UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da atividade moduladora da expressão de proteínas de estresse de extratos de *Anadenanthera colubrina, Pfaffia paniculata* e *Rhodiola rosea* para aplicação cosmética antienvelhecimento

WAGNER VIDAL MAGALHÃES

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof[a]. Dr[a] Telma Mary Kaneko

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Magalhães, Wagner Vidal
M188a Avaliação da atividade moduladora da expressão de proteínas de estresse de extratos de *Anadenanthera colubrina*, *Pfaffia paniculata* e *Rhodiola rosea* para aplicação cosmética antienvelhecimento. / Wagner Vidal Magalhães. -- São Paulo, 2012.
98p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Kaneko, Telma Mary

1. Produtos naturais : Cosméticos : Tecnologia 2. Expressão gênica I. T. II. Kaneko, Telma Mary, orientador.

668.55 CDD

WAGNER VIDAL MAGALHÃES

Avaliação da atividade moduladora da expressão de proteínas de estresse de extratos de *Anadenanthera colubrina, Pfaffia paniculata* e *Rhodiola rosea* para aplicação cosmética antienvelhecimento

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^{a}. Drª Telma Mary Kaneko

orientador/presidente

_____

1°. examinador

_____

2°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedicatória

A minha filha,
Sarah,
pelo carinho e
por ser minha fonte de inspiração
para superar as adversidades.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro deste trabalho;

À professora Dra. Telma Mary Kaneko pela oportunidade de realização deste trabalho, pela confiança em minha capacidade e pela sua sincera amizade construída nos últimos anos;

À Chemyunion Química Ltda, empresa patrocinadora desse estudo e que valoriza a pesquisa e inovação científica;

Ao meu colega de trabalho e amigo, Gustavo Dieamant, a quem tenho imensa gratidão por todas as oportunidades cedidas, apoio e confiança;

Aos meus amigos do Laboratório de Segurança e Eficácia da Chemyunion Química Ltda, Gustavo Facchini, Samara Eberlin e Divino Júnior, que colaboraram imensamente na execução deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos: José de Souza, Délia Luna, Rafael Takamoto, Miriam Matuo, Áurea Lacerda, Natália Esteves e Irene Satiko, pelos momentos de alegria e apoio nos momentos difíceis;

Às minha colegas, Daniele Yoshito e Bianca Sufi, do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, e ao Alvaro Cerda, do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico, pela paciência e ensinamentos na área de cultura celular e biologia molecular;

A toda equipe de Pesquisa e Desenvolvimento da Chemyunion Química Ltda, pelos ensinamentos e oportunidade de crescimento;

Aos meus pais, Lúcio e Julia, pelo incentivo ao crescimento constante e suporte para a realização de mais esta etapa da minha vida;

À Deborah, por todo carinho, compreensão de minha ausência em diversos momentos e força nos momentos mais difíceis.

“Nunca ore suplicando cargas mais leves,
e sim ombros mais fortes” **(Philips Brooks)**

RESUMO

MAGALHÃES, W.V. **Avaliação da atividade moduladora da expressão de proteínas de estresse de extratos de *Anadenanthera colubrina*, *Pfaffia paniculata* e *Rhodiola rosea* para aplicação cosmética antienvelhecimento.** 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Estudos têm relatado o potencial de aplicação cosmética de classes de proteínas que conferem resistência aos diferentes tipos de estresse sobre a pele. Nesse contexto, as proteínas de estresse - proteínas de choque térmico, metalotioneínas e sirtuínas - enquadram-se entre as proteínas de grande potencial no combate ao fotoenvelhecimento. Diversos extratos vegetais tem mostrado potencial de induzir uma ou mais proteínas de estresse. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos *in vitro* da aplicação isolada dos extratos de *Anadenanthera colubrina* (Angico branco), *Rhodiola rosea* (Rodiola), *Pfaffia paniculata* (Pfaffia), sobre a expressão gênica das proteínas do choque térmico (*Heat shock proteins*, HSP32 e HSP72), metalotioneína (MT-I) e da sirtuína isoforma SIRT1, em condição basal e mediante exposição aguda das culturas celulares à radiação UV. Como resultados de maior relevância o extrato de *Anadenanthera colubrina* foi capaz de modular positivamente as expressões gênicas de HSP72, SIRT-1 e MT-I, em fibroblastos sob condição basal. Já o extrato de *Pfaffia paniculata* foi capaz de elevar a expressão gênica de SIRT-1, em fibroblastos irradiados por UVA após incubação com o extrato vegetal e sob condição basal, além de induzir MT-I em culturas não irradiadas. Por fim, o extrato de *Rhodiola rosea* elevou as expressões de HSP32 e MT-I, em fibroblastos sob condição basal. Devido à capacidade indutora das proteínas de estresse pelos extratos vegetais avaliados, sugere-se que os mesmos apresentam potencial para utilização em produtos cosméticos, especialmente, com finalidade antienvelhecimento.

Palavras chaves: proteínas de estresse; pele; antienvelhecimento; cosméticos; expressão gênica.

ABSTRACT

MAGALHÃES, W.V. **Avaliação da atividade moduladora da expressão de proteínas de estresse de extratos de *Anadenanthera colubrina*, *Pfaffia paniculata* e *Rhodiola rosea* para aplicação cosmética antienvelhecimento**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Studies have reported the potential for cosmetic application of proteins classes that confer resistance to different types of stress on the skin. In this context, stress proteins - heat shock proteins, metallothioneins and sirtuins - fall between the proteins of great potential in the fight against photoaging. Several plant extracts have been shown potential to induce one or more stress proteins. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* effects from the isolated application of the extracts *Anadenanthera colubrina* (Angico-branco), *Rhodiola rosea* (Rodiola), *Pfaffia paniculata* (Fáfia) on the gene expression of heat shock proteins, HSP32 and HSP72, metallothionein (MT-I) and the sirtuin, isoform SIRT1, in basal conditions and upon acute exposure of cell cultures to UV radiation. As most relevant results, *Anadenanthera colubrina* extract was able to positively modulate the gene expression of HSP72, SIRT-1 and MT-I in fibroblasts under basal conditions. The *Pfaffia paniculata* extract was able to increase the gene expression of SIRT-1 in fibroblasts irradiated by UV after incubation with plant extract and in basal conditions, in addition to induce MT-I in non-irradiated cultures. Finally, the extract of *Rhodiola rosea* increased HSP32 and MT-I gene expressions in fibroblasts under basal conditions. Considering the plant extracts ability to induce stress proteins, it is suggested that they have potential for use in cosmetic products, especially, for anti-aging purposes.

Key words: stress proteins; skin, anti-aging; cosmetic products; gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARE	*A*ntioxidant responsive element
B2M	Beta-2-microglobulina
cDNA	DNA complementar
Ct	Ciclo treshold
DABCO	1,4-Diazabiciclo [2,2,2] octano
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Ditiotreitol
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBM	Fibroblast Basal Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
FU	Unidades de fluorescência
GSK	Glicogênio sintase quinase
HSE	Heat Shock Element
HSF-1	Heat shock factor 1
HSP	Heat Shock Protein
HSP32	Heat shock protein 32
HSP72	Heat shock protein 72
J	Joules
JNK	c-jun N-terminal quinase
kDa	Quilodáltons
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MMP-1	Metaloproteinase-1
MMP-2	Metaloproteinase-2
MMP-3	Metaloproteinase-3
MRE	Metal response element
mRNA	RNA mensageiro
MT-I	Metalotioneina 1
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
p53	Proteína 53
PI3-quinase	Fosfatidil-inositol-3-quinase

PKC	Proteína quinase C
RIN	RNA Integrity Number
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SIRT-1	Sirtuína 1
UV	Ultravioleta
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA DE BASES TIMINA ADJACENTES E SUA TRANSFORMAÇÃO EM FOTOPRODUTOS (DÍMERO CICLOBUTIL PIRIMIDINA E FOTOPRODUTO 6-4 PIRIMINA-PIRIMIDONA), APÓS EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO UV. 20

FIGURA 2. MECANISMO DE REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS GENES CODIFICANTES DE HSP. 22

FIGURA 3. MECANISMO DE REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS GENES CODIFICANTES DE ENZIMAS DE CLASSE II E METALOTIONEÍNA 1. 25

FIGURA 4. MECANISMO DE FEEDBACK NEGATIVO PARA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS GENES CODIFICANTES DE SIRT1(SIRTUINA) 27

FIGURA 5. EFEITOS DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DE *PFAFFIA PANICULATA* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS. . 43

FIGURA 6. EFEITOS DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS. . 44

FIGURA 7. EFEITOS DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DE *RHODIOLA ROSEA* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS.. 44

FIGURA 8. ELETROFORESE CAPILAR DE RNA TOTAL EXTRAÍDO DE FIBROBLASTOS HUMANOS (AMOSTRAS 1 A 4) 46

FIGURA 9. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA HSP32 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS INCUBADOS COM O EXTRATO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* E, EM SEGUIDA, IRRADIADOS COM UVA. 50

FIGURA 10. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA HSP32 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA*.. 52

FIGURA 11. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA HSP32 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *RHODIOLA ROSEA*.53

FIGURA 12. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA HSP72 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS INCUBADOS COM O EXTRATO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* E, EM SEGUIDA, IRRADIADOS COM UVA. 55

FIGURA 13. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA HSP72 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS INCUBADOS COM O EXTRATO DE *PFFAFIA PANICULATA* E, EM SEGUIDA, IRRADIADOS COM UVA.. 56

FIGURA 14. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA HSP72 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *RHODIOLA ROSEA*.57

FIGURA 15. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA HSP72 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *PFAFFIA PANICULATA*. 57

FIGURA 16. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA HSP72 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA*. 58

FIGURA 17. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA SIRT-1 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS INCUBADOS COM O EXTRATO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* E, EM SEGUIDA, IRRADIADOS COM UVA.. 60

FIGURA 18. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA SIRT-1 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS INCUBADOS COM O EXTRATO DE *PFAFFIA PANICULATA* E, EM SEGUIDA, IRRADIADOS COM UVA. 61

FIGURA 19. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA SIRT-1 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *PFAFFIA PANICULATA*. 63

FIGURA 20. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA SIRT-1 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *RHODIOLA ROSEA*.63

FIGURA 21. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA SIRT-1 EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA*. 64

FIGURA 22. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA MT-I EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS INCUBADOS COM O EXTRATO DE *PFAFFIA PANICULATA* E, EM SEGUIDA, IRRADIADOS COM UVA 65

FIGURA 23. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA MT-I EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS INCUBADOS COM O EXTRATO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* E, EM SEGUIDA, IRRADIADOS COM UVA. 66

FIGURA 24. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA MT-I EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA*. 67

FIGURA 25. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA MT-I EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *PFAFFIA PANICULATA*. 68

FIGURA 26. EXPRESSÃO RELATIVA DE MRNA PARA MT-I EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS EM CONDIÇÃO BASAL E INCUBADOS COM O EXTRATO DE *RHODIOLA ROSEA*. 69

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. REPRESENTAÇÃO DAS PLANTAS ANALISADAS NO PROJETO E COMPOSTOS COM POTENCIAL PARA ATIVAÇÃO DE VIAS DE INDUÇÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE. 34

QUADRO 2. SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES E SONDAS DOS GENES ANALISADOS POR MEIO DA TÉCNICA DE RT-PCR EM TEMPO REAL. 41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. TEMPO (EM HORAS) APÓS A IRRADIAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES TRATADAS COM OS EXTRATOS VEGETAIS EM QUE SÃO DETECTADOS OS MAIORES NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE HSP32, HSP72, SIRT1 E MT-I. 48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 Envelhecimento cutâneo 18
2.2 Proteínas do choque térmico 21
2.3 Metalotioneínas 25
2.4 Sirtuínas 27
2.5 Compostos ativos indutores 28
2.6 Plantas adaptógenas 29
2.6.1 *Pfaffia paniculata* 30
2.6.2. *Anadenanthera colubrina* 31
2.6.3 *Rhodiola rosea* 32
3. JUSTIFICATIVA 33
4. OBJETIVO 35
5. MATERIAL E MÉTODOS 36
5.1 Planejamento experimental 36
5.2 Grupos experimentais 37
5.3 Amostras-teste 37
5.4 Cultura de fibroblastos humanos 37
5.5 Incubação da cultura celular com amostras-teste 38
5.6 Protocolo de irradiação 38
5.7 Determinação da viabilidade celular 39
5.8 Extração e Análise do RNA Total 39
5.9 Análise da Expressão de mRNA por RT-PCR em Tempo Real 40
5.10 Análise dos dados 42
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
6.1 Determinação da viabilidade celular/citotoxicidade 43
6.2 Avaliação da integridade de amostras de RNA total 45
6.3 Determinação dos picos de expressão gênica 48
6.4 Avaliação da atividade moduladora das proteínas de estresse 50
6.4.1 HSP32 50

6.4.2 HSP72 54
6.4.3 SIRT-1 60
6.4.4 MT-I 65
7. CONCLUSÃO 71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72
ANEXOS 89

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento cutâneo é um fenômeno biológico complexo resultado da alteração de diferentes constituintes da pele. Dois processos que ocorrem simultaneamente são responsáveis pela aparência senil do tecido cutâneo (TZAPHLIDOU, 2004). O primeiro é o envelhecimento intrínseco, um processo geneticamente programado, independente de fatores ambientais e que afeta a pele da mesma maneira que a órgãos internos. O segundo processo é o envelhecimento extrínseco, ou fotoenvelhecimento, resultado da exposição a agentes externos, com destaque para a radiação ultravioleta (UV) (GILCHREST, 1995).

