicatrização de feridas e câncer no estágio de progressão (FISHER et al., 1997; ZUCKER et al., 2003).

Figura II.9. Esquema simplificado das vias de sinalização NF- κ B (A) e da MAP quinase (B), importantes vias do processo inflamatório. Arte elaborada pela autora.

A RUV induz aumento nos níveis de RNAm, de proteína e atividade enzimática de pelo menos três MMPs. São elas: MMP-1, que degrada fibras de colágeno tipo I e III, MMP-3 (estromelina-1) que degrada colágeno tipo IV e MMP-9 (gelatinase-B) que degrada fragmentos de colágeno gerados por MMP-1. Juntas, estas MMPs têm a capacidade de degradar a maior parte das proteínas estruturais que compõe o tecido conectivo dérmico. Inicialmente, MMP-1 cliva as moléculas tripla hélice de colágeno em fragmentos de $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ de comprimento e estes são então clivados em fragmentos menores pelas MMPs 3 e 9. Essa degradação resulta em acúmulo de fragmentos de fibras de colágeno que comprometem a integridade estrutural da ECM (FISHER et al., 2001; XU; FISHER, 2005). A MMP-1, dentre as enzimas capazes de degradar o colágeno presente na pele, é a que apresenta maior atividade enzimática, além de ser extensivamente induzida pela exposição à RUV (BRENNAN et al., 2003).

Assim, a exposição crônica à RUV altera a composição e arquitetura da ECM da derme, resultando em alterações tanto clínicas como histológicas na pele humana (Figura II.10). Alterações clínicas incluem perda de tônus e elasticidade, aumento da aspereza, pigmentação irregular e enrugamento profundo da pele. Histologicamente, a pele com danos decorrentes da exposição à radiação solar apresenta alterações qualitativas e quantitativas no tecido conectivo dérmico. Estas incluem além de danos nas fibras elásticas, no colágeno e nas glicosaminoglicanas da ECM da derme, um acúmulo de material amorfo elástico, condição esta denominada elastose (FISHER et al., 2001; LAHMANN et al., 2001; WANG; KOCHEVAR, 2005).

Figura II.10. Principais danos causados na pele devido à exposição crônica à RUV. Modificado de <www.doctor-hill.com/mesa-arizona/obagi_arizona.htm>. Arte final elaborada pela autora.

II.1.3. Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa

O animal mais comumente utilizado em estudos de fotoquimioprevenção é o camundongo albino sem pelo de cepa *Skh-hairless-1* (BENAVIDES et al., 2009). Durante os primeiros dias de vida, o camundongo apresenta pelagem normal, que começa a cair por volta do décimo terceiro dia pós-natal até a terceira semana de vida do animal, quando há perda total dos pelos ao longo de praticamente toda a extensão do corpo, restando somente as vibrissas. Diferentemente do animal *nude*, o camundongo sem pelos não apresenta deficiências imunológicas (PANTELEYEV et al., 1999; CHORILLI, 2007). A pele do camundongo sem pelos (Figura II.11) possui aparência rugosa e essa rugosidade aumenta com o decorrer do tempo. A pele do macho e da fêmea é similar, porém o macho possui a epiderme mais espessa e a hipoderme mais fina (MONTAGNA et al., 1954; BENAVIDES et al, 2009).

O fácil manuseio da pele e a rápida visualização de efeitos nesses animais permite estudos que utilizam aplicações de agentes tópicos, acompanhamento do processo de cicatrização de lesões e respostas agudas ou crônicas por exposição à RUV. A pele do camundongo sem pelos, quando submetida às radiações solares, apresenta alterações morfológicas comparáveis às da pele de humanos, como aumento da espessura epidérmica, hiperplasia da glândula sebácea, dos cistos dérmicos, aumento na síntese de glicosaminoglicanas e infiltrado de células inflamatórias na derme (BENAVIDES et. al, 2009).

Além da questão ética, uma desvantagem desse modelo para estudo de fotoquimioprevenção e fotocarcinogênese é a ausência de melanócitos na pele dos camundongos, células que produzem melanina, uma substância que pigmenta a pele e auxilia na proteção celular contra a radiação solar (KLIGMAN, 1996).

Figura II.11. Aspecto macroscópico da pele de um camundongo adulto jovem sem pelos (quatro meses de vida). Destaque para o aspecto da pele naturalmente rugosa. Retirado de Hossy (2012).

Por outro lado, a utilização de animais em pesquisa, principalmente de mamíferos, tem trazido discussões acaloradas por parte da sociedade e da própria comunidade científica. O uso de animais para testes é uma prática que aos poucos vem sendo abolida em todo o mundo. Já é lei em países da União Européia, que proibiu também as importações de todos os produtos testados em animais. Esse fato, aliado a necessidade de comprovar a inocuidade e a eficácia de produtos cosméticos e dermatológicos de uso tópico tem levado a um crescente interesse na busca por métodos alternativos ao uso de animais. Segundo o Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM, do inglês *European Centre for the Validation of Alternative Methods*), um método alternativo é qualquer método utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em experimentação científica. W. M. S. Russel e R. L. Burch em seu livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, publicado pela primeira vez em 1959, estabeleceram três tipos de métodos alternativos: o de redução, que obtém um nível comparável de informações com o uso de menor número de animais por experimento, ou mais informações utilizando o número original de animais; o de refinamento, que visa o alívio ou a diminuição da dor, estresse e sofrimento dos animais; e o de substituição, que permite a obtenção de um resultado comparável sem a utilização de animais vertebrados (PURCHASE et al, 1998). Esses três tipos de métodos alternativos são referidos como “os três Rs” (*The three Rs – Reduction, Refinement and Replacement*).

Como já mencionado, na pesquisa de novos agentes fotoquimiopreventivos, da eficácia de protetores solares, da reação de substâncias frente à radiação solar, e da etiologia dos cânceres de pele, o modelo atualmente aceito para avaliação dessas atividades é exposição de camundongos sem pelos à RUV (GRUIJL; FORBES, 2005). Entretanto, nesse tipo de experimento os camundongos sofrem dor intensa, apresentando eritema e desenvolvimento de cânceres de pele como observado na Figura II.12.

Figura II.12. Camundongos sem pelos expostos cronicamente à RUV (A) e à RUV mais tratamento com arsênico (B), apresentando desenvolvimento de carcinoma esquamoso. Retirado de Burns et al. (2004).

A busca de métodos alternativos para experimentos agressivos como é o caso da irradiação de camundongos sem pêlos tem levado ao desenvolvimento de técnicas como cultura celular, cultura com mais de um tipo celular, cultura de pele reconstruída e cultura de biópsia de pele (CROCE, 1999).

A cultura de células é uma importante ferramenta de estudo em que se pode investigar as interações específicas que ocorrem em nível celular. As células cultivadas podem crescer e sobreviver mais facilmente que os tecidos adultos. Elas são obtidas pela desagregação enzimática ou mecânica de um pedaço de tecido ou pela migração espontânea de um explante (PIZZOFERRATO et al., 1994). As células cultivadas *in vitro* mantêm suas características e funções originais. Porém, a cultura de células da pele não é um modelo apropriado para a investigação dos eventos biológicos após exposição à RUV, pois não reproduzem certas condições fisiológicas como, por exemplo, a diferenciação da epiderme ou as interações célula-matriz. Além disso, a cultura de células não pode ser usada para a avaliação de compostos insolúveis em meio aquoso e formulações semi-sólidas (VIOUX-CHAGNOLEAU et al. 2006).