As principais manifestações clínicas observadas na pele em decorrência do fotoenvelhecimento são o espessamento do tecido cutâneo, aparecimento de rugas, pigmentação irregular, além do desenvolvimento de neoplasias (GILCHREST, 1989). Os eventos moleculares que conduzem a maioria de tais manifestações são os danos ao DNA e o estresse oxidativo, a partir da geração de espécies reativas de oxigênio (TRAUTINGER, 2001).

Devido à sua severidade capaz de produzir danos inclusive em indivíduos jovens, o envelhecimento extrínseco, é considerado o principal alvo da maioria dos produtos cosméticos (TAYLOR *et al*., 1990). Assim, existe uma grande demanda por produtos cosméticos com eficiência comprovada tanto para a prevenção como para redução dos efeitos da exposição cumulativa à radiação UV.

Diante das consequências biológicas do envelhecimento e embasados no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos em tal processo, pesquisadores vêm buscando o desenvolvimento de novas estratégias preventivas para aplicação cosmética capazes de combater a senescência cutânea. Na literatura, trabalhos têm relatado o papel e o potencial de aplicação cosmética de diferentes classes de proteínas, que conferem resistência ao estresse celular (DAHLGGARD *et al*., 1998; HANADA, 2000; LUO *et al*., 2001).

Neste estudo, destacamos as proteínas do choque térmico, metalotioneínas e sirtuínas como agentes fundamentais no controle de diversos eventos biológicos na pele. Dentre as atividades dessas proteínas com aplicação no combate ao fotoenvelhecimento

destacam-se o aumento do nível de reparo do DNA, elevação da resistência celular frente à radiação UV, ação antioxidante e aumento da longevidade (JANTSCHITSCH *et al*., 2002; KANE; MAYTIN, 1995; MAINES, 1992; TERZIBASI *et al*., 2007).

Devido à notável capacidade preventiva e protetora frente à radiação UV, que apresentam as proteínas de estresse, existe um enorme interesse pelo descobrimento e desenvolvimento de compostos ativos capazes de modular a expressão de tais proteínas na pele. A meta cosmética para esta classe de agentes é sua indução segura, visando à promoção da tolerância a danos causados pela exposição diária a agentes estressantes, tais como radiação e poluição (DUNSMORE; CHEN; WONG, 2001).

Considerando que o mercado de produtos cosméticos e farmacêuticos produzidos a partir de componentes de origem vegetal tem crescido nos últimos anos (ORGANIC MONITOR, 2007), surgem como fontes potenciais para uso no combate ao fotoenvelhecimento extratos vegetais com atividade adaptógena.

Extratos vegetais ou compostos com atividade adaptógena aumentam a resistência do organismo frente ao estresse de forma não específica. São utilizados no combate ao estresse físico e mental, para aumento da resistência física, além de atenuar algumas desordens resultantes do envelhecimento, como fraqueza geral, perda de memória e atenção (FULDER, 1980; CARLINI, 1991; RUSSO, 2001).

Devido à semelhança entre a ação adaptógena e as atividades exercidas pelas proteínas de estresse, estudos sugerem que plantas adaptógenas exerçem seus efeitos, pelo menos em parte, por meio da indução dessas proteínas (PANOSSIAN e*t al*., 2008). Além disso, algumas plantas adaptógenas apresentam em sua constituição química classes de compostos, tais como flavonóides e fitoesteróis, que possuem potencial para a ativação de vias de indução das proteínas de estresse (TALALAY; DE LONG; PROCHASKA, 1988; KANG *et al*., 2008).

Levando-se em consideração a atividade das proteínas de estresse na promoção da resistência a danos celulares e do aumento da longevidade; além da importância da pesquisa e descoberta de novos indutores dessas proteínas e, por fim, o aumento da procura por produtos cosméticos multifuncionais, neste trabalho propôs-se o estudo das plantas *Anadenanthera colubrina, Pfaffia paniculata* e *Rhodiola rosea* quanto à capacidade indutora de proteínas de estresse e, portanto, com potencial aplicação na indústria cosmética.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Envelhecimento cutâneo

A pele, considerada o maior órgão do corpo humano, consiste em um revestimento complexo e heterogêneo cuja área média é de 2 m^2, correspondendo a cerca de 10 a 15 % do peso corpóreo total (LEONARDI, 2004). Conhecido também como cútis, esse órgão constitui a primeira linha de defesa contra as agressões do meio externo (PEYREFITTE *et al.*, 1998). Dentre suas inúmeras funções essenciais ao organismo, destacam-se o controle da perda de água, a conversão de moléculas precursoras em vitamina D, a excreção de substâncias e a regulação térmica (FARIAS, 2004).

Com o passar dos anos, alterações estruturais e funcionais ocorrem tanto na derme como na epiderme, resultando em uma diminuição da sua capacidade adaptativa e de reparo tecidual, além de declínio gradual na fisiologia geral da pele (MONTAGNA; CARLISLE, 1979; SUDEL *et al.*, 2005). Esse fenômeno que caracteriza o envelhecimento é um processo complexo podendo ser classificado em dois segmentos: intrínseco e extrínseco (TZAPHLIDOU, 2004).

O envelhecimento extrínseco, também denominado fotoenvelhecimento, é fundamentalmente resultado da exposição à radiação UV (SCHARFFETTER-KOCHANEK *et al.*, 2000). É considerado um dos principais alvos de produtos cosméticos, devido aos efeitos severos exercidos sobre diferentes constituintes do tecido cutâneo, sobretudo no tecido conjuntivo da derme (TAYLOR *et al.*, 1990; TZAPHLIDOU, 2004). Segundo Trautinger (2001), os mecanismos moleculares que desencadeiam as manifestações clínicas do fotoenvelhecimento são os danos ao DNA e o estresse oxidativo.

A radiação UV induz à síntese de dímeros entre bases de pirimidina adjacentes em fitas do DNA (**Figura 1**). Os dois principais fotoprodutos gerados são os dímeros de ciclobutil pirimidina e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (FREEMAN *et al.*, 1989). O bloqueio da transcrição de RNA decorrente da formação dessas lesões no

DNA leva à ativação da proteína 53 (p53), que atua como um fator de transcrição para inúmeros genes (LJUNGMAN; ZHANG, 1996; ZIEGLER, 1994). Com acúmulo de danos no DNA, a proteína p53 conduz uma cadeia de eventos que culmina na paralisação temporária do ciclo celular, para reparo do DNA; ou em apoptose, caso o material genético não possa ser reparado (PRIVES; HALL, 1999; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2002). Quando esses danos ocorrem no gene p53, as funções da proteína são interrompidas e os dímeros são propagados a partir da multiplicação celular, podendo resultar na formação de tumores (MARROT; MEUNIER, 2008).

Segundo Dong e colaboradores (2008), lesões no DNA contribuem, também, com o processo de envelhecimento da pele ao sinalizarem a liberação no fibroblastos da metaloproteinase-1 (MMP-1), enzima responsável pela degradação de colágeno. Os mesmos autores constataram, ainda, menor indução de MMP-1 por queratinócitos tratados com enzimas reparadoras do DNA e expostos à radiação UV-B.

A pele é um dos órgãos mais afetados pelo estresse oxidativo, seja pela exposição a agentes externos como poluição do ar e radiações, bem como em função do metabolismo normal das células (MENZEL, 1994; KOHEN, 1999). Em todas as situações ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de danificar sítios biológicos, tais como lipídeos, proteínas e o DNA (ADELMAN; SAUL; AMES, 1988; KARTEN *et al.*, 1988, STADTMAN, 1990). O dano a qualquer um desses componentes é capaz de interferir de forma grave nas funções normais das células, podendo resultar em processos patológicos como inflamação e câncer (AMES; GOLD, 1991; KOHEN, 1999). A peroxidação lipídica, por exemplo, pode levar a alterações na fluidez da membrana plasmática, além do extravasamento de moléculas essenciais às atividades celulares (GABORAN, 1993).

Oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de radicais livres ainda aceleram o fenômeno do envelhecimento ao promoverem, dentre outras reações, a glicação proteica. Esta leva à perda de funções biológicas de determinadas proteínas, bem como à interação do colágeno com outros componentes da matriz celular (PAUL; BAILEY, 1996).

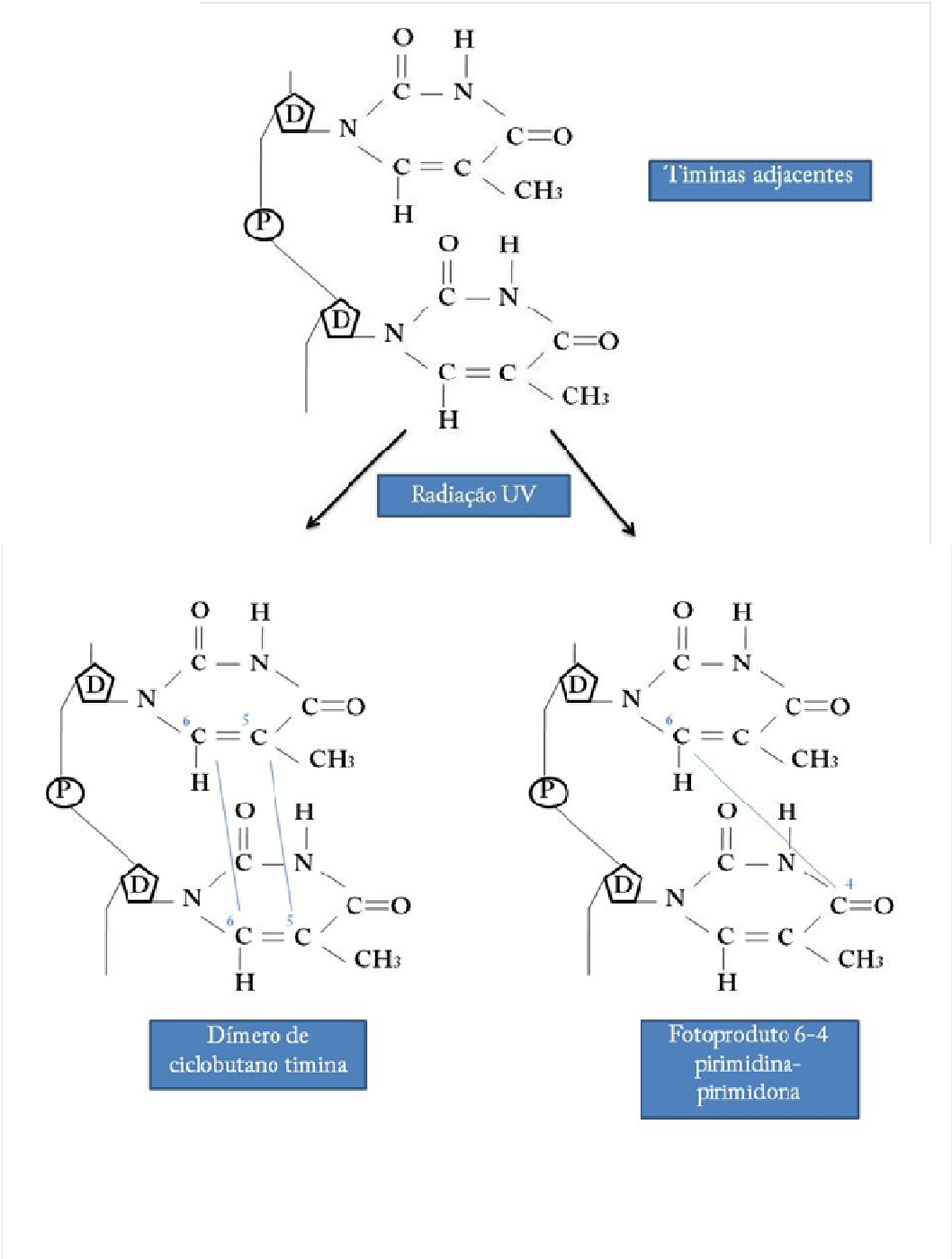


Figura 1. Estrutura de bases timina adjacentes e sua transformação em fotoprodutos (dímero ciclobutil pirimidina e fotoproduto 6-4 pirimina-pirimidona), após exposição a radiação UV.

O desenvolvimento característico de alterações nas fibras colágenas e elásticas, observado no fotoenvelhecimento cutâneo, também apresenta relação direta com a geração de EROs (WENK *et al*., 2001). De acordo com estudo realizado por Kawaguchi e colaboradores (1997), o aumento nos níveis de mRNA de tropoelastina, molécula precursora da elastina, em virtude da geração de radicais livres contribui para o acúmulo anormal de material elástico, fenômeno denominado elastose solar e considerado a alteração patológica mais evidente na pele fotoenvelhecida.

Além disso, o estresse oxidativo induz a síntese e ativação de metaloproteinases e inativa inibidores destas enzimas (SCHARFFETTER-KOCHANEK *et al*., 2000). Segundo Trautinger (2001), metaloproteinases específicas (MMP-1, MMP2 e MMP3) são induzidas pela radiação UV-A através da formação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, enquanto a radiação UV-B gera radicais hidroxila que induzem as formas MMP-1 e MMP-2.

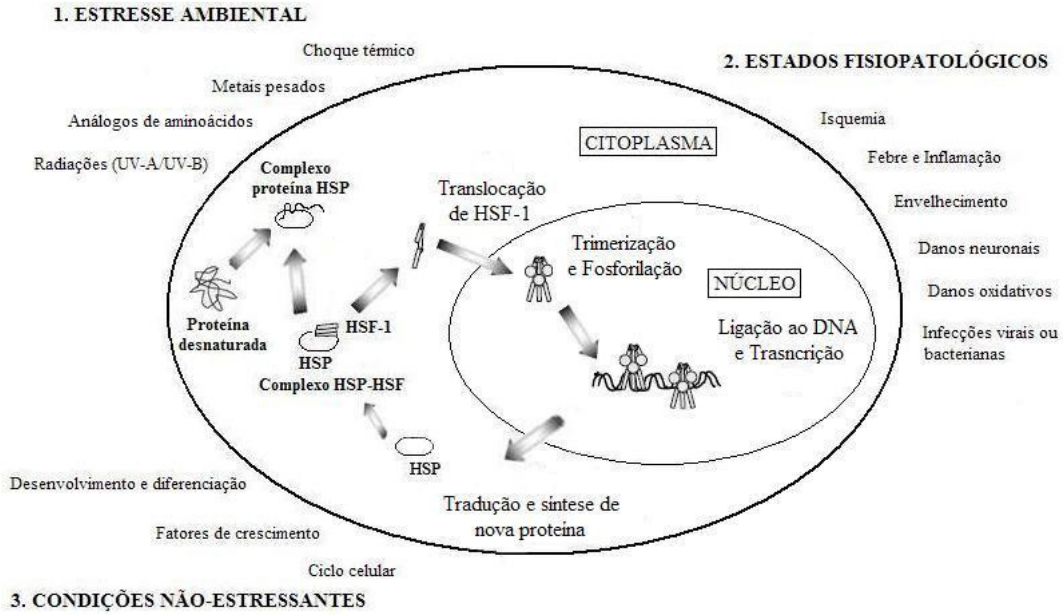
Diante do conhecimento, ao menos parcial, dos eventos moleculares envolvidos no fotoenvelhecimento, pesquisadores vêm buscando a elaboração de novas estratégias cosméticas efetivas e seguras no combate a senescência cutânea. Diversos trabalhos elucidaram as funções de determinadas classes de proteínas que conferem resistência ao estresse celular (DAHLGGARD *et al*., 1998; HANADA, 2000; LUO *et al*., 2001). Neste estudo destacamos as proteínas do choque térmico, *Heat Shock Protein* 32 (HSP32) e *Heat Shock Protein* 72 (HSP72); a metalotioneína (MT-1) e a sirtuína (SIRT1) como agentes fundamentais no controle de diversos eventos biológicos na pele e, portanto, com potencial terapêutico no combate ao envelhecimento celular.

2.2 Proteínas do choque térmico

As proteínas do choque térmico são classificadas em famílias de acordo com seus pesos moleculares mensurados em quilodaltons (MINOWADA; WELCH, 1995). Quanto aos padrões de expressão e indução, as HSPs podem ser definidas como constitutivas ou indutíveis. As proteínas expressas constitutivamente, ou seja, sob condições normais, atuam como chaperonas ou proteases, exercendo inúmeras funções

intracelulares. Chaperonas estão envolvidas na síntese, dobramento e transporte de proteínas, enquanto proteases atuam na degradação de proteínas danificadas (HENDRICK; HARTL, 1993). Em conjunto, minimizam a probabilidade de interações proteicas inapropriadas, capazes de resultar em alterações patológicas em determinado organismo (THOMAS; QU; PEDERSEN, 1995). Em contraste, HSPs indutíveis são largamente sintetizadas sob condições estressantes, como uma resposta que visa minimizar ou reparar danos celulares, garantindo a sobrevivência da célula ou organismo, e/ou induzir tolerância a estresses subsequentes, tais como hipertermia (DAHLGGARD *et al.*, 1998) e desidratação (RAVINDRAN *et al.*, 2005).

Segundo Morimoto (1998), o mecanismo que controla a expressão de HSPs tem início devido à ativação de um fator específico de transcrição, chamado "Heat Shock Factor 1" (HSF-1). Tal fator está presente no citoplasma da célula normal e não estressada, como um monômero inativo, devido à sua ligação às HSPs expressas constitutivamente. Em resposta ao estresse metabólico, as HSPs dissociam-se desse fator para atuarem sobre proteínas danificadas, permitindo assim a translocação de HSF-1 até o núcleo (**Figura 2**).



HSP = Heat Shock Protein, HSF =Heat Shock Factor 1

Figura 2. Mecanismo de regulação transcricional dos genes codificantes de HSP. Adaptado de MORIMOTO e colaboradores (1992) e SÕTI e colaboradores (2005).

Durante este processo, o HSF-1 sofre trimerização e fosforilação, o que torna possível sua ligação a uma sequência de nucleotídeos chamada de "Heat Shock Element" (HSE) localizada na região promotora dos genes que codificam as HSPs indutíveis, elevando a taxa de transcrição dos mesmos (ABRAVAYA *et al*., 1992; SOTI *et al*., 2005).

Na pele, tanto células da derme quanto da epiderme expressam HSPs, que lhes conferem resistência a danos causados por agentes estressantes, tais como radiações UV e poluição do ar (TRAUTINGER *et al*., 1995; PINOT *et al*., 1997). Em relação à fotoproteção, destaca-se a HSP72, capaz de elevar o reparo de dímeros no DNA induzidos por UV, bem como reduzir o acúmulo de proteínas oxidadas em testes *in vitro* (VERBEKE; CLARK; RATTAN, 2001; JANTSCHITSCH *et al*., 2002). Estudos destacam ainda o aumento na taxa de sobrevivência celular frente à radiação UV, em função do aumento da expressão dessa proteína, tanto *in vitro* como *in vivo* (KANE; MAYTIN, 1995; TRAUTINGER, 1995).

Indutores de chaperonas, como a HSP72, podem atuar por meio de diferentes vias: ligação direta e ativação de HSF-1; inibição de chaperonas inibidoras de HSF-1; além de outros mecanismos ainda desconhecidos (IKEYAMA *et al*., 2001; JURIVICH *et al*., 1992; VÍGH *et al*., 1997; WESTERHEIDE *et al*., 2004). Interferências na fosforilação de HSF-1 também podem modular a expressão de HSP72, visto que as enzimas proteína quinase C (PKC), c-jun N-terminal quinase (JNK) e glicogênio sintase quinase (GSK) reprimem a ativação de HSF-1 (VOELLMY, 2004). Estudos indicam que o composto polifenólico resveratrol, um conhecido indutor de HSP72, promove a inibição de tais proteínas quinase (POZO-GUISADO *et al*., 2004; WOOD *et al*., 2004). Além do resveratrol, outro composto fenólico, derivado do ácido hidroxicinâmico extraído da canela (*Cinnamomum zeylanicum*), mostrou-se capaz de ativar a via PI3-quinase/Akt (KIM *et al*., 2006), responsável pela inibição da glicogênio sintase quinase 3, sugerindo-se uma possível via para a ativação de HSF-1 dependente de compostos polifenólicos (PUTICS *et al*., 2008).

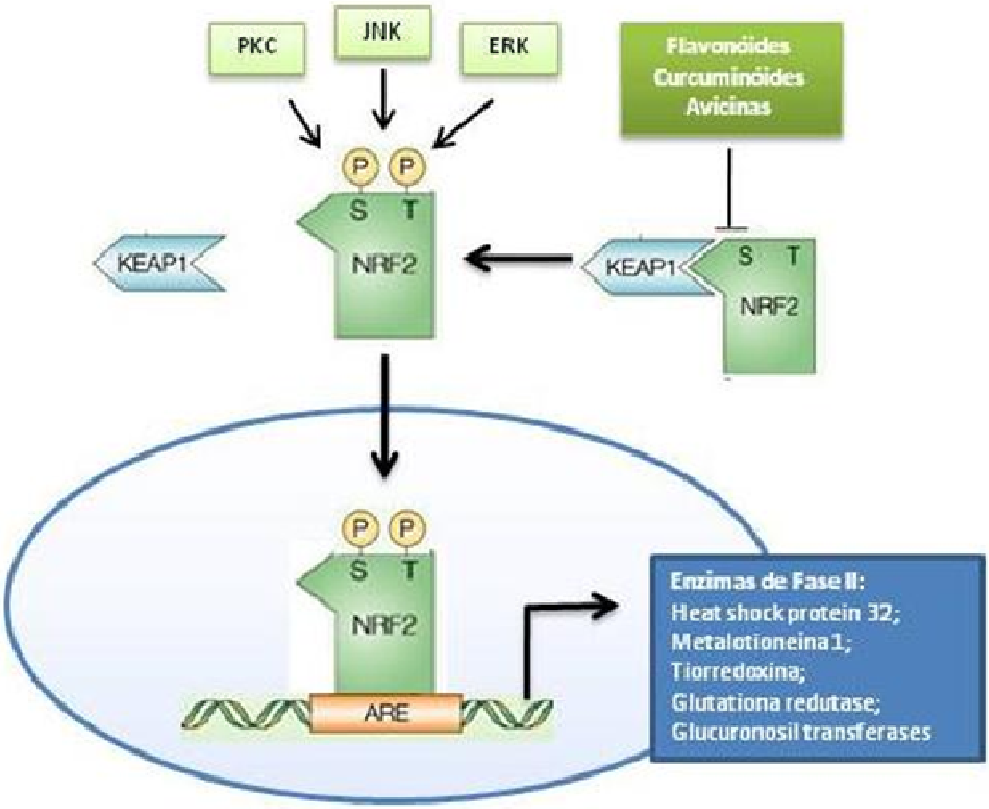
Além da HSP72, outra proteína de estresse apresenta papel fundamental em respostas adaptativas frente ao estresse oxidativo. A HSP32, também denominada heme oxigenase, é considerada uma enzima antioxidante devido ao seu papel protetor contra efeitos tóxicos da geração de radicais livres. Essa enzima catalisa a degradação do grupo heme livre (um potente agente oxidante) em Fe^{3+}, monóxido de carbono e biliverdina,

que é convertida sob a ação da biliverdina redutase para bilirrubina, pigmento que apresenta propriedades antioxidativas (KEYSE; TYRREL, 1990; MAINES, 1992). Revisão detalhada sobre o papel das proteínas do choque térmico na pele, bem como seu potencial na área dermatológica está disponível no ANEXO D.

A HSP32 é considerada uma integrante do grupo de enzimas de fase II, que engloba diversas outras enzimas incluindo tiorredoxina, glutationa redutase e glucuronosil transferases (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2008; MOI *et al*.,1994). Proteínas de fase II são essenciais na defesa contra eletrófilos e agentes oxidantes. São normalmente expressas em níveis basais, contudo diversos compostos tem capacidade de elevar notavelmente a expressão dessa classe de proteínas. Tais indutores modificam resíduos de cisteína altamente reativos à proteína *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), impossibilitando esse sensor celular de se ligar ao fator trascricional *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (NRF2). Além disso, a fosforilação do fator NRF2 por proteínas quinase, tais como JNK, PKC e *extracellular-signal-regulated kinases* (ERK), facilita sua dissociação (**Figura 3**). Dessa forma, o fator NRF2 livre é capaz de se translocar ao núcleo, ligar-se a uma sequência de nucleotídeos reguladora dos genes das proteínas de fase II (*antioxidant responsive element* - ARE) e, por fim, ativar a transcrição desses genes (KOBAYASHI *et al*., 2006).

Compostos contendo aceptores da reação de Michael, também conhecida como alquilação desracemizante, são considerados uma das principais classes de indutores dessas enzimas (TALALAY; DE LONG; PROCHASKA, 1988). Diversas plantas contêm uma ampla variedade de metabólitos secundários considerados aceptores da reação de Michael, tais como flavonóides, cinamatos, curcuminóides e avicinas (DINKOVA-KOSTOVA *et al*., 2008).

Segundo alguns estudos, a indução de HSP32 está relacionada à proteção contra a imunossupressão e inflamação induzidas por radiação UV, dois processos de substancial contribuição no desenvolvimento de câncer de pele (ALLANSON; REEVE, 2004; LISTOPAD *et al*., 2007).