Outro modelo utilizado é o de pele reconstruída *in vitro*, que é baseado na proliferação de queratinócitos normais em uma epiderme diferenciada e multiestratificada sobre uma base dérmica. São dois os modelos utilizados para a avaliação de produtos de uso tópico: os que compreendem apenas a camada epidérmica reconstruída (ausência de derme viva) e os modelos de pele reconstruída completa (epiderme e derme viáveis) (AUXENFANS et al., 2009).

Os modelos de epiderme reconstruída obtidos em escala industrial provêm da cultura dos queratinócitos humanos. O suporte dessas culturas pode ser uma derme morta desepidermizada (modelo de Pruniéras), uma membrana colagênica (modelo EPISKIN®) ou constituída de proteoglicanas (modelo de Boyce e Damour) ou mesmo uma membrana artificial (modelos SkinEthic® ou MatTeK®). Já os modelos de pele reconstruída compreendem uma epiderme com a mesma natureza e as mesmas propriedades que as da epiderme reconstruída, porém a camada dérmica é constituída de fibroblastos viáveis (AUXENFANS et al., 2009).

Os modelos de pele reconstruída diferem entre si de acordo com o modo de preparo da camada dérmica e a utilização ou não de suportes matriciais. Desenvolvido há 35 anos por Bell et al. (1979), o modelo mais antigo de pele reconstruída possui sua camada dérmica constituída por uma mistura de fibroblastos em gel de colágeno. A resistência e a insolubilidade do colágeno são obtidas através retração do gel pelos

fibroblastos, originando o equivalente dérmico. Esse é o modelo de pele reconstruída mais estudado, sendo que melanócitos, células de Langerhans, células endoteliais e folículos pilosos já foram incorporados a esse modelo com sucesso. Esse modelo é encontrado comercialmente com o nome de Apligraf® (Organogenesis Inc., EUA), cujo equivalente dérmico foi desenvolvido combinando-se fibroblastos obtidos de prepúcio humano com um gel de colágeno extraído a partir de tendão bezerro e epidermizado com queratinócitos provenientes de cultura alogênica (FALANGA; SABOLINSKI, 1999)

Outro modelo de pele reconstruída é aquele que utiliza diferentes materiais sintéticos ou biológicos, sob a forma de esponjas ou suportes matriciais para o desenvolvimento do equivalente dérmico em cujo os fibroblastos são semeados. Muitos polímeros sintéticos biocompatíveis, biodegradáveis ou não, podem ser usados e são classificados quanto sua estrutura (poroso, rede ou camada) ou sua composição (nylon, ácido poliglicólico, ácido poli-L-láctico, óxido de polietileno, polibutileno de tereftalato) (COOPER et al., 1991). O suporte matricial à base de colágeno é o mais estudado e foi o primeiro a ser utilizado para reconstruir um equivalente dérmico. O suporte matricial é obtido por liofilização de um componente da matriz formado por co-precipitação entre os colágenos bovinos tipos I e II e condroitina sulfato. O glutaraldeído é introduzido como agente reticulante, formando ligações covalentes com grupos aminas presentes no colágeno e o suporte matricial é coberto por um filme de silicone que age como uma pseudo epiderme temporária. Os fibroblastos são então semeados e iniciam a síntese de diversos componentes da ECM, o que por consequência remodela o suporte matricial original e gera uma camada semelhante a derme humana *in vivo* que é posteriormente epidermizada (YANNAS et al., 1980). O primeiro modelo de pele reconstruída utilizando suporte matricial à base de colágeno foi desenvolvido por Boyce (1988) e pode ser encontrado comercialmente sob o nome de Permaderm® (Cambrex, EUA). Outro modelo importante é o Mimeskin® (BASF, Alemanha), cujo equivalente dérmico é constituído de um suporte matricial à base de colágeno, glicosaminoglicanas e quitosana, desenvolvido com o intuito de avaliar a toxicidade cutânea e a fototoxicidade para a seleção de novas moléculas com propriedades fotoprotetoras frente à RUV e para avaliar a eficácia de produtos cosméticos de uso tópico (AUGUSTIN; COLLOMBEL; DAMOUR, 1997; AUGUSTIN et al., 1997). No Brasil, esse modelo pode ser representado pela pele reconstruída desenvolvida pelas pesquisadoras Maria Beatriz Puzzi e Jussara Rehder da UNICAMP (Patente número PI0301418-5 depositada em 14/05/2003), que vem sendo aplicada desde então para estudos de regeneração tecidual (LADEIRA, 2012).

A aplicação dos dois modelos supracitados em estudos de fotoquimioprevenção é comprometida pela fraca função de barreira do estrato córneo destes, visto que há menos camadas de estrato córneo e menos descamação que o normal (BACQUEVILLE; MAVON, 2009). O terceiro e mais recente modelo de pele reconstruída, pode ser visualizado na Figura II.13, e lança mão da técnica de “auto-arranjo” (*self-assembly technique*) uma nova abordagem em engenharia de tecidos desenvolvida no *Laboratoire d'Organogénèse EXpérimental* (LOEX, cidade do Quebec, Canadá) (L'HEUREUX et al., 1998). Esta técnica se baseia na propriedade intrínseca das células para organizar um tecido tridimensional sob condições adequadas. Por exemplo, os fibroblastos da pele secretam sua própria ECM na presença de ácido ascórbico, permitindo a produção de folhetos dérmicos que servem de suporte sobre o qual os queratinócitos são semeados (MICHEL et al. 1999). Para ser efetivo, o modelo de pele reconstruída deve mimetizar a estrutura da pele humana e, conseqüentemente a quantidade de material exógeno deve ser reduzida ao máximo. A técnica de “auto-arranjo” permite a produção de equivalentes de pele destituídos de proteínas de ECM exógenas e materiais sintéticos, o que elimina também os riscos de a pele reconstruída provocar reações imunológicas ou produtos de degradação nocivos, caso a pele seja produzida com o objetivo de transplantá-la a um paciente. Outra vantagem deste método, é a possibilidade de utilizar células do próprio paciente (modelo autólogo) para a produção do equivalente de pele (AUGER, et al., 2004; AUXENFANS et al., 2009). Até o momento, não há relatos na literatura sobre a aplicação deste modelo de pele reconstruída para avaliação da atividade fotoquimiopreventiva de produtos de uso tópico.

Figura II.13. Corte histológico da pele reconstruída obtida pela técnica de “auto-arranjo” cultivada por 21 dias em interface ar-líquido. Coloração de tricrômico de Masson. Aumento de 40 vezes. Modificado de Jean, Garcia-Pérez e Pouliot (2011). Arte final elaborada pela autora.

Para a produção desse modelo de pele reconstruída, os fibroblastos são cultivados na presença de ácido ascórbico por quatro semanas, gerando folhetos que são sobrepostos e posteriormente incubados para formar o equivalente dérmico. Em seguida, os queratinócitos são semeados para formar a camada epidérmica. Após 7 dias de cultivo, o substituto é elevado a uma interface ar-líquido que permite a diferenciação da epiderme, originando o estrato córneo. A espessura da epiderme varia em função do tempo de cultura enquanto que a espessura dérmica varia de acordo com o número de folhetos de fibroblastos sobrepostos (geralmente de dois a quatro). A maior desvantagem do modelo de pele reconstruída por “auto-arranjo” é seu demorado tempo de produção, necessitando de cerca de três meses em cultura para poder ser utilizada na clínica ou na pesquisa (MICHEL et al. 1999).