PKC = "Protein kinase C"; JNK "c-Jun N-terminal kinase", ERK "extracellular-signal-regulated kinase", KEAPE1" Kelch-like ECH-associated protein 1", NRF2 "Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2", ARE "antioxidant responsive element"

Figura 3. Mecanismo de regulação transcricional dos genes codificantes de enzimas de classe II e metalotioneína 1. Adaptado de Surh (2003).

2.3 Metalotioneínas

As metalotioneínas (MT) constituem um grupo de proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína e capazes de se ligar a metais pesados (DUNN; BLALOCK; COUSINS, 1987). A expressão de MTs é tipicamente modulada pela

presença desses metais no organismo, bem como pela exposição a agentes oxidativos, tal como a radiação UV.

A presença de uma sequência de nucleotídeos, conhecida como elemento de resposta a metais (*metal response element* - MRE), localizada no promotor responsável pelo controle de transcrição do gene de metalotioneína, é essencial para a indução da síntese dessa proteína mediada por íons metálicos, tais como zinco e cobre (FLORIAŃCZYK, 2007). Contudo, a síntese de MT também é induzida por agentes não metálicos, sendo controlada por outras sequências pertencentes ao promotor de MT. Tal como ocorre no controle transcricional da HSP32, a expressão gênica de MT-1 também é regulada pela ligação do fator NRF2 à sequência ARE (figura 3; CHEN; KUNSCH, 2004).

Quatro isoformas de MTs são descritas na literatura, entretanto a maior parte dos estudos concentra-se na expressão e função da MT-I. Além da capacidade de eliminar radicais livres (HANADA *et al*., 1993), estudos *in vivo* atribuem uma função fotoprotetora a essa proteína (ANSTEY *et al*., 1996; HANADA, 2000).

Ao analisar os efeitos do tratamento com a forma ativa da vitamina D, 1,25-dihidroxivitamina D3, Hanada *et al.* (1995) observaram a diminuição no número de células de queimadura solar (*sunburn cells*) em pele de camundongos após irradiação UV-B e aumento da resistência celular frente a esta radiação em cultura de queratinócitos. Em um estudo subsequente, utilizaram-se camundongos com deficiência para os genes de MT-I, visando esclarecer a relação direta entre o aumento de MTs e a proteção a UV. Como resultado, os animais deficientes para MT, inclusive os tratados com cloreto de cádmio, conhecido indutor de metalotioneínas, apresentaram maior incidência de *sunburn cells* e células apoptóticas em comparação aos camundongos normais (HANADA *et al*., 1998). Em um trabalho semelhante, foi observado que as propriedades fotoprotetoras do equol, um isoflavonóide isolado da soja, devem-se ao aumento da expressão de MT-I na pele humana e em camundongos (WIDYARINI *et al*., 2006).

2.4 Sirtuínas

As sirtuínas compõem um grupo de proteínas denominado histona-desacetilases de classe III (NORTH; VERDIN, 2004). A SIRT1 é o principal membro dessa classe de proteínas em mamíferos que regula alguns processos celulares, incluindo apoptose e senescência (LUO *et al*., 2001; OTA *et al*., 2007). Alvos celulares de SIRT1 incluem diversos fatores de transcrição que, ao serem desacetilados, promovem aumento da sobrevivência celular e reparo do DNA (VAZIRI *et al*., 2001; MOTTA *et al*., 2004; JEONG *et al*., 2007).

Um dos mecanismos conhecidos de controle da transcrição de SIRT1 é um *feedback* negativo (**Figura 4**). O fator transcricional E2F1 é capaz induzir a expressão de SIRT1, além de ser, também, um substrato dessa enzima. Ao sofrer desacetilação esse fator torna-se inativo e perde sua capacidade de ativador transcricional (BROOKS; GU, 2009). Alguns estudos mostram que o ginsenosídeo Rg1, uma saponina extraída de *Panax ginseng*, é capaz de atenuar o processo de apoptose pela via envolvendo o fator transcricional E2F1 (XIAO-CHUN *et al*., 2003).

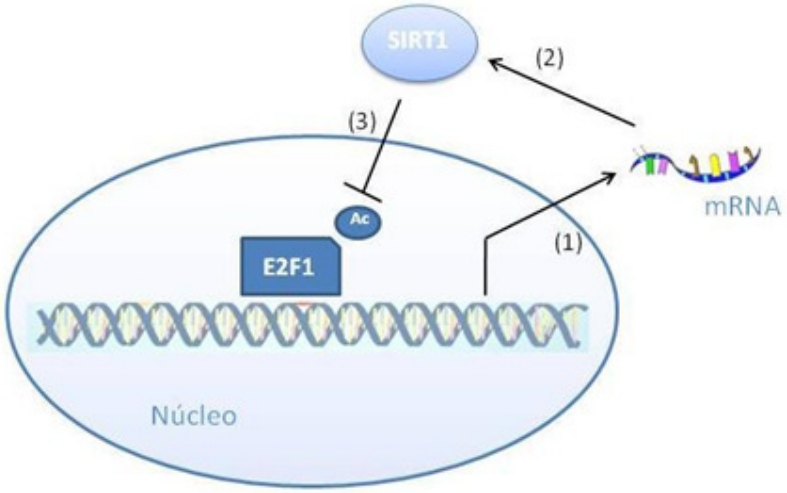


Figura 4. Mecanismo de feedback negativo para regulação transcricional dos genes codificantes de SIRT1(Sirtuina): (1) O fator transcricional E2F1 controla a transcrição do gene codificante de SIRT1 e síntese de mRNA; (2) Ocorre a tradução do mRNA e síntese de SIRT1; (3) A sirtuína desacetila o fator E2F1, tornando-o inativo.

Ao investigar o papel de SIRT1 frente à exposição à radiação UV e o peróxido de hidrogênio, Cao e colaboradores (2008) sugeriram que essa proteína é elemento fundamental na proteção contra os danos celulares causados por UV e EROs. Nesse estudo, o resveratrol, um ativador de sirtuína, conferiu proteção contra morte celular induzida por UV e H_2O_2, enquanto inibidores de SIRT1 como sirtinol, nicotinaminada e RNA de interferência para SIRT1 aumentaram os níveis de apoptose em células HaCaT.

Além dos efeitos protetores das sirtuínas frente a diferentes formas de estresse, diversos trabalhos tem relatado o papel dessas proteínas no aumento da longevidade. Inúmeros ativadores de sirtuínas, tais como resveratrol, visfatina e buteína foram capazes de elevar o período de vida em diversos tipos celulares e organismos (QUIDEAU, 2003; MOTTA *et al*., 2004; GRUBER *et al*., 2007; TERZIBASI *et al*., 2007).

Alguns trabalhos, no entanto, descrevem uma queda na expressão de proteínas de estresse ao longo do processo de envelhecimento (BONELLI *et al*., 1999; MALAVOLTA *et al*., 2008). Tal atenuação pode ser um dos fatores responsáveis pela senescência celular, ou simplesmente uma adaptação a um estado fisiológico específico de células envelhecidas (JONAK; KLOSNER; TRAUTINGER, 2006).

2.5 Compostos ativos indutores

Dada a diversidade de propriedades citoprotetoras das proteínas de estresse citadas acima, existe um enorme interesse pelo descobrimento de agentes farmacológicos capazes de elevar os níveis de expressão de tais proteínas na pele. A meta terapêutica para esta classe de agentes é a de promover a resistência a danos causados pela exposição a agentes estressores.

No caso das HSPs, o pigmento curcumina, proveniente da planta *Curcuma longa*, foi capaz de elevar a expressão de HSP32 em células endoteliais bovinas (MOTTERLINI *et al*., 2000), e de HSP72 em testes *in vitro* (DUNSMORE; CHEN; WONG, 2001). Como exemplo de produto industrializado, destaca-se o Crème Reminéralisante® comercializado pela empresa Anna Pegova. De acordo com a descrição do produto, sua propriedade antienvelhecimento deve-se à sua capacidade de

estimular a síntese de proteínas do choque térmico (INSTITUCIONAL ANNA PEGOVA, 2009).

Dentre os moduladores de metalotioneínas, íons de zinco destacam-se como indutores seguros (MASAKI *et al.*, 2007). De forma semelhante, o isoflavonóide equol mostrou-se capaz de elevar a expressão de MT-I tanto em pele de camundongos como de humanos expostas a radiação UV (WIDYARINI *et al.*, 2006). Outro exemplo de indutor de metalotioneínas é o ativo cosmético ZIN'CÎTE™ (GATTEFOSSÉ, 2007) indicado para aplicações de cuidado para pele.

Dentre os indutores de sirtuínas, destaca-se o composto extraído da casca da uva, resveratrol. Esse composto polifenólico é capaz de elevar a expressão de SIRT1, além de aumentar a atividade desacetilase dessa proteína (HOWITZ *et al.*, 2003; MUKHERJEE *et al.*, 2009). Em um estudo avaliando o papel de peptídeos de leveduras do gênero *Kluyveromyces* em uma aplicação cosmética, Moreau e colaboradores (2007) constataram o aumento da expressão de SIRT1 tanto em fibroblastos *in vitro* como em queratinócitos em sistema de cultura *ex vivo*. O aumento da expressão de SIRT1 foi seguido pela diminuição da senescência celular e da fragmentação do DNA induzida pela radiação UV-B.

Pelo exposto acima, observa-se que diversos extratos vegetais tem capacidade de induzir uma ou mais proteínas de estresse. Considerando que o mercado de produtos cosméticos e farmacêuticos produzidos a partir de componentes de origem vegetal tem crescido nos últimos anos, surgem como fontes potenciais para uso no combate ao fotoenvelhecimento extratos vegetais com atividade adaptógena.

2.6 Plantas adaptógenas

Segundo Brekhman e Dardymov (1969), plantas ou compostos capazes de promover a resistência a diversos agentes estressores, de forma não específica, em um organismo são denominados adaptógenos. Em um recente estudo, extratos de plantas adaptógenas foram capazes de elevar a longevidade em modelo experimental utilizando o nemátoda *C. elegans* (WIEGANT *et al.*, 2009).

Devido ao fato de os efeitos exercidos por adaptógenos apresentarem muita semelhança aos exercidos pelas proteínas de estresse (HSPs, MTs e sirtuínas), sugere-se que estas sejam, ao menos em parte, responsáveis pelas propriedades de tais compostos. Tal inferência é corroborada por observações de Panossian e colaboradores (2008), ao sugerirem que a resistência ao estresse conferida por plantas adaptógenas está associada ao estímulo da expressão de HSP72. Além disso, algumas plantas adaptógenas apresentam em sua constituição química classes de compostos com potencial para a ativação de vias de indução das proteínas de estresse.

O Brasil possui a flora mais diversificada do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores (PRANCE, 1977). Além disso, a medicina popular brasileira é particularmente rica no que se refere a plantas medicinais usadas de forma não específica para melhorar a disposição física (CARLINI, 1991), tal como atuam os adaptógenos. Contudo, segundo Calixto (2005) esse conhecimento popular e a biodiversidade não são devidamente explorados. Em um levantamento realizado por Mendes e Carlini (2006), foram definidas 33 possíveis espécies de plantas adaptógenas nativas do Brasil, apesar de constatarem a carência de estudos farmacológicos que confirmassem as propriedades terapêuticas de tais.

2.6.1 *Pfaffia paniculata*

No Brasil, várias espécies pertencentes ao gênero *Pfaffia* são comumente utilizadas para fins medicinais, tais como *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, *Pfaffia iresinoides* (Kunth) (LORENZI; MATOS, 2002) e *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze (KAMADA *et al*., 2009).

Este gênero possui importante valor econômico devido à semelhança das suas características fitoquímicas com as do ginseng-coreano (*Panax ginseng*) (DE-PARIS *et al*., 2000). A espécie *P. paniculata* está entre os maiores volumes de venda da indústria nacional de fitoterápicos (COMISSÃO DE HOMEOPATIA E FITOTERAPIA DO SINDUSFARM-SP, 1995).

Conhecida também como “ginseng brasileiro” ou “paratudo”, a espécie *P. paniculata* é uma planta encontrada principalmente nos estados de São Paulo e Paraná. Estudos indicam diversas propriedades dessa espécie, tais como tônica, afrodisíaca, analgésica, anti-inflamatória e anti-diabética (OLIVEIRA, 1986; OLIVEIRA *ET AL.*, 1980, MAZZANTI; BRAGHIROLI, 1994). Atribuí-se, também, às suas raízes a capacidade antineoplásica, ao inibir o crescimento de células tumorais em ensaio *in vitro* (NAKAI *et al.*, 1984).

Os principais componentes da raiz de *P. paniculata* já isolados são os fitoesteróis ß-sitosterol e estigmasterol, a alantoína, o ácido pfáfico e os pfafosídeos A, B, C, D, E e F, que são estruturalmente semelhantes aos ginsenosídeos extraídos de *Panax ginseng* (NAKAI *et al.*, 1984, MAZZANTI; BRAGHIROLI, 1994). Devido à semelhança estrutural entre os ginsenosídeos e os pfafosídeos, estes tem potencial para atuarem também sobre a via E2F1/SIRT1.

Em um estudo realizado por Vivancos e Moreno (2005), o ß-sitosterol mostrou-se capaz de modular a expressão de enzimas antioxidantes em cultura de macrófagos. A capacidade do ß-sitosterol controlar a expressão de enzimas que combatem o estresse oxidativo foi corroborada por estudo de Kang e colaboradores (2008). Nesse estudo, ao analisar o efeito de diferentes frações do extrato da raiz de *Chrysanthemum zawadskii* sobre a via NRF2-ARE, observaram que a fração que induziu de forma mais acentuada a expressão de NRF2 apresentava o ß-sitosterol como principal componente.

2.6.2. *Anadenanthera colubrina*

As espécies pertencentes ao gênero *Anadenanthera* são fonte de um agente medicinal conhecido com goma-resina de angico, que é utilizada no tratamento de infecções respiratórias como bronquite e pneumonia e na cura de constipação e dores de cabeça (HOEHNE, 1939). Entretanto o mais interessante aspecto do gênero está no seu uso na preparação de várias drogas cicatrizantes utilizadas popularmente em toda a América do Sul (RIZZINI, 1971).

Do ponto de vista fitoquímico, a espécie *Anadenanthera colubrina* é particularmente rica em alcalóides (bufotenina, N,N-dimetiltriptamina e 5-hidrox-N-monometiltriptamina; SCHULTES *et al*., 1977), flavonóides (inositol, pinitol, bornesitol, ononitol; PARIS; SAINT-FIRMIN; ETCHEPARE, 1967), triterpenóides (lupeol e lupenona), além de um número considerável de fitoesteróides como o ß-sitosterol e o ácido palmítico (MIYAUCHI *et al*.,1976).

2.6.3 *Rhodiola rosea*

Rhodiola rosea L. (família *Crassulaceae*), também conhecida como "raiz do Ártico" é uma planta utilizada na medicina popular da Europa e da Ásia devido às suas propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso, indutora do desempenho físico e mental, antidepressiva e profilática contra enfermidades respiratórias (RHODIOLA, 2002; KELLY, 2001).

Análises fitoquímicas das raízes de *R. rosea* revelaram a presença de inúmeras compostos incluindo flavonóides (tais como gossipetina, herbacetina e kaempferol), taninos, ácidos fenólicos, glicosídeos fenilpropanóides (rosin, rosarin e rosavin), glicosídeos feniletanóides (salidroside e tirosol), monoterpenos e triterpenos (β-sitosterol) (TORELLO, 2009).

Dentre tais constituintes, estudos conferem os efeitos farmacológicos conhecidos dos extratos de *R. rosea* principalmente à presença dos compostos polifenólicos tirosol, salidroside (p-hidroxifeniletil-O-β-D-glicopiranosídeo) e dos fenilpropanóides rosin (cinamil-O-β-D-glicopiranosídeo), rosarin (cinamil-(6'-O-α-L-arabinofuranosil)-O-β-D-glicopiranosídeo) e rosavin (cinamil-(6'-O-α-L-arabinopiranosil)-O-β-D-glicopiranosídeo), sendo estes três últimos comumente referidos como *rosavins* (MA *et al*., 2008; TOLONEN *et al.,* 2003; KELLY, 2001; GANZERA *et al*., 2001; LINH *et al*., 2000).

Segundo CHEN e colaboradores (2008) plantas com propriedades adaptógenas contendo altas concentrações de compostos polifenólicos como a *Rhodiola rosea*, não exercem apenas a ação adaptógena, mas também protegem células do organismo dos

efeitos deletérios do estresse oxidativo. Segundo Calabrese e colaboradores (2008), polifenóis são potentes indutores de proteínas que conferem proteção contra o estresse celular tais como HSP32, HSP70 e sirtuínas.

3. JUSTIFICATIVA

Levando-se em consideração a atividade das proteínas de estresse na promoção da resistência a danos celulares e do aumento da longevidade; além da importância da pesquisa e descoberta de novos indutores dessas proteínas e, por fim, o aumento da procura por produtos cosméticos multifuncionais, neste trabalho propôs-se o estudo das plantas *Anadenanthera colubrina, Pfaffia paniculata* e *Rhodiola rosea* quanto à capacidade indutora de proteínas de estresse e, portanto, com potencial aplicação na indústria cosmética.

A escolha das plantas deveu-se às atividades exercidas por seus extratos, bem como pelos constituintes com potencial para ativação das vias indutoras das proteínas de estresse HSP32, HSP72, MT-1 e SIRT1 (**Quadro 1**).

Planta	Atividade	Potenciais compostos indutores	Vias em que atuam	Proteínas indútiveis
Pfaffia paniculata	Adaptógena	ß-sitosterol e pfafosídeos	NRF2/ARE e E2F1/SIRT1, respectivamente	MT-1 e HSP32; SIRT1, respectivamente
Anadenanthera colubrina	Antioxidante	Flavonóides (ex. inositol) e ß-sitosterol	NRF2/ARE	MT-1 e HSP32
Rhodiola rosea	Adaptógena	Flavonóides (ex. kaempferol) e outros compostos polifenólicos (ex. tirosol e salidroside)	NRF2/ARE e inibição da fosforilação por quinases, respectivamente	MT-1 e HSP32; HSP72, respectivamente

Quadro 1. Representação das plantas analisadas e compostos com potencial para ativação de vias de indução de proteínas de estresse.

4. OBJETIVO

Avaliar os efeitos *in vitro* da aplicação isolada dos extratos de *Anadenanthera colubrina* (Angico branco), *Rhodiola rosea* (Rodiola), *Pfaffia paniculata* (Pfaffia), sobre a expressão gênica das proteínas do choque térmico (HSP32 e HSP72), metalotioneína (MT-I) e da sirtuína isoforma SIRT1, em condição basal e mediante exposição aguda das culturas celulares à radiação UV.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Planejamento experimental

Para a realização deste projeto foi delineado um planejamento experimental que racionaliza e secciona os experimentos em 3 etapas:

1º) Determinação da toxicidade do extrato seco de *Rhodiola rosea* e dos extratos hidroglicólicos de *Anadenanthera colubrina* e *Pfaffia paniculata*.

Nesta etapa, dezoito concentrações de cada extrato foram avaliadas, por meio do ensaio de citotoxicidade utilizando o corante hidróxido de tetrazólio (XTT). Esta etapa teve por objetivo determinar as concentrações utilizadas nas etapas 2 e 3.

2º) Determinação do tempo pós-irradiação

Foram analisados os tempos de 2h, 4h, 6h ou 24h após a irradiação para realização da extração do RNA das células tratadas com os extratos vegetais. Foram escolhidos os tempos em que se observou maior aumento no nível de mRNA referente aos genes que codificam as proteínas de estresse, para serem utilizados na etapa 3.

3º) Avaliação da expressão das proteínas de estresse

Foram avaliados os efeitos dos tratamentos com os três extratos em quatro concentrações distintas, sobre a expressão gênica das proteínas de estresse. A maior concentração utilizada foi a maior concentração não tóxica ou de toxidade negligível, definida na etapa 1. Os grupos experimentais avaliados nesta etapa são descritos no item 4.2.

5.2 Grupos experimentais

Para o delineamento dos experimentos, foram determinados 4 grupos experimentais: (1) células tratadas com amostras-teste antes da irradiação UV; (2) células tratadas e não irradiadas; (3) células não tratadas e irradiadas por UV; (4) células não tratadas e não irradiadas. Os grupos 1 e 2 apresentam 3 subgrupos referentes às diferentes amostras-teste analisadas.

Além de possibilitar a avaliação dos efeitos das amostras-teste sobre a expressão das proteínas de estresse, o delineamento proposto permite averiguar se a indução de tais proteínas ocorre somente sob condições de estresse (radiação UV) ou também em condições não estressantes.

5.3 Amostras-teste

O extrato seco de *Rhodiola rosea* e os extratos hidroglicólicos de *Anadenanthera colubrina* e *Pfaffia paniculata* foram fornecidos pela empresa Chemyunion Química Ltda (Sorocaba, SP, Brasil).

5.4 Cultura de fibroblastos humanos

Fibroblastos dérmicos humanos criopreservados, na densidade de aproximadamente $1x10^6$ células/ampola, foram adquiridos comercialmente (Cambrex, Lonza Bioscience, Walkersville, MD, USA). Os fibroblastos foram semeados em garrafas de 25 cm^2 na densidade de 87.500 células (Corning Inc., New York, NY), cultivados e expandidos até pelo menos a quinta passagem, em estufa úmida a 37 °C na presença de 5% de CO_2, utilizando meio de cultura específico, contendo 500 mL de meio de cultura basal para fibroblastos (FBM – *Fibroblast Basal Medium*,

Cambrex/Lonza) suplementado com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, Cambrex/Lonza), 0,5 mL de uma associação de antibióticos contendo gentamicina e anfotericina-B (GA-1000 – Sulfato de Gentamicina/Anfotericina-B, Cambrex/Lonza), 0,5 mL de insulina bovina (*Bovine Insulin*, Cambrex/Lonza) e 0,5 mL de fator de crescimento de fibroblastos humanos (*r-Human Fibroblast Growth Factor-B*, Cambrex/Lonza).

O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e, ao atingiram aproximadamente entre 80 e 90% de confluência, as células foram tripsinizadas (*Trypsin-EDTA*, Gibco, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), neutralizadas com o próprio meio de cultura, centrifugadas (220 x g) por 10 minutos, contadas em câmera de Neubauer, semeadas em placas de 24 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de $1x10^5$ células/poço e mantidas em condições apropriadas de cultivo por 24 h até completa aderência à placa de cultura para posterior irradiação e incubação com os extratos (DIEAMANT, 2008).

5.5 Incubação da cultura celular com amostras-teste

Momentos antes da incubação, as amostras-teste foram dispersas no meio de cultura para fibroblastos. As amostras-testes foram mantidas no meio em que as células foram cultivadas por 24h em estufa úmida a 37 °C em presença de 5% de CO_2 (DIEAMANT, 2008).

5.6 Protocolo de irradiação

Após a completa aderência dos fibroblastos à placa de cultura, o meio foi removido e reservado, e as células lavadas com tampão fosfato (NaCl 137 mM; KCl 2,7mM; Na_2HPO_4 8,1mM; KH_2PO_4 1,5mM). Em seguida, as células foram irradiadas uma única vez UV-A na dose 1 J/cm^2. A intensidade de radiação UVA utilizada foi

escolhida com base em testes prévios, em que fibroblastos humanos normais não tiveram sua viabilidade reduzida em função da fotoexposição.

Para a irradiação das culturas celulares foi utilizado um simulador de radiação UV solar. O equipamento contém lâmpada de xenônio de 150 W e filtros Schott WG 320 (1,2 mm) e UG 11 (1 mm) que permitem a emissão de um espectro contínuo de radiação na faixa de 320 a 400 nm (UV-A). O instrumento foi estabilizado por, no mínimo, 15 minutos antes da irradiação das culturas de células (DIEAMANT, 2008).

5.7 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por um método colorimétrico, utilizando o corante hidróxido de tetrazólio, XTT (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.). Esse ensaio é baseado na conversão de XTT para formazan laranja pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial nas células viáveis. O XTT foi então adicionado nas culturas de fibroblastos na concentração de 5mg/mL (30 µL/poço) e incubado por mais 4 horas em estufa a 37 ºC. A seguir, a absorbância de cada poço foi determinada a 450 nm em leitor de microplaca (LGC Biotecnologia, Brasil) e a viabilidade celular foi expressa em porcentagem (EBERLIN, 2008).

5.8 Extração e Análise do RNA Total

As células foram homogeneizadas com 1 mL de TRIZOL® (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), por 10 segundos, a uma velocidade de 20.000 rpm, utilizando o homogeneizador de tecido Homomix D-130 (Biosystems, PR, Brasil). Em seguida, foi realizada a extração do RNA total, adicionando 200 µL de clorofórmio aos lisados e centrifugando os extratos 12.000 rpm por 15 minutos, a 4 ºC. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol, centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4 ºC e lavado com etanol a 75% (v/v). A seguir, o RNA foi seco a

temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água esterilizada tratada com dietilpirocarbonato, DEPC (Sigma Aldrich, MO, USA).

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria no ultravioleta (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a), e seu grau de pureza será determinado pela relação das absorbâncias a 260 nm e 280 nm. Foram utilizadas apenas amostras cujo grau de pureza for igual ou superior a 1,8.

A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese capilar pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Deutschland Gmbh, Alemanha). As amostras de RNA foram avaliadas com o auxílio de um marcador de peso e massa molecular e a área sobre a curva do marcador molecular foi comparada com a soma da área de pico da amostra. Para as amostras de RNA, a fração ribossomal foi determinada, indicando sua integridade. O número de integridade do RNA (RNA integrity number - RIN) foi utilizado para estimar sua integridade baseado na migração eletroforética da amostra, incluindo a presença de produtos degradados.