Esse modelo de pele reconstruída compartilha diversas características histológicas e bioquímicas com aquelas encontradas na pele humana *in vivo*. O equivalente epidérmico é bem diferenciado apresentando todas as camadas encontradas *in vivo*, incluindo um estrato córneo com organização lipídica bem estruturada. Estudos espectroscópicos demonstraram que esse modelo de pele reconstruída possui frequências mais baixas em bandas CH₂ quando comparadas a modelos de pele que utilizam colágeno como material exógeno, e frequências mais elevadas em comparação com a pele humana *in vivo*. As frequências mais altas em bandas CH₂ são geralmente indicativas de conformação *cis*, característica de sistemas desordenados, enquanto que bandas em frequências mais baixas estão associadas à presença de conformação *trans*, o que caracteriza um sistema ordenado. Os resultados determinam o grau de organização lipídico no estrato córneo e podem ser resumidos como se segue, do menos para o mais organizado: modelos de pele que utilizam colágeno < modelos de pele reconstruída por “auto-arranjo” < pele humana *in vivo* (BERNARD et al., 2007). No que concerne a permeabilidade desse modelo de pele, resultados obtidos por análises de absorção percutânea demonstraram que seu perfil de permeabilidade para moléculas lipofílicas é próximo aquele observado para pele humana *in vivo*. Estudos avaliando a expressão de marcadores de proliferação, diferenciação, dermo-epidérmicos e extracelulares também comprovaram a semelhança entre o modelo de pele reconstruída por “auto-arranjo” e a pele humana *in vivo*: as duas expressam a) involucrina e loricrina nas camadas espinhosa e granulosa da epiderme, respectivamente; b) mesmo padrão de expressão dérmica de colágenos tipo I e III; c) mesmos marcadores da junção dermo-epidérmica, como laminina V e colágeno tipo VII (para revisão, consultar JEAN; GARCIA-PÉREZ; POULIOT, 2011).

Outro modelo interessante alternativo ao uso de animais é a cultura de pele humana obtida de biópsias, que se caracteriza pelo cultivo de fragmentos de pele coletados com *punch* de biópsia ou bisturi, incubados em placas com meio de cultura em temperatura semelhante à corpórea, mimetizando as condições do organismo vivo (BANSAL et al., 2009). Na cultura de biópsia de pele humana, os queratinócitos permanecem totalmente diferenciados, o estrato córneo exerce sua função perfeitamente e a aplicação de formulações semi-sólidas é semelhante àquela na pele *in vivo* (BACVALL et al., 2002). Esse modelo permite submeter fragmentos de órgãos do mesmo doador a diversos tratamentos, controlando as condições ambientais às quais o tecido é submetido. De acordo com Bacvall et al. (2002), este modelo é uma ótima opção para o estudo de filtros solares e compostos fotoquimiopreventivos. Porém, uma das maiores limitações do modelo é a viabilidade celular do tecido em relação ao tempo de incubação: Steinstraesser e colaboradores (2009) demonstraram que a biópsia de pele humana pode ser mantida em cultura por aproximadamente 14 dias com suas características morfológicas e bioquímicas inalteradas. Após o décimo quarto dia, ocorrem diversas modificações, visualizados na Figura II.14, que culminam na degradação exacerbada da epiderme no vigésimo oitavo dia, a saber: a) do ponto de vista morfológico, a camada epidérmica apresenta sua organização estrutural, dimensão e densidade celular reduzidos, com aparecimento de queratinócitos fusiformes na camada basal e presença de lacunas na junção dermo-epidérmica da pele; b) dentre as mudanças bioquímicas tem-se a distribuição de queratinócitos positivos para Ki-67, um marcador de proliferação celular, por todas as camadas da epiderme, enquanto que tais queratinócitos deveriam estar presentes unicamente na camada basal da epiderme (indicativo de uma epiderme saudável); c) no mesmo intervalo de tempo, o número de células positivas para caspase-3 aumentaram seus níveis de distribuição atingindo toda a camada epidérmica (indicativo de apoptose) (STEINSTRAESSER et al., 2009). Tais resultados sugerem que esse modelo não pode ser utilizado para estudos crônicos de exposição à RUV. Outra limitação do modelo é que a aquisição das biópsias de pele fica condicionada a frequência de cirurgias ao longo do ano e, caso o modelo seja utilizado em estudos de fotoquimioprevenção, a pele deve ser proveniente de regiões não expostas à radiação solar, como abdômen e mamas, preferencialmente de indivíduos com pele do tipo I ao III.

Figura II.14. Corte histológico da biópsia de pele humana em cultura por 28 dias. Primeira linha de imagens: secções transversais coradas com hematoxilina-eosina mostram que após o décimo quarto dia a camada epidérmica apresenta comprometimento em sua organização estrutural. Aumento de 5 vezes. Segunda linha de imagens: coloração imunohistoquímica do marcador de proliferação Ki-67 (em verde, cabeça de seta branca) e núcleos celulares (em azul). No sétimo dia as células marcadas para Ki-67 se concentram na camada basal. Nos dias 14, 21, e 28, o sinal ficou mais amplamente distribuído, estando presente em todas as camadas da epiderme. Aumento de 20 vezes. Terceira linha de imagens: coloração imunohistoquímica do marcador de apoptose caspase-3 (em azul turquesa intenso) e núcleos celulares (em azul). Catorze dias após o início do experimento, pode-se visualizar as primeiras células apoptóticas no estrato basal. Durante as semanas seguintes (21 e 28 dias), houve um aumento na intensidade de coloração em toda a camada epidérmica. Aumento de 20 vezes. Retirado e modificado de Steinstraesser et al. (2009).

Diante disso, fica a questão se as técnicas *in vitro* realmente podem reduzir ou substituir o uso de animais em pesquisa e prover resultados relevantes e efetivos para melhoria da saúde humana. Para assegurar que os resultados obtidos utilizando um modelo *in vitro* sejam comparáveis ao modelo *in vivo*, a ECVAM preconiza a avaliação experimental do novo modelo, com comprovação da reprodutibilidade dos resultados, o que, conseqüentemente, gera uma base consistente para a adoção deste pela comunidade científica.

Imagem disponível em < www.phdcomics.com >, acessado em 01/08/2014. "Piled Higher and Deeper" by Jorge Cham.