5.9 Análise da Expressão de mRNA por RT-PCR em Tempo Real

A quantificação da expressão de mRNA dos genes que codificam HSP32, HSP72, MT-I e SIRT-1 foi realizada por transcrição reversa do mRNA seguida de RT-PCR em tempo real, utilizando o sistema de amplificação TaqMan Two Step RT-PCR (Applied Biosystems, Fostes City, CA).

A primeira etapa constituiu da síntese de cDNA a partir de 200 ng de RNA total, na presença de 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), ditiotreitol (DTT) 20 mM (Invitrogen, MD, EUA), 200 µM de desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP - GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), 200 U de transcriptase reversa (Superscript^{TM} II RT RNase H^-) e tampão de trancrição reversa (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15 mM) (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A mistura foi incubada por 10 min a 25 ºC, seguida de 50 min a 42 ºC e 15 min a 70 ºC. O cDNA obtido foi armazenado a -20 ºC até a realização da PCR.

O cDNA proveniente de RNA total foi amplificado pela PCR em tempo real, empregando iniciadores (*primers*) cujas sequências foram selecionadas a partir de publicações que utilizaram esses *primers* de forma satisfatória (**Quadro 1**). Selecionou-se também o gene para beta-2-microglobulina (B2M) como controle endógeno.

O programa de PCR em tempo real foi constituído de: (1) um ciclo de 2 min a 50 ºC, (ativação da UNG - Uracil-N-Glicosilase); (2) um ciclo de 10 min a 95ºC, (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 s a 95 ºC (desnaturação) e 1 min a 60ºC (hibridização e extensão).

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Fostes City, CA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, Fostes City, CA) que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. Esse programa fornece o parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado ciclo *treshold* (Ct) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene é registrado e comparado com o de um gene de expressão constitutiva, que é utilizado como controle endógeno.

Gene		Sequências dos iniciadores (5' -3')	Referência
	Forward	GGGTGATAGAAGAGGCCAAGACT	
HSP32	Reverse	GCAGAATCTTGCACTTTGTTGCT	Smith *et al.* (2003)
	Sonda	CTCAACATCCAACTCTTTGAGGAGTTGCAG	
	Forward	ACCAAGCAGACGCAGATCTTC	
HSP72	Reverse	GCCCTCGTACACCTGGATCA	Febbraio; Koukoula (2000)
	Sonda	CCTACTCCGACAACCAACCCGGG	
	Forward	CTTCTCCTTGCCTCGAAATGGA	
MT-I	Reverse	AGCAGCAGCTCTTCTTGCAG	Raschke *et al.* (2006
	Sonda	CCCAACTGCTCCTGCTCGCCTGTT	
	Forward	TAGAGCCTCACATGCAAGCTCTA	
SIRT1	Reverse	GCCAATCATAAGATGTTGCTGAAC	Ashraf *et al.* (2006)
	Sonda	ACTCCAAGGCCACGGATAGGTCCATATACTT	

Quadro 2. Sequências dos iniciadores e sondas dos genes analisados por meio da técnica de RT-PCRem tempo real.

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do controle endógeno. Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt) e é calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

Com o objetivo de avaliar a variação de expressão entre os diferentes grupos, foi utilizado o parâmetro Delta Delta Ct (ΔΔCt) que é calculado pela fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{basal}} - \Delta Ct_{\text{tratado}})$$

Os dados de ΔΔCt foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), e a expressão interpretada pelo seu aumento ou diminuição após tratamento e/ou exposição à radiação.

5.10 Análise dos dados

As alterações na expressão gênica foram consideradas significativas quando valores obtidos no experimento foram superiores a 1,5 vezes (± desvio padrão) em relação ao controle. Para inibição da expressão, foram considerados relevantes valores inferiores a 0,5 vezes (± desvio padrão). Tal análise é proposta por McCarthy e Smyth (2009), visto que métodos estatísticos mais amplamente utilizados procuram avaliar se a expressão diferencial realmente é diferente de zero, mas não fornecem garantia de que as diferenças encontradas são grandes o suficiente para ser biologicamente significativas. Os ensaios foram conduzidos em dois experimentos independentes, cada um realizado em duplicata.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação da viabilidade celular/citotoxicidade

A partir do ensaio de viabilidade celular utilizando o corante XTT, foram definidas como as maiores concentrações não tóxicas, ou de toxicidade negligível: 0,39 % (v/v) para a *Pfaffia paniculata*; 0,098 % (v/v) para a *Anadenanthera colubrina;* e 0,0024 % (p/v) para a *Rhodiola rosea* (**Figuras 5, 6 e 7**, respectivamente). A redução da viabilidade celular promovida por todos os extratos avaliados mostrou-se concentração-dependente. Os dados representam a média da porcentagem de células viáveis em relação ao controle obtidos de 2 experimentos independentes.

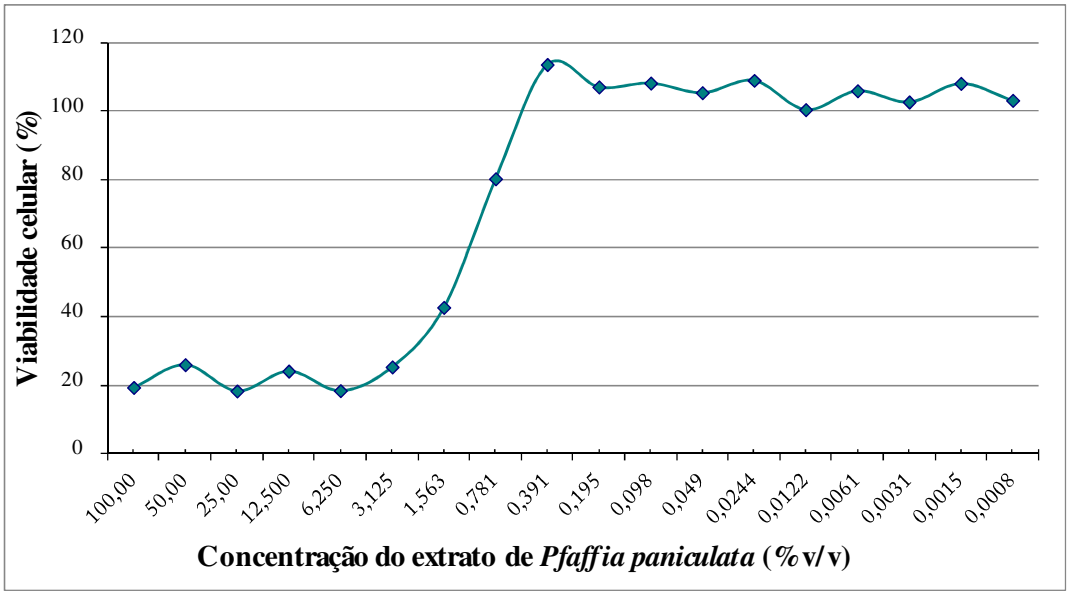


Figura 5. Efeitos do extrato hidroglicólico de *Pfaffia paniculata* sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos. Os dados representam a média da porcentagem de células viáveis em relação ao controle obtida de 2 experimentos independentes.

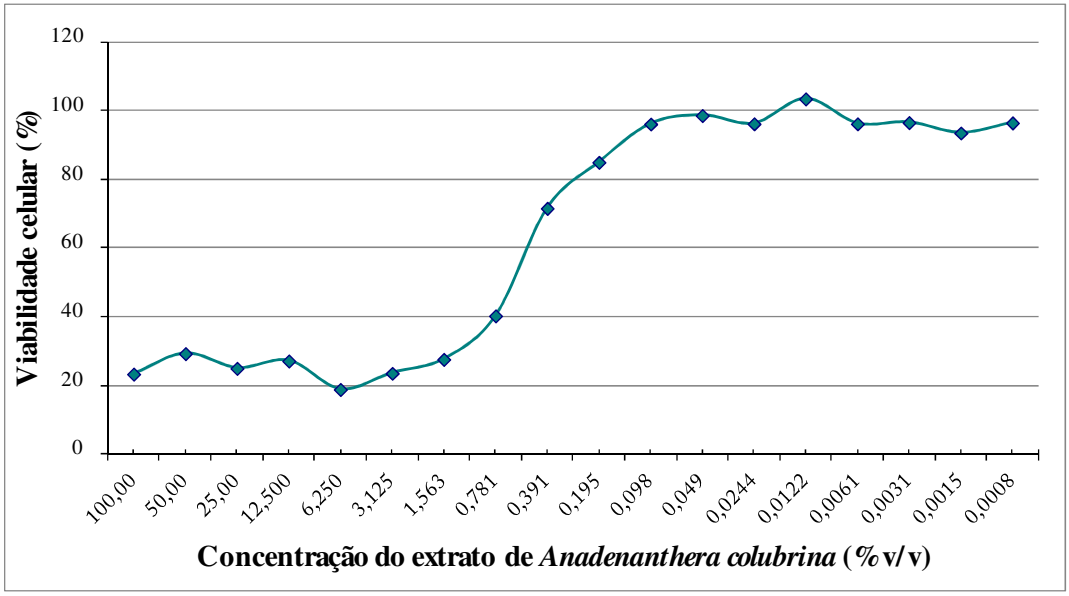


Figura 6. Efeitos do extrato hidroglicólico de *Anadenanthera colubrina* sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos. Os dados representam a média da porcentagem de células viáveis em relação ao controle obtida de 2 experimentos independentes.

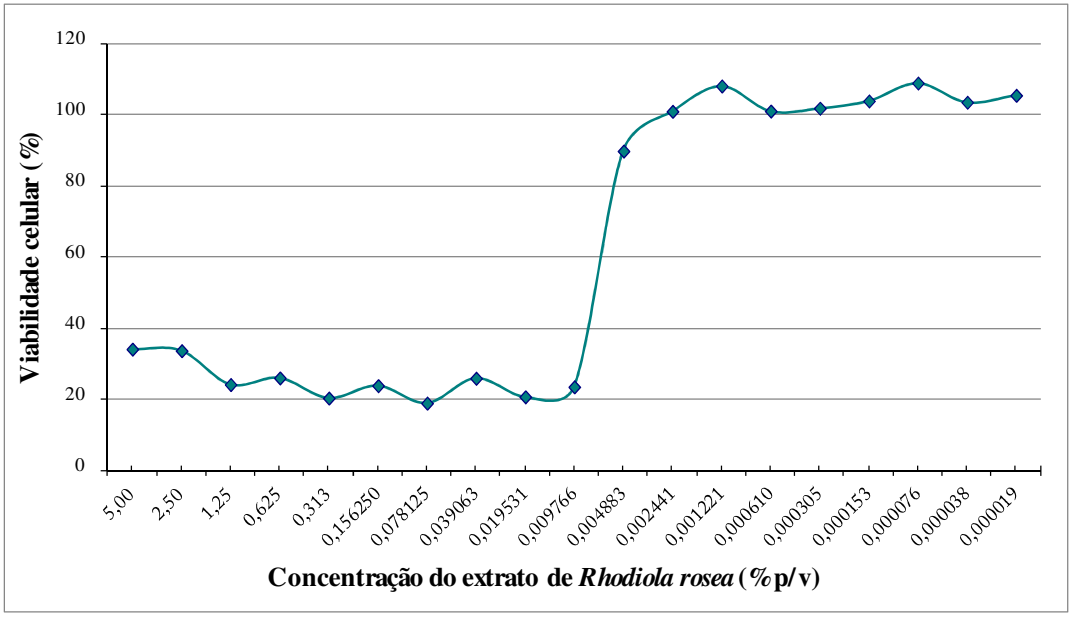


Figura 7. Efeitos do extrato hidroglicólico de *Rhodiola rosea* sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos. Os dados representam a média da porcentagem de células viáveis em relação ao controle obtida de 2 experimentos independentes.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, foram selecionadas, para os estudos de eficácia *in vitro,* com a finalidade de obter uma curva dose-resposta para cada um dos compostos, as seguintes concentrações:

- *Pfaffia paniculata*: 0,391; 0,195; 0,098 e 0,049 % (v/v);
- *Anadenanthera colubrina:* 0,195; 0,098; 0,049 e 0,024 % (v/v);
- *Rhodiola rosea:* 0,0048; 0,0024; 0,0012 e 0,0006 % (p/v).

6.2 Avaliação da integridade de amostras de RNA total

Ao avaliar um número representativo de amostras, aleatórias dos grupos estudados, de RNA total foi possível observar que o método de extração mantém a integridade do ácido nucléico. Como exposto na **Figura 8**, as amostras apresentaram o número de integridade do RNA (*RNA Integrity Number* - RIN) entre 9 e 10. Vale ressaltar que amostras com valores de RIN maior ou igual a 8 são consideradas com integridade ótima, podendo ser utilizadas inclusive em ensaios de grande escala como na plataforma *microarray*.