Referências

- AFANAS'EV, J. B.; DOROZHKO, A. J.; BRODSKILL, A. V.; KOSTYUK, V. A.; PATAPOVITCH, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v. 38, p. 1763-1769, 1989.
- AFAQ, F.; SALEEM, M.; KRUEGER, C. G.; REED, J. D. MUKHTAR, H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- κ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. **International Journal of Cancer**, v. 113 (3), p. 423-433, 2005.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific Journal Clinical Nutrition**, v. 8, (1), p. 53-63, 1999.
- ASSEFAA, Z.; VAN LAETHEM, A.; GARMYN, M.; AGOSTINIS, P. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: On the role of cytosolic factors. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1755, p. 90-106, 2005.
- AUGER, F. A.; RÉMY-ZOLGHADRI, M.; GRENIER, G.; GERMAIN, L. The Self-Assembly Approach for Organ Reconstruction by Tissue Engineering. **e-biomed: The Journal of Regenerative Medicine**, v. 1(5): p. 75-86, 2004.
- AUGUSTIN, C.; COLLOMBEL, C.; DAMOUR, O. Use of dermal equivalent and skin equivalent models for identifying phototoxic compounds in vitro. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*; v. 13, p. 27-36. 1997.
- AUGUSTIN, C.; FREI, V.; PERRIER, E.; HUC, A.; DAMOUR, O. A skin equivalent model for cosmetological trials: an in vitro efficacy study of a new biopeptide. **Skin Pharmacology**, v.10, p. 63-70, 1997.
- AUXENFANS, C.; FRADETTE, J.; LEQUEUX, C.; GERMAIN, L.; KINIKOGLU, B.; BECHETOILLE, N.; BRAYE, F.; AUGER, F. A. DAMOUR, O. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *European Journal Dermatology*; v. 19 (2), p. 107-113, 2009.
- AZULAY, R.; AZULAY, D. **Dermatologia**. (1999) Editora Guanabara Koogan, 2ª ed., Rio de Janeiro, RJ, 16-39
- AZULAY, R.; AZULAY, D. **Dermatologia**. (2008) Editora Guanabara Koogan, 5ª ed., Rio de Janeiro, RJ, 20-39
- BABY, A. R., HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A., SARRUF, F. D., TAVANTE-JÚNIOR, C. R. PINTO, C. A. S. O., ZAGUE, V., ARÊAS, E. P. G., KANEKOI, T. M., VELASCO, M. V. R. Stability and in vitro penetration study of rutin incorporated in a cosmetic emulsion through an alternative model biomembrane. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**. v.44 (2), p. 233-248, 2008.
- BACKVALL, H.; WASSBERG, C.; BERNE, B.; PONTEN, F. Similar UV responses are seen in a skin organ culture as in human skin *in vivo*. **Experimental Dermatology**, v. 11, p. 349-356, 2002.
- BACQUEVILLE, D. MAVON, A. Comparative analysis of solar radiation-induced cellular damage between ex vivo porcine skin organ culture and in vitro reconstructed human epidermis. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, 4, p. 293-302, 2009.

- BANSAL, D.; AVE, P.; KERNEIS, S.; FRILEUX, P.; BOCHÉ, O.; BAGLIN, A. C.; DUBOST, G.; LEGUERN, A. S.; PREVOST, M. C.; BRACHA, R.; MIRELMAN, D.; GUILLE, N. N.; LABRUYE, R. E. An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, (11), p. 1-11, 2009.
- BECHETOILLE, N.; BRAYE, F.; AUGER, F. A. DAMOUR, O. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. **European Journal of Dermatology**, v. 19 (2): p. 107-113, 2009.
- BELL, E.; EHRLICH H. P.; SHER S.; MERRILL, C.; SARBER, R.; HULL, B.; NAKATSUJI, T.; CHURCH, D.; BUTTLE, D. J. Development and use of a living skin equivalent. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 67: p. 386-392, 1981.
- BELLEMARE, J.; ROBERGE, C. J. BERGERON, D. LOPEZ-VALLE, C. A. ROY, M. MOULIN, V. J. Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. **Journal of Pathology**, v. 206, p. 1-8, 2005.
- BENAVIDES, F.; OBERYSZYN, T. M.; VANBUSKIRK, A. M.; REEVE, V. E.; KUSEWITT, D. F. The hairless mouse in skin research. **Journal of dermatology Sciences**, v. 53 (1), p. 10-18, 2009.
- BERNARD, G.; AUGER, M.; SOUCY, J.; POULIOT, R. Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 1317-1323, 2007.
- BHATTACHARYYA, S.; MAJHI, S.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Chlorogenic acid-phospholipid complex improve protection against UVA induced oxidative stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* v.130, p. 293-298, 2014.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 26 (4617), p. 1199-1200, 1958.
- BOATRIGT K. M, SALVESEN G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p.725-31, 2003.
- BOELSMA, E.; GIBBS, S.; FALLER, C.; PONEC, M. Characterization and Comparison of Reconstructed Skin Models: Morphological and Immunohistochemical Evaluation. **Acta Dermato Venereologica**, v. 80, p. 82-88, 2000.
- BOUWSTRA, J. A.; P. HONEYWELL-NGUYENA, GOORIS, L. G. S. PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 1-36, 2003.
- BOYCE, S. T.; MICHEL, S.; REICHERT, U.; SCHROOT, B.; SCHMIDT, R. Reconstructed skin from cultured human keratinocytes and fibroblasts on a collagen-glycosaminoglycan biopolymer substrate. **Skin Pharmacology**, v. 3, p. 136-143, 1990.
- BOYER, J; LIU, R. H. Apple phytochemicals and their health benefits. **Nutrition Journal**, v.12, p. 3-5 2004.
- BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 78, p. 206-209, 1982.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- BRENNAN, M.; BHATTI, H.; NERUSU, K. C.; BHAGAVATHULA, N.; KANG, S.; FISHER, G. J.; VARANI, J.; VOORHEES, J. J. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, (1), p.43-48, 2003.
- BRENNER, M. HEARING, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 539–549, 2008.
- BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Cell And Developmental Biology**, v. 15, p. 269-290, 1999.
- BURNS, F. J.; UDDIN, A. N.; WU, F.; NÁDAS, A.; ROSSMAN, T. G. Arsenic-Induced Enhancement of Ultraviolet Radiation Carcinogenesis in Mouse Skin: a dose–Response Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 112 (5), p. 599–603, 2004.
- CAMOUSE, M. M.; DOMINGO, D. S.; SWAIN, F. R.; CONRAD, E. P.; MATSUI, M. S.; MAES, D.; DECLERCQ, L.; COOPER, K. D.; STEVENS, S. R.; BARON, E. D. Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. **Experimental Dermatology**, v. 18, p. 522-526, 2009.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI J. R.; WALDICEU, A.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F V; FONSECA, M. J. V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183-190, 2007.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; DORTA, D. J.; DOS SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 84, p. 21-27, 2006.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **Journal of chromatography B**, Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.
- CETKOVIC, G.; CANADANOVIC-BRUNET, J.; DJILAS, S.; SAVATOVIC, S.; MANDIC, A.; TUMBAS, V. Assessment of polyphenolic content and *in vitro* antiradical characteristics of apple pomace. **Food Chemistry**, v. 109, p. 340–347, 2008.
- CHAUDIEÉRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37 p. 949-962, 1999.
- CHOI, K-S.; KUNDU, J. K.; CHUN, K-S.; NA, H-K.; SURH, Y-J. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559 p. 38–45, 2014.
- CHOPRA, S.; MOTWANI, S. K.; IQBAL, Z.; TALEGAONKAR, S.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K. Optimisation of polyherbal gels for vaginal drug delivery by Box-Benhken statistical design. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.67, p. 120-131, 2007.

- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, p. 805–817, 2013.
- CLAERHOUT, S.; LAETHEM, A. V.; AGOSTINIS, P.; GARMYN, M. Pathways involved in sunburn cell formation: deregulation in skin câncer. **Photochemical Photobiological Sciences**, v. 5, p. 199–207, 2006.
- COLOMBARI, R. R. Aplicação de delineamento de experimentos para o processo de solda à projeção. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2004.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal Nutritional Biochemistry**, v.7, (2), p.66-76, 1996.
- COOPER, M. L.; HANSBROUGH, J. F.; SPIELVOGEL, R. L.; COHEN, R.; BARTEL, R. L.; NAUGHTON, G. In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. **Biomaterials**, v.12, p. 243-248, 1991.
- CROCE, P.; (1999). **Vivisection or Science? An investigation into testing drugs and safeguarding health**. New York: Zed Books.
- DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**. 2ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- DAVIS P. A.; POLAGRUTO J. A.; VALACCHI, G.; PHUNG, A.; SOUCEK, K.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Effect of apple extracts on NF-kappaB activation in human umbilical vein endothelial cells. **Experimental Biology Medicine**, v. 231, p. 594–8, 2006.
- DE ANGELIS, I.; GIUBILEI, L.; STAMMATI, A.; ZAMPAGLIONI, F.; ZUCCO, F.;
- DE GRUIJL, F. R.; FORBES, P. D. UV-induced skin cancer in a hairless mouse model. **Bioessays**, v. 17 (7), p. 651-60, 1995.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214–219, 1980.
- DEL CASTILLO, E.; MONTGOMERY, D. C. MCCARVILLE, D. R. Modified desirability functions for multiple responde optimization. **Journal of Quality Technology**, v. 28 (3), p. 337-345, 1996.
- DIMAMBRO V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. V. 37, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 287-295, 2005.
- DJAVAHERI-MERGNY, M.; MERGNY, J. L.; BERTRAND, F.; SANTUS, R.; MAZIÈRE, C.; DUBERTRET, L.; MAZIÈRE, J. C.; Ultraviolet-A induces activation of AP-1 in cultured human keratinocytes. **FEBS Letters**, v. 384, p. 92-96, 1996.
- EMANUEL, P.; SCHEINFELD N. A. review of DNA repair and possible DNA-repair adjuvants and selected natural anti-oxidants. **Dermatology Online Journal**, v. 13 (3), 10, 2007.
- FALANGA, V.; SABOLINSKI, M. A bilayered living skin construct (APLIGRAF) accelerates complete closure of hard-to-heal venous ulcers. **Wound Repair Regen** v. 7, p. 201-207, 1999.
- FEARON E. R.; GRUBER S. B. (2001) **Molecular abnormalities in colon and rectal cancer**. Philadelphia: W. B. Saunders.

- FERREIRA, A. K. Alquil fosfato sintético precursor dos fosfolipídios de membrana celular com potencial efeito antitumoral e apoptótico em modelos de tumores experimentais. São Paulo: Doutorado (Tese). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43 (1), p. 61-81, 1997.
- FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: Na alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179-186, 2007.
- FISCHER, F.; VOLKMER, B.; PUSCHMANN, S.; GREINERT, R.; BREITBART, W.; KIEFER, J.; WEPF, R. Risk estimation of skin damage due to ultrashort pulsed, focused near-infrared laser irradiation at 800 nm. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13 (4), p. 041320-1-041320-8, 2008.
- FISHER, G. J. DATTA, S. C.; TALWAR, H. S. WANG, Z-Q.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. The molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoic antagonism. **Nature**, London, v. 379, p. 335-338, 1996.
- FISHER, G. J.; WANG, Z-Q.; DATTA, S. C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 337, p. 1419-1428, 1997.
- FISHER, G.J.; CHOI, H.C.; BATA-CSORGO, Z.; SHAO, Y.; DATTA, S.; WANG, Z. Q.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin *in vivo*. **The Journal of Investigative Dermatology**, Cambridge, v.117 (2), p. 219-226, 2001.
- FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1035-1040, 1999.
- FONSECA, Y. M., CATINI, C. D., VICENTINI, F. T. M. C., CARDOSO, J. C. DE ALBUQUERQUE, R. L. C.; FONSECA, M. J. V. Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 100 (6), p. 2182–2193, 2011.
- FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T.M.C.; NOMIZO, A.; GERLACH, R. F.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of Calendula officinalis extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127 (3), p. 596–601, 2010.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1203–1209, 1998.
- FUCHS, J.; PACKER, L. Photooxidative stress in the skin. In: **Oxidative Stress – Oxidants and antioxidants**. London:SIES H.(ed) Academic Press, 1991, p.559-583.
- GALVEZ, J.; DE LA CRUZ, J. P.; ZARZUELO, A.; SANCHEZ DE LA, C. F. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, v. 51, p. 127-133, 1995.

- GASPAR L. R., MAIA, CAMPOS P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.
- GERHAUSER, C. Cancer Chemopreventive Potential of Apples, Apple Juice, and Apple Components. **Planta Medica**. v. 74, p 1608–1624, 2008.
- GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M. C. W.; GORENSTEINA, C.; SCAVONE, C. The role of the transcription factor NF-kB in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22 (1), p. 26-30, 2000.
- GOODMAN, M.F. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 17-50, 2002.
- GOTTLIEB, R. A. Mitochondrial and apoptosis. **Biological Signals and Receptors**, v. 10, p. 147-61, 2001.
- GRAZIANI, G.; ARGENIO, G. D.; TUCCILLO, C.; LOGUERCIO, C. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. **Gut**, v. 54, p. 193-200, 2005.
- GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-629, 2004.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA A. B. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53 (3), p. 335-343, 2007.
- GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. Q.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il Farmaco**, v. 56, p. 683-687, 2001.
- GUO, C.; STINE, K. J.; KAUFFMAN, J. F.; DUOB, W. H. Assessment of the influence factors on in vitro testing of nasal sprays using Box-Benhken experimental desing. **European Journal of pharmaceutical sciences**, v. 35, p. 417-426, 2008.
- HAHN, U.; RICE-EVANS, C. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3«-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. **Biochemical Journal**, v. 354, p. 493-500 2001.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. (2007) **Measurement of reactive species**. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, p.268–340.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (1990) **Free radicals in biology and medicine**, 3^{ed}, New York: Pergamon Press, p. 1-104.
- HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.
- HEO, M. Y.; KIM, S. H.; YANG, H. E.; LEE, S. H.; JO, B. K.; KIM, H. P. Protection against ultraviolet B- and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the flowers of *Prunus persica* extract. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 496, p. 47-59, 2001.
- HIRAYAMA, O.; TAKAGI, M.; HUKUMOTO, K.; KATOH, S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, v. 247, p. 237-241, 1997.

- HISSIN, P. J.; HILF, R. A. A fluorometric method for determination of oxidized and
- HOESEL B.; SCHMID J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and câncer. **Molecular Cancer**, v.12 (86), p. 1-15, 2013.
- HOSSY, B. H. Desenvolvimento de metodologia de avaliação de filtros solares: uma abordagem morfológica e molecular em camundongos *hairless*. Rio de Janeiro: Mestrado (Dissertação). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- HUSOY, T.; SYVERSEN, T.; JENSSEN, J. Comparisons of four *in vitro* cytotoxicity tests: the MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicology In Vitro**, v.7 (2), p.149-154, 1993.
- INAL, M. E.; KAHRAMAN, A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet A induce oxidative stress in rats. **Toxicology**, Amsterdam, v. 154, (1-3), p. 21-29, 2000.
- JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Functional Diversity and Regulation of Different Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK) Family Members. **Molecular Cell**, v. 11 (2), p. 293–302, 2003.
- JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENDLING, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 183-192, 2006.
- JEAN, J.; GARCIA-PÉREZ, M. E.; POULIOT, R. Bioengineered Skin: The Self-Assembly Approach. **Tissue Science & Engineering**, S 5, 01, 2011.
- JENKINSON, D. H.; BARNARD, E. A.; HOYER, D.; HUMPHREY, P. P. A.; LEFF, P.; SHANKLEY, N. P. Internacional union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. IX. Recommendations on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmaceutical Reviews**, v. 47 (2), p.255-266, 1995.
- JUNG, E.; LEE J.; HUH, S.; LEE J.; KIM, Y-S.; KIM, G.; PARK, D. Phloridzin-induced melanogenesis is mediated by the cAMP signaling pathway, **Food and Chemical Toxicology** v 47 (10), p. 2436–2440, 2009.
- KANAKIS, C. D.; NAFISI, S.; RAJABI, M.; SHADALOI, A.; TARANTILIS, P. A.; KATALINIĆ, M.; RUSAK, G.; BAROVIĆ, J. D.; ŠINKO, G.; JELIĆ, D.; ANTOLOVIĆ, R.; KOVARIK, Z. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 45 (1), p. 186–192, 2010.
- KATTIYAR, S. K.; ELMETS, C. A. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection (Review). **International Journal of Oncology**, p.1307-1313, 2001.
- KATTIYAR, S. K.; PEREZ, A.; MUKHTAR, H. Green teapolyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p.3864–3869, 2000.
- KLIGMAN, H. L. The Hairless Mouse Model for Photoaging. **Clinics in Dermatology**, v.14, p. 183-195, 1996.
- KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v. 148, p.149-157, 2000.
- KOJIMA, T., AKIYAMA, H., SASAI, M., TANIUCHI, S., GODA, Y., TOYODA, M., KOBAYASHI, Y. Anti-allergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: A pilot study. **Allergy International**, v. 49, p. 69-73, 2000.

- KOOTSTRA, A. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. **Plant Molecular Biology**, v. 26 (2), p. 771-774, 1994.
- KUSUMOTO, I. T.; NAKABAYASHI, T.; KIDA, H.; MIYASHIRO, H.; HATTORI, M.; NAMBA, T.; SHIMOTOHNO, K. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) protease. **Phytotherapy Research**, v.9 (3), p.180-184, 1995.
- L'HEUREUX, N.; GERMAIN, L.; LABBÉ, R.; AUGER, F. A. In vitro construction of human vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. **Journal of Vascular Surgery**, v. 17, p. 499-509, 1993.
- LAETHEM, A. V.; CLAERHOUT, S.; GARMYN, M.; AGOSTINIS, P. The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 1547-1553, 2005.
- LAHMANN, C.; YOUNG, A. R.; WITTERN, K. P. BERGEMANN, J. Induction of mRNA for matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human skin *in vivo* by solar simulated radiation. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 73 (6), p. 657-663, 2001.
- LECCIA, M-T.; RICHARD, M-J.; JOANNY-CRISCI, F.; BEANI, J-C. UV-A1 cytotoxicity and antioxidant defence in keratinocytes and fibroblasts. **European Journal of Dermatology**, v. 8 (7), p. 478-482, 1998.
- LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77 (5), p. 1-8, 2002.
- LI, B.; BIRT, D. F. In vitro and in vivo percutaneous absorption of cancer preventive flavonoid apigenin in different vehicles in mouse skin. **Pharmaceutical Research**, v.13 (11), p.1710-1715, 1996.
- LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. Boca Raton: CRC Press, p.374, 1989.
- LUCINDA, L. M. F. Mecanismos de indução da apoptose por glicocorticóides e seus efeitos no câncer. Juiz de Fora: Monografia. Especialização em Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2009.
- MACHADO, H., Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.
- MADISON, K. C. Barrier function of the skin: “La Raison d’etre” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, p. 231-241, 2003.
- MAIA CAMPOS, P.; BADRA, M. V. L. Estudo da Estabilidade Física de Bases Dermatológicas Contendo Ésteres Fosfóricos **Aerosol & Cosméticos**, 1992.
- MALDONADO, M. E.; BOUSSEROUEL, S.; GOSSÉ, F.; LOBSTEIN, A.; RAUL, F. Implication of NF-kB and p53 in the expression of TRAIL-death receptors and apoptosis by apple procyanidins inhuman metastatic SW620 cells. **Biomédica**, vol. 30, (4), p. 577-586, 2010.

- MALLET, J. D.; ROCHETTE, P. J. Wavelength-dependent ultraviolet induction of cyclobutane pyrimidine dimers in the human cornea, **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 12, p. 1310–1318, 2013.
- MAN, M-Q.; LIN, T-K.; SANTIAGO, J. L.; CELLI, A.; ZHONG, L.; HUANG, Z-M.; ROELANDT, T.; HUPE, M.; SUNDBERG, J. P.; SILVA, K. A.; CRUMRINE, D.; MARTIN-EZQUERRA, G.; TRULLAS, C.; SUN, R.; WAKEFIELD, J. S.; WEI, M. L.; FEINGOLD, K. R.; MAURO, T. M.; ELIAS, P. M. Basis for Enhanced Barrier Function of Pigmented Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134 (9), p. 2399-2407, 2014.
- MARQUELE F. O.; FONSECA, Y. M.; GEORGETTI, S. R.; VICENTINI, F. T. M. C.; BRONZATI, V. C.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the antioxidant activity as an additional parameter to attain the functional quality of natural extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 27, p. 325-332, 2008.
- MARQUELE, F. D.; STRACIERI, K. M.; FONSECA, M. J. V.; FREITAS, L. A. P. Spray-dried propolis extract. I: Physicochemical and antioxidant properties. **Pharmazie** v. 61, p. 325–330, 2006.
- MARTINS, R. M.; SIQUEIRA, S.; MACHADO, M. O; FREITAS, L. A. P. The effect of homogenization method on the properties of carbamazepine microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Microencapsulation**, v. 30 (7), p. 692-700, 2013.
- MATSUI, M. S.; DELEO, V. A. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. **Cancer Cells**, v. 3 (1), p. 8-12, 1991.
- MEERAN, S. M.; AKHTAR, S.; KATTIYAR, K. Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.129, p. 1258–1270, 2009.
- MEERAN, S. M.; MANTENA, S. K.; ELMETS, C. A.; KATTIYAR, S. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate prevents photocarcinogenesis in mice through interleukin-12-dependent DNA repair. **Cancer Research**, v. 66, p. 5512–5520, 2006.
- MICHEL, M.; L'HEUREUX, N.; POULIOT, R.; XU, W.; AUGER, F. A. GERMAIN, L. Characterization of a new tissueengineered human skin equivalent with hair. *In vitro* **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 35, p. 318–326, 1999.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52 (4), p. 673–751, 2000.
- MINOTTI G.; AUST, S. D. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 71, p. 1-19, 1989.
- MIURA, T.; CHIBA, M.; KASAI, K.; NOZAKA, H.; NAKAMURA, T.; SHOJI, T.; KANDA, T.; OHTAKE, Y.; SATO, T. Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. **Carcinogenesis**, v. 29 (3), p. 585-593, 2008.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity .Songklanakarin. **Journal of Science Technology**, v. 26 (2) p. 211-219, 2004.
- MONTAGNA, W.; CHASE, H. B.; BROWN, P. J. The skin of hairless mice. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 23, p. 259-269, 1954.