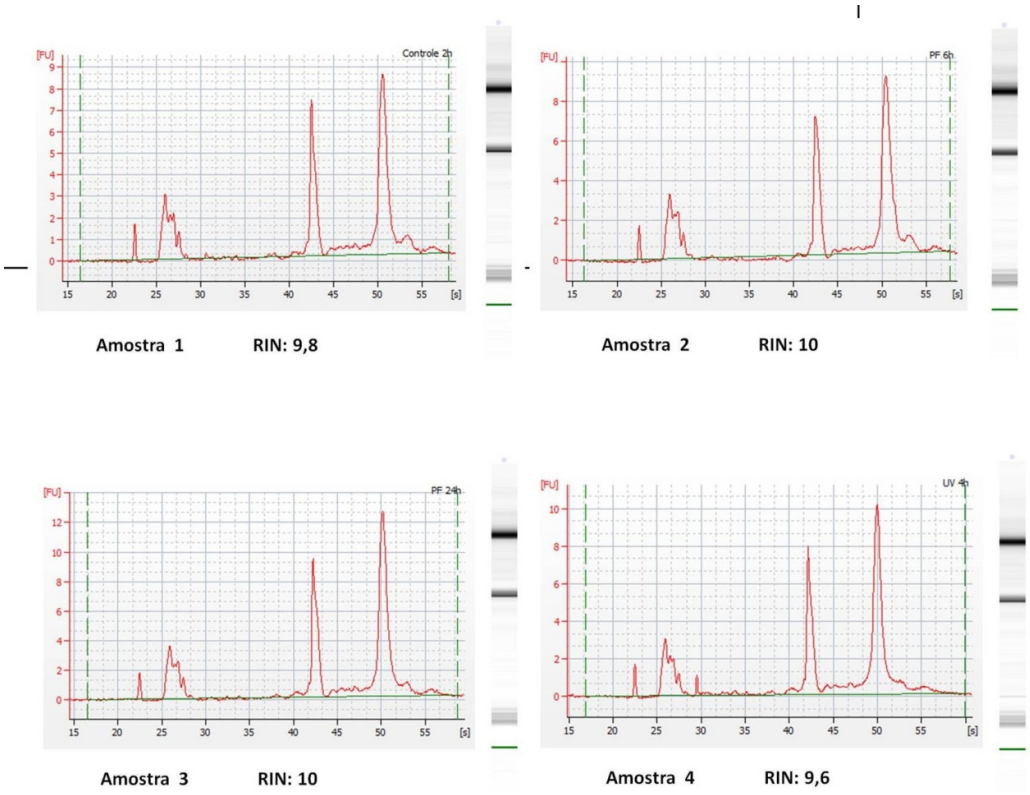


Figura 8. Eletroforese capilar de RNA total extraído de fibroblastos humanos (amostras 1 a 4). RIN: número de integridade do RNA (valor ideal≥8).

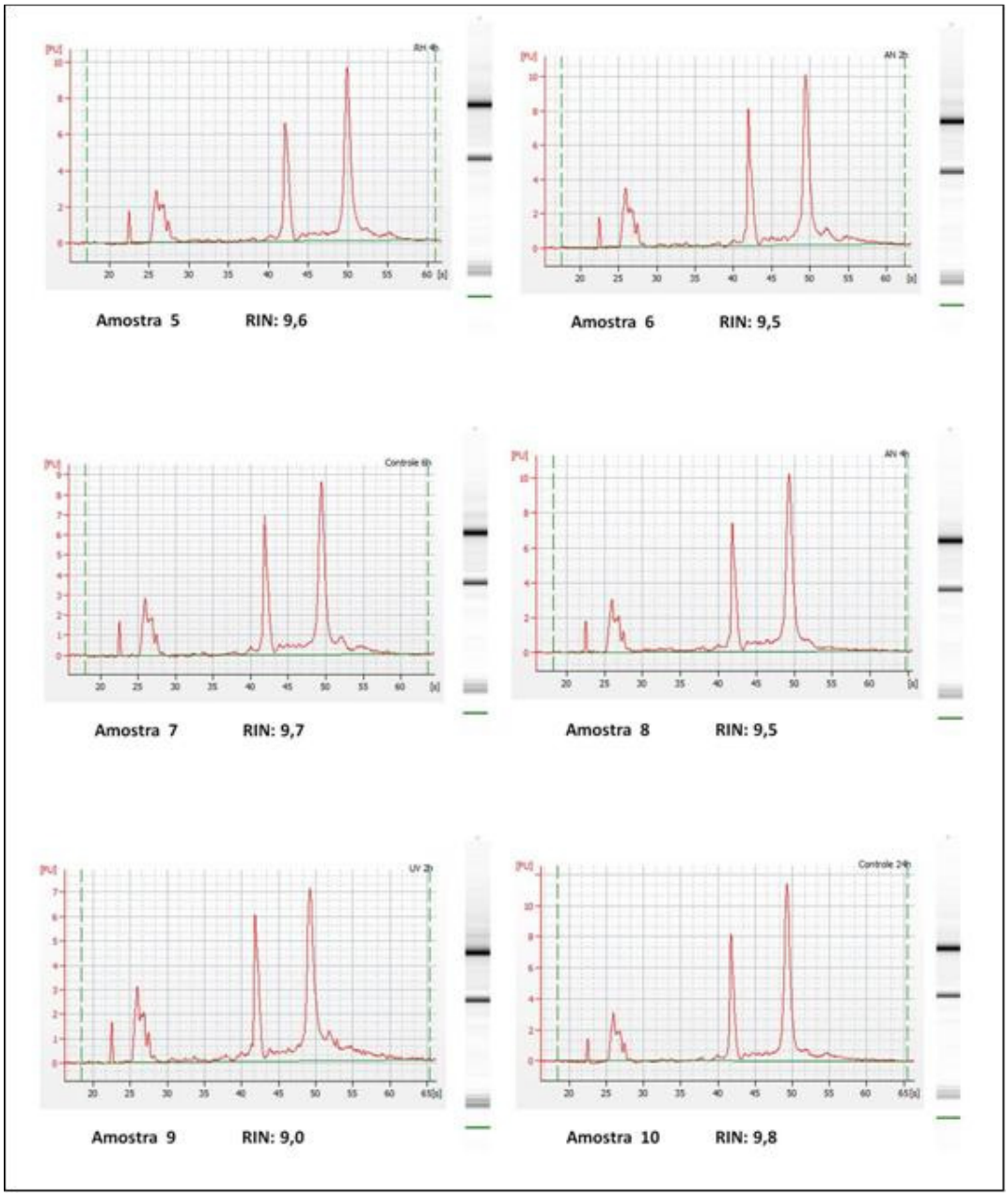


Figura 8 (Continuação). Eletroforese capilar de RNA total extraído de fibroblastos humanos (amostras 5 a 10). RIN: número de integridade do RNA (valor ideal≥8).

Os picos formados nos eletroferogramas, dispostos na **Figura 8**, nos tempos de aproximadamente 42 segundos e 49 segundos, representam os níveis, em unidades de fluorescência (*FU*), dos fragmentos de RNA ribossômico (rRNA) 18S e 28S, respectivamente. Já o pico formado no intervalo de tempo entre 24 e 28 segundos,

representa os níveis da subunidade 5S. As amostras de RNA total avaliadas apresentaram picos elevados para as subunidades 18S e 28S de rRNA, bem como uma pequena quantidade de RNA 5S. Tais resultados confirmam a integridade das amostras, visto que a degradação do RNA produz uma mudança na distribuição de tamanhos da molécula para fragmentos menores e uma diminuição do sinal de fluorescência para as subunidades 18S e 28S (FLEIGE; PFAFFL, 2006).

6.3 Determinação dos picos de expressão gênica

Ao avaliar a expressão gênica é fundamental determinar o tempo necessário, após determinado estímulo, para obter níveis alterados de mRNA transcrito. Dessa forma, são minimizadas as chances de resultados falso-negativos. Do contrário, corre-se o risco de afirmar que determinado gene não é diferencialmente expresso, quando na realidade, o tempo em que ocorrem as alterações de expressão não foi considerado.

Apesar de existirem, na literatura, trabalhos que determinam os tempos para os picos de expressão gênica das proteínas avaliadas neste estudo, não é recomendada a utilização desses dados nos experimentos, visto que se trata de avaliações com variações quanto a procedimentos, modelos experimentais ou mesmo quanto aos organismos empregados. Por essa razão, cada proteína teve seu pico de expressão gênica avaliado para cada tipo de tratamento. Na **Tabela 1**, são dispostos os tempos após a irradiação celular necessários para observação de alterações na expressão gênica de HSP32, HSP72, SIRT1 e MT-I, em comparação ao grupo controle.

	Pfaffia paniculata	*Anadenanthera colubrina*	*Rhodiola rosea*
HSP32	-	4h	4h
HSP72	24h	24h	24h
SIRT1	24h	24h	24h
MT-I	6h	4h	4h

Tabela 1. Tempo (em horas) após a irradiação das culturas celulares tratadas com os extratos vegetais em que são detectados os maiores níveis de expressão gênica de HSP32, HSP72, SIRT1 e MT-I.

Mediante o tratamento com os extratos de *Anadenanthera colubrina* e *Rhodiola rosea*, as culturas celulares apresentaram picos de expressão de HSP32 no tempo de 4 h após a irradiação das culturas celulares. Esse resultado mostrou-se similar aos dados obtidos pelo estudo de Allanson e Reeve (2004), no qual a HSP32 apresentou os maiores níveis de expressão gênica 3 h após a exposição à radiação UVA de fragmentos de pele de camundongo excisados. No presente estudo, o tempo necessário para se obter o pico de expressão de HSP32, após o tratamento com o extrato de *Pfaffia paniculata*, não foi determinado, visto que os níveis de mRNA obtidos nos tempos investigados não puderam ser quantificados.

A expressão gênica de HSP72 mostrou-se superior, em comparação ao grupo controle, 24 horas após a irradiação celular. Tal resultado se contrasta com os obtidos no estudo desenvolvido por Zhou e colaboradores (1998), em que queratinócitos humanos apresentaram um pico de expressão de HSP72 no intervalo de 1-3 horas após serem submetidos à radiação UVB.

Assim como a HSP72, a expressão de SIRT1 apresentou níveis mais elevados de mRNA 24 horas após a fotoexposição. Em um estudo avaliando alterações na expressão gênica de SIRT1 em camundongos frente à baixa disponibilidade de nutrientes, o pico de expressão da proteína ocorreu no intervalo de 12 a 18 horas após o estresse nutricional (NORIEGA *et al*., 2011).

Por fim, o pico de expressão gênica de MT-I ocorreu no tempo de 4 horas, em culturas celulares tratadas com os extratos de *Anadenanthera colubrina* e *Rhodiola rosea*. Fibroblastos incubados com extrato de *Pfaffia paniculata* apresentaram níveis elevados de mRNA para MT-I, 6 horas após a irradiação. Os resultados apresentados são similares aos observados por Oguro e Yoshida (2001), que avaliaram o perfil de expressão gênica de MT-I em fragmentos de pele de camundongos submetidos à radiação UVA. Neste estudo, o pico de expressão de mRNA ocorreu 4 horas após a fotoexposição.

6.4 Avaliação da atividade moduladora das proteínas de estresse

6.4.1 HSP32

A HSP32 é uma proteína de estresse cuja massa molecular varia de 30 a 35 kDa, e é induzida em células de roedores, aves e seres humanos por uma variedade de tratamentos químicos (HIWASA; SAKIYAMA, 1986; JOHNSTON *et al.*, 1980; CALTABIANO, *et al.*, 1986). Um dos principais indutores de mRNA de HSP32 nas células da pele humana é a radiação UVA, a qual resulta em uma condição de estresse oxidativo celular (KEYSE; TYRRELL, 1987). Neste estudo, foi avaliado o potencial de modulação da expressão das proteínas de estresse, em culturas celulares, em condição basal e expostas à radiação UVA, através do tratamento com extratos vegetais. Na **Figura 9**, são mostrados os efeitos do tratamento de fibroblastos humanos incubados com o extrato de *Anadenanthera colubrina,* e em seguida, submetidos à fotoexposição.