- MORLEY, N.; CLIFFORD, T.; SALTER, L.; CAMPBELL, S.; GOULD, D.; CURNOW, A. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechingallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v.21, p. 15–22, 2005.
- MORLIERE, P.; MOYSAN, A.; SANTUS, R.; HUPPE, G.; MAZIERE, J.-C.; DUBERTRETL. UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1084, p. 261-268, 1991.
- MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.
- NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTAN, F., Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 989-993, 2008.
- NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, DANNY EC.; BOELENS,PETRA G.; VAN NORREN,K.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications1,2,3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p. 418-25, 2001.
- NISHIGORI, C. Cellular aspects of photocarcinogenesis, **Photochemical & Photobiological Science**, v. 5, p. 208 – 214, 2006.
- NORDLUNG, J. J.; BOISSY, R. E.; ACARING, V. J.; KING, R. A.; OETTING W. S.; NOROOZI, M, ANGERSON, W. J, LEAN, M. E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. **The american Journal of clinical nutrition**, p. 1210-1218, 1998.
- NOWAK, D. Hydrogen peroxide release from human polymorphonuclear leukocytes measured with horseradish peroxidase and o-dianisidine. Effect of various stimulators and cytochalasin B. **Biomedica Biochimica Acta**, 49 (5), p. 353-362, 1990.
- OHKAWA, H.; OSHINI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytica chimica**, Amsterdam, v. 95, p. 351-388, 1979.
- ORTONNE, J. P.; **The pigmentary system**. (2006) Blackwell Publishing - Oxford University Press, 2 ed., Reino Unido.
- PAGLIARA, A.; REIST, M. A.; GEINOZ, S.; CARRUPT, P.-A.; TESTA, B. Evaluation and Prediction of Drug Permeation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 1339-1357, 1999.
- PANTELEYEV, A. A. BOTCHKAREVA, N. V.; SUNDBERG, J. P.; CHRISTIANO, A. M.; PAUS, R. The Role of the Hairless (hr) Gene in the Regulation of Hair Follicle Catagen Transformation. **The American Journal of Pathology**, v. 155 (1), p. 159–171, 1999.
- PANTELEYVEV, A.; BOTCHKAREVA, N. V.; SUNDBERG, J. P.; CHRISTIANO, A. M.; PAUS, R. The role of the hairless (hr) gene in the regulation of hair follicle catagen transformation. **American Journal of Pathology**, v. 155, p. 159-171, 1999.
- PASCUAL, C.; GONZALEZ, R.; TORRICELLA, R. G. Scavenging action of propolis extract against oxigen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 41, p. 9-13, 1994.
- PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 57 (5), p. 371-389, 1991.

- PEARSON, D. A.; TAN, C. H.; GERMAN, J. B.; DAVIS, P. A.; GERSHWIN, M. E. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. **Life Sciences**, v. 64 (21), p. 1913–1920, 1999.
- PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. **Cell Biochem Biophys** v.53, p. 75–100, 2009.
- PIAO, M. J.; KANG, K. A.; ZHANG, R.; KO, D. O.; WANG, Z. H.; YOU, H. J.; KIM, H. S.; KIM, J. S.; KANG, S. S.; HYUN, J. W. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1448–1457, 2008.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v.63 (7), p.1035–1042, 2000.
- PIZZOFERRATO, A.; CIAPETTI, G.; STEA, S.; CENNI, E.; ARCIOLA, C. R. Cell culture methods for testing Biocompatibility. **Clinical Materials**, v. 15 (3), p. 173–180, 1994.
- POLISSIOU, M. G.; BARIYANGA, J.; TAJMIR-RIahi, H.A. Structural analysis of DNA and RNA interactions with antioxidant flavonoids. **Spectroscopy**, v. 23, p. 29-43, 2009.
- PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**, v.43, n.2, p.86-101, 1998.
- RASO, J.; BECHO, M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O. Rutina – Estrutura, Metabolismo e Potencial Farmacológico. **Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**. v. 1, p. 21 - 25, 2009.
- RASTOGI, R. P.; RICHA, KUMAR, A.; TYAGI, M. B. SINHA, R. P. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p.1-32, 2010.
- RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v, 113 (3), p. 189–207, 2006.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, 3 (7), p. 1125-1131, 2008.
- RIDDELL, R. J.; CLOTHIER, R. H.; BALLS, M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. **Food Chemical Toxicology**, v.24 (6-7), p.469-471, 1986.
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anion. **Biochemical Pharmacology**, v.37, n. 5, p.837-841, 1988.
- RODRIGUES, C. M. P.; SOLÁ, S.; SHARPE, J. C.; MOURA, J. J. G.; STEER, C. J. Tauroursodeoxycholic acid prevents bax-induced membrane perturbation and cytochrome c release in isolated mitochondria. **Biochemistry**, v. 42 (10), p. 3070–3080, 2003.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2009.
- RODRIGUES, M. R. A.; CAMARÃO, E. B.; DOS SANTOS, J. G.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. The effects of temperature and pressure of the characteristics of the extracts from high-pressure CO₂ extraction of *Majorana hortensis* Moench. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51 (2), p. 453-456, 2003.

- RODRIGUES, T.; SANTOS, A. C.; PIGOSO, A. A.; MINGATTO, F. E.; UYEMURA, A. S.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, p. 214-226, 1976.
- RÖPKE, C. D.; KANEKO, T. M.; RODRIGUES, R. M.; DA SILVA, V. V.; BARROS, S.; SAWADA, T. C. H.; KATO, M. J.; BARROS, S. B. M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.294, p.109-116, 2002.
- ROUPAS, P., NOAKES, M. **Apples, Their Antioxidants and Benefits to Human Health**. Ed. CSIRO, Sidney, 2010.
- RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen: London.
- SANTOS, K. F. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; OLIVEIRA, M. G. A., Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacology Research**, v. 40 (6), p. 493-496, 1999.
- SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicology in Vitro**, v.3 (4), p. 317-321, 1989.
- SARMA, A. D.; SHARMA, R. Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. **Phytochemistry**, v. 52 (7), p. 1313-1318, 1999.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v. 101 (1), p. 7-12, 1993.
- SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 910 (2), p. 265-273 2001.
- SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 910 (2), p. 265-273 2001.
- SCHWARZ, A.; STÄNDER, S.; BERNEBURG, M.; BÖHM, M.; KULMS, D.; STEEG, H. V.; GROSSE-HEITMEYER, K.; KRUTMANN, J. AND SCHWARZ, T. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 26-31, 2002.
- SCHWARZ, A.; STÄNDER, S.; BERNEBURG, M.; BÖHM, M.; KULMS, D.; VAN STEEG, H.; GROSSE-HEITMEYER, K.; KRUTMANN, J.; SCHWARZ, T. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 26-31, 2001.
- SÉFORA-SOUSA, M.; DE ANGELIS-PEREIRA, M.C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15 (4), p. 617-626, 2013.
- SEYOUM, A.; ASRES, K.; FIKY, F. K. E. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 67 (18), p. 2058-2070, 2006.

- SHAH, V. P.; ELKINS, J.; LAM, S-Y.; SKELLY, J. P. Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 53, p. 53-59, 1989.
- SHAH, V. P.; FLYNN, G. L.; GUY, R. H.; MAIBACH, H. I.; SCHAEFER, H. SKELLY, J. P.; WESTER, R. C.; YACOBI, A. In vivo percutaneous penetration / absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 74, p. 1-8, 1991.
- SHARAPIN, N.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; SANTOS, E. W. M., ALBURQUERQUE, E. M. R. **Fundamentos de tecnologia de fitoterápicos**. (2000) Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello (CAB) e Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (CYTED), p. 248.
- SHEER, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Research**, v. 60, p. 3689-3695, 2000.
- SHERR, C. J.; WEBER, J. D. The ARF/p53 pathway. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 10, p. 94-99, 2000.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; PACKER, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **The Journal of Investigative Dermatology**, Cambridge, v. 102, p. 469-475, 1994.
- SHOJI, M.; ABE, K.; NAWROTH, P. P.; RICKLES, F. R. Molecular mechanisms linking thrombosis and angiogenesis in câncer. **Trends in Cardiovascular Medicine**. 7, p. 52-59, 1997.
- SIERENS, J.; HARTLEY, J. A.; CAMPBELL, M. J.; LEATHEM, A. J. C; WOODSIDE, J. V. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 485, p. 169-176, 2001.
- SILVA, A. R.; FURUSHO, A. S.; BOENO, M. M.; S. DIEAMANT, G. C.; WEFFORT-SANTOS, A. M. In vitro evaluation of the efficacy of commercial green tea extracts in UV protection. **International Journal of Cosmetic Science**, p. 69-77, 2013.
- SILVA, E. J. N. L.; HERRERA, D. R.; ALMEIDA, J. F. FERRAZ, A. C. C.; GOMES, R. B. P. F. A.; ZAIA, A. A. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. **International Endodontic Journal**, v.45 (9), p. 815-820, 2012.
- SIMON, F.; BERGERON, D.; LAROCHELLE, S.; LOPEZ-VALLE, C. A.; GENEST, H.; ARMOUR, A.; MOULIN, V. J. Enhanced secretion of TIMP-1 by human hypertrophic scar keratinocytes could contribute to fibrosis. **Burns**, v. 38, p. 421-427, 2012.
- SINHA, R. P.; HÄDER, D-P. UV-induced DNA damage and repair: a review. **Photochemical Photobiological Sciences**, v. 1, p. 225-236, 2002.
- SLEIJFFERS, A.; YUCESAY, B.; KASHON, M.; GARSSSEN, J.; DE GRUIJL, F. R.; BOLAND, G. J.; VAN HATTUM, J.; LUSTER, M. I.; VAN LOVEREN, H. Cytokine polymorphisms and their role in susceptibility to UVB-induced modulation of immune responses following hepatitis B vaccination, **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 3423-3438, 2003.
- SMITH, E. W.; MAIBACH, H. I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**, New York: Marcel Dekker, p. 259-269, 2000.

- SOUSA, C. M. M.; SIVA, H. R.; VIEIRA J. R. G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30 (2), p. 351-355, 2007.
- SPENCER, J. P. E.; SCHROETER, H.; KUHNLE, G.; SRAI, S. K. S.; TYRRELL, R. M.; HAHN, U.; RICE-EVANS, C. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. **Biochemical Journal**, v. 354, p. 493-500, 2001.
- STEENVOORDEN, D. P. T.; BELJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. J. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 41 (1-2), p. 1-10, 1997.
- STEINSTRÄESSER, L.; RITTIG, A.; GEVERS, K.; SORKIN, M.; HIRSCH, T.; KESTING, M.; SAND, M.; AL-BENNA, S.; LANGER, S.; STEINAU, H-U; JACOBSENA, F. A Human Full-Skin Culture System for Interventional Studies. **Eplasty**, v. 9: e5, 2009.
- SURBER, C.; SCHWARB, F.; SMITH, E. Tape-stripping technique. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, **Mechanisms and Methodology**, 3 ed, Marcel Dekker, New York, p.395-409, 1999.
- SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký**, v. 150 (1), p. 25-38, 2006.
- THIELE, J. J.; DREHER, F. Antioxidant defense systems in skin. (2005) In: Cosmeceuticals and active cosmetics Drug versus cosmetics, 2 ed. Taylor & Francis Group, Boca Ranton, p. 38-75.
- THODY, A. J.; HIGGINS, E. M.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; BURCHILL, S. A MARKS, J. M. Pheomelanin as well as Eumelanin Is Present in Human Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, p. 340–344, 1991.
- TRUSH, M.A.; EGNER, P.A.; KENSLER, T.W. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, p. 143-147, 1994.
- TSAI, K-D.; LIN, J-C.; YANG, S-M; TSENG, M-J; HSU, J-D.; LEE, Y-J.; CHERNG, J-M. Curcumin Protects against UVB-Induced Skin Cancers in SKH-1 Hairless Mouse: Analysis of Early Molecular Markers in Carcinogenesis, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-11, 2012.
- VALENTA, C.; NOWACK, E.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Deoxycholate-hydrogels: novel drug carrier systems for topical use. **International Journal of Pharmaceutics.**, Amsterdam, v.185 (1), p. 103-111, 1999.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL; J. CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39 p. 44–84, 2007.
- VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I.; FRAGA, C. G. Membrane effects of Cocoa Procyanidins in Liposomes and Jurkat T Cells. **Biological Research**, v. 37, p. 293-300, 2004.

- VICENTINI, F. T. M. C.; SIMI, T. R. M.; DEL CIAMPO, J. O.; WOLGA, N. O.; PITOL, D. L.; IYOMASA, M. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. Quercetin w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 948-957, 2008.
- VIoux-CHAGNOLEAU, C.; LEUJENE, F.; SOK, J.; PIERRARD, C.; MARIONNET, C.; BERNERD, F. Reconstructed human skin: From photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. **Journal of Dermatological Science supplement**, v. 2, S1-S12, 2006.
- WANG, H.; KOICHEVAR, I. E. Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF- β biosynthesis and activation in keratinocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 38, p. 890-897, 2005.
- WÄTJEN, T.; MICHELS, G.; STEFFAN, B.; NIERING, P.; CHOVOLOU, Y.; KAMPKÖTTER, A.; TRAN-THI, Q-H.; PROKSCH, P.; KAHL, R. Low concentrations of flavonoids are protective in rat h4iie cells whereas high concentrations cause dna damage and apoptosis. **Nutrient Interactions and Toxicity**, p. 525-531, 2005.
- WIJESEKERA, D. R. R. O. B. **The Medicinal Plant Industry**. (1991) Boston: CRC Press, 248p.
- WITTGEN, H. G. M.; VAN KEMPEN, L. C. L. T Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. **Melanoma Research**, v. 17 (6), p. 400-409, 2007.
- XU, H.; YAN Y.; LI L.; PENG, S.; QU, T. WANG, B. Ultraviolet B-induced apoptosis of human skin fibroblasts involves activation of caspase-8 and -3 with increased expression of vimentin. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine** v. 26, p. 198–204, 2008.
- XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, New York, v.1, p. S1-S8, 2005.
- YANNAS IV, BURKE JF, GORDON PL, HUANG, C.; RUBENSTEIN, R. H. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.14, p. 107-132, 1980.
- YILDIZOGLU-ARI, N. V.; ALTAN M.; ALTINKURT, O.; ÖZTÜRK, Y. Pharmacological effects of rutin. **Phytotherapy Research**. v. 5 (1), p. 19–23, 1991.
- YU, J.; ZHANG, L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, p. 851-858, 2005.
- ZATZ, J. Rationale and approaches to skin permeation In: ZATZ, J. L. Skin Permeation –Fundamentals and application. Wheaton: Allured Publishing Corporation, p.11-31, 1993.
- ZESSNER, H.; PAN, L.; WILL, F.; KLIMO, K.; KNAUFT, J.; NIEWOHNER, R.; HÜMMER, W.; OWEN R.; RICHLING E.; FRANK, N.; SCHREIE, P.; BECKER, H.; GERHAUSER, C. Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. **Molecular Nutricional Food Research**, v. 52 (1), S28–44, 2008;
- ZHOU, J.; YOSHITOMI, H.; LIU, T.; ZHOU, B.; SUN, W.; QIN, L.; GUO, X.; HUANG, L.; WU, L.; GAO, M. Isoquercitrin activates the AMP–activated protein kinase (AMPK) signal pathway in rat H4iie cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 14-42, 2014.
- ZUCKER, S.; PEI, D.; CAO, J.; LOPEZ-OTIN, C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). **Current Topics in Developmental Biology**, v.54, p. 1-74, 2003.