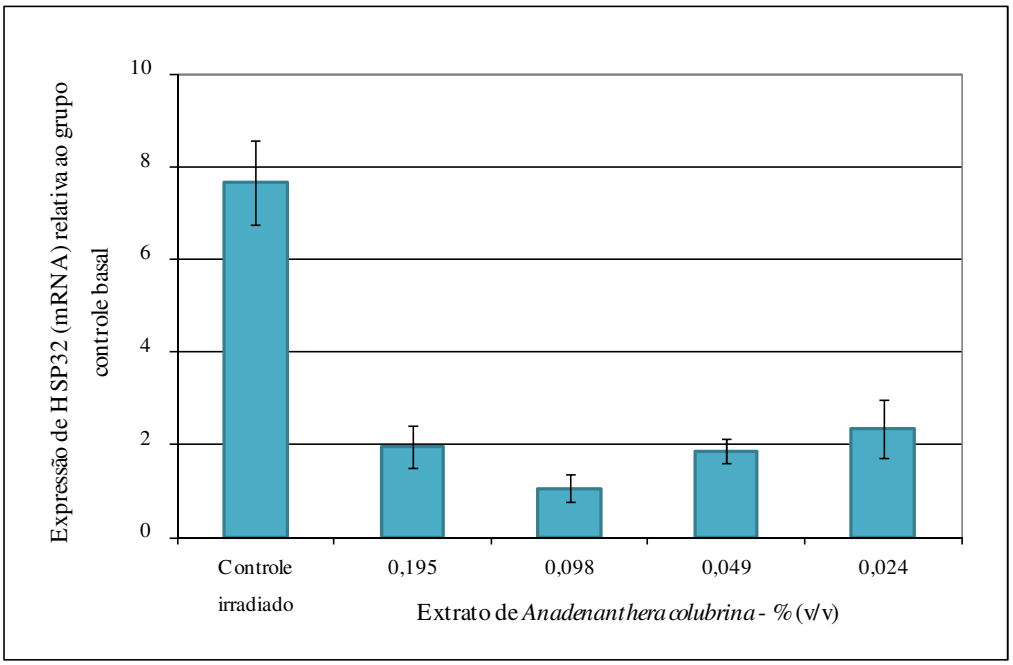


Figura 9**.** Expressão relativa de mRNA para HSP32 em culturas de fibroblastos humanos incubados com o extrato de *Anadenanthera colubrina* e, em seguida, irradiados com UVA. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

De acordo com a **Figura 9**, é possível observar que a expressão de HSP32 foi modulada positivamente após irradiação UVA, em culturas celulares não tratadas com extratos vegetais. O aumento de 7,75 vezes, em relação ao grupo controle basal, condiz com o resultado obtido por Applegate e colaboradores (1995). Nesse estudo, fibroblastos humanos apresentaram, 4 horas após exposição à radiação UVA, um aumento da expressão de HSP32 de aproximadamente 8 vezes em relação ao grupo controle.

Com relação aos grupos tratados, observou-se uma inibição do efeito estimulador da expressão de HSP32 induzido por UVA. Os grupos tratados com o extrato de *Anadenanthera colubrina* nas concentrações de 0,195; 0,098; 0,049 e 0,024 % (v/v) apresentaram, respectivamente, reduções na expressão gênica de 74 %, 86 %, 76 % e 69 % em relação ao controle irradiado. Tais valores mostram-se significativamente inferiores em comparação ao grupo controle irradiado, segundo método de análise de dados proposto por McCarthy e Smyth (2009).

A principal hipótese para justificar esse efeito inibidor envolve a composição fitoquímica do extrato de *Anadenanthera colubrina*. Segundo os dados disponíveis no ANEXO A, o extrato hidroglicólico de Angico-branco, é composto de 1,11 % de flavonóides totais, determinados através da técnica de Follin-Ciocalteu. Compostos fenólicos, tais como os flavonóides, são considerados agentes protetores dos efeitos deletérios da radiação UV, devido à presença de anéis aromáticos capazes de absorver a radiação (GUARATINI *et al*., 2009). A inibição de HSP32 em função do tratamento com flavonóides também é descrita na literatura. Em estudo realizado por Abate e colaboradores (2005), a incubação de fibroblastos murinos com o flavonóide apigenina reduziu os níveis protéicos e de mRNA para HSP32, induzidos por hemina.

Dessa forma, sugere-se que o efeito protetor frente à radiação UVA, exercido pelos flavonóides presentes no extrato de *Anadenanthera colubrina*, tenha impedido o aumento dos níveis de HSP32 em células humanas, visto que, nessas condições, não necessitam recorrer à tal mecanismo biológico de resistência frente ao estresse. A inferência de que o extrato de Angico-branco não atua como inibidor seletivo da expressão de HSP32 é corroborada pelos resultados expostos na **Figura 10**.

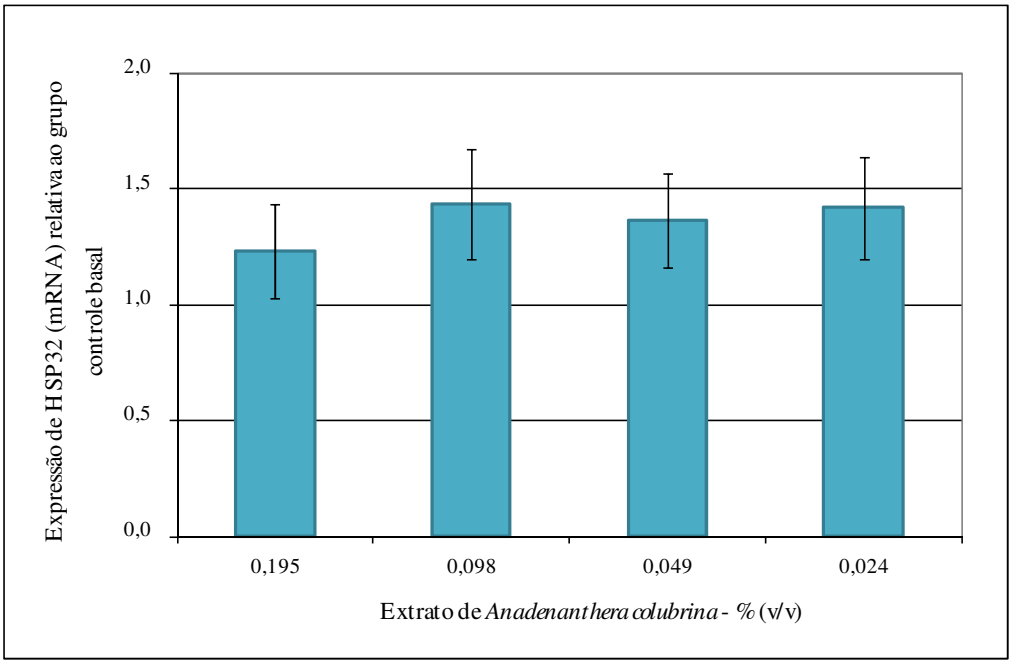


Figura 10**.** Expressão relativa de mRNA para HSP32 em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Anadenanthera colubrina*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

Na **Figura 10,** observa-se que o extrato de *Anadenanthera colubrina* não foi capaz de alterar significativamente a expressão de HSP32 em fibroblastos humanos em condição basal, apesar de se observar aumentos em relação ao grupo controle. Os grupos tratados com o extrato de *Anadenanthera colubrina* nas concentrações de 0,195; 0,098; 0,049 e 0,024 % (v/v) apresentaram, respectivamente, expressões relativas de 1,23; 1,44; 1,37 e 1,42 vezes superiores em relação ao controle basal. Dessa forma, pode-se afirmar que, apesar de o extrato de *Anadenanthera colubrina* não apresentar a capacidade biológica de estimular significativamente a expressão de HSP32, o mesmo possui potencial de utilização como protetor químico dos efeitos deletérios da radiação UV, devido à sua composição fitoquímica.

A avaliação da capacidade moduladora da expressão gênica das proteínas de estresse, avaliadas neste estudo, em fibroblastos humanos incubados com *Rhodiola rosea* e submetidos à radiação UVA, não pode ser realizada devido às baixas quantidades de RNA total extraído (ANEXO B). Os níveis de RNA total obtidos nesse grupo experimental mostraram-se muito inferiores em relação, por exemplo, aos grupos tratados com extrato de Angico-branco (ANEXO C). Uma possível justificativa para os

baixos valores de RNA total consiste na fototoxicidade do extrato de *Rhodiola rosea*, apesar de não serem encontrados na literatura trabalhos que descrevam a fototoxicidade da planta.

A **Figura 11** mostra os efeitos da incubação de fibroblastos humanos, em condição basal, com o extrato de *Rhodiola rosea*. Observa-se que o extrato vegetal foi capaz de elevar significativamente os níveis de expressão gênica de HSP32 em todas as concentrações avaliadas. Os grupos tratados com o extrato de *Rhodiola rosea* nas concentrações de 0,0048; 0,0024; 0,0012 e 0,0006 % (p/v) apresentaram, respectivamente, expressões relativas de 3,30; 5,35; 8,87 e 7,30 vezes superiores em relação ao controle basal.

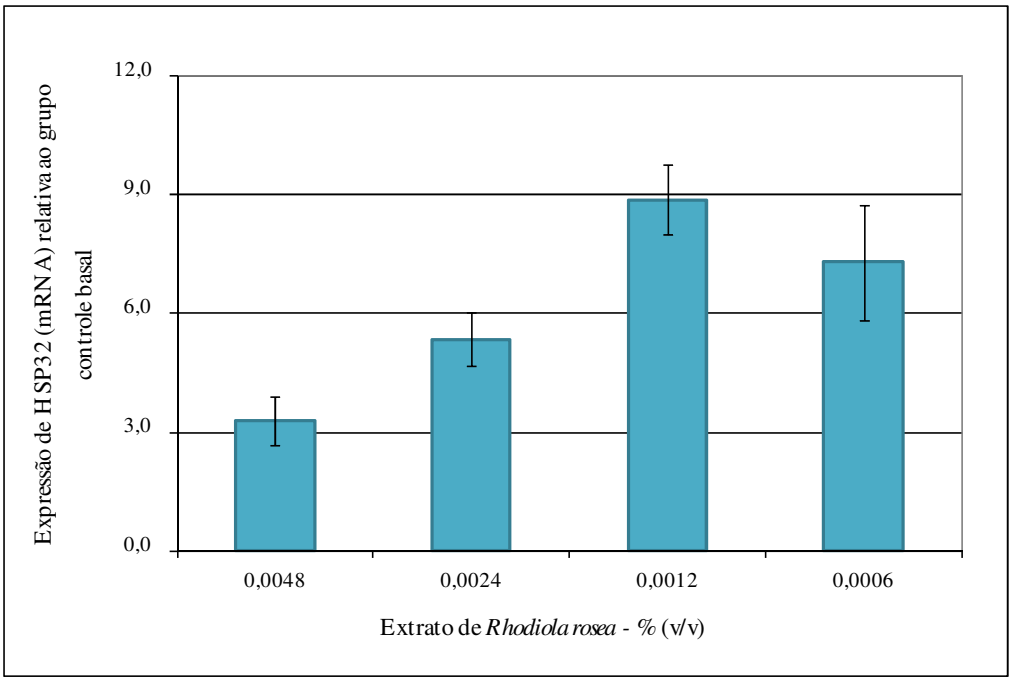


Figura 11**.** Expressão relativa de mRNA para HSP32 em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Rhodiola rosea*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

A atividade indutora de HSP32 exercida por *Rhodiola rosea* pode ser atribuída à presença do composto salidrosídeo, presente no extrato vegetal (DIEAMANT, 2008). Em estudo realizado por Zhang e colaboradores (2007), células de neuroblastoma

tiveram a expressão de HSP32 significativamente aumentada após a incubação com o composto salidrosídeo.

A capacidade indutora de HSP32 do extrato de *Rhodiola rosea* sugere o potencial de utilização do extrato como agente citoprotetor. Em um estudo realizado por Chen e colaboradores (2005), o tratamento com o composto resveratrol resultou em um aumento no mRNA, bem como nos níveis de proteína da HSP32. Para avaliar se o aumento da expressão induzida de HSP32 pelo resveratrol foi responsável pela citoproteção, células PC12 foram pré-tratadas com zinco protoporfirina, um inibidor de HSP32, e resveratrol 6 h antes da indução de morte celular pelo tratamento com peróxido de hidrogênio. Observou-se que a zinco protoporfirina atenuou o efeito protetor do resveratrol frente à citotoxicidade induzida, sugerindo que o efeito citoprotetor do resveratrol seja mediado através da indução de HSP32.

Outra importante função atribuída à HSP32 refere-se à atividade antioxidante. O aumento dos níveis de HSP32 catalisa a quebra do anel heme, molécula pró-oxidante que proporciona a produção de espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, provocam a peroxidação de lipídeos, desnaturação de proteínas e danos ao DNA (IMMENSCHUH; RAMADORI, 2000). Dessa forma, o extrato de *Rhodiola rosea* apresenta potencial de utilização como agente citoprotetor e antioxidante biológico, devido à sua capacidade de elevar a expressão gênica de HSP32.

6.4.2 HSP72

O papel biológico da família HSP70 foi estudado primeiramente quanto à sua relação com a termotolerância (JOHNSTON; KUCEY, 1988; MAYTIN; WIMBERLY; ANDERSON, 1990). Contudo, inúmeros outros agentes são capazes de estimular a expressão dessa classe de proteínas (CHARVERON; CALVO; GALL, 1995). De acordo com Trautinger e colaboradores (1999), a irradiação UVA é capaz de induzir a expressão de HSP72, com padrões semelhantes aos observados após o estresse térmico.

Nas **figuras 12** e **13** observa-se o aumento da expressão gênica de HSP72 mediante a exposição à radiação UVA, com valores variando entre 1,68 e 1,99 vezes

superior à expressão no grupo controle basal. O mecanismo que controla a expressão de HSP72 tem início devido à ativação do fator de transcrição HSF-1. O evento que desencadeia a ativação desse fator é a desnaturação de proteínas intracelulares que competem com o fator pela ligação às chaperonas da família HSP70. Por essa razão, o dano às proteínas intracelulares causado pela radiação UVA é capaz de promover a indução de HSP72 (TRAUTINGER *et al.*, 1999).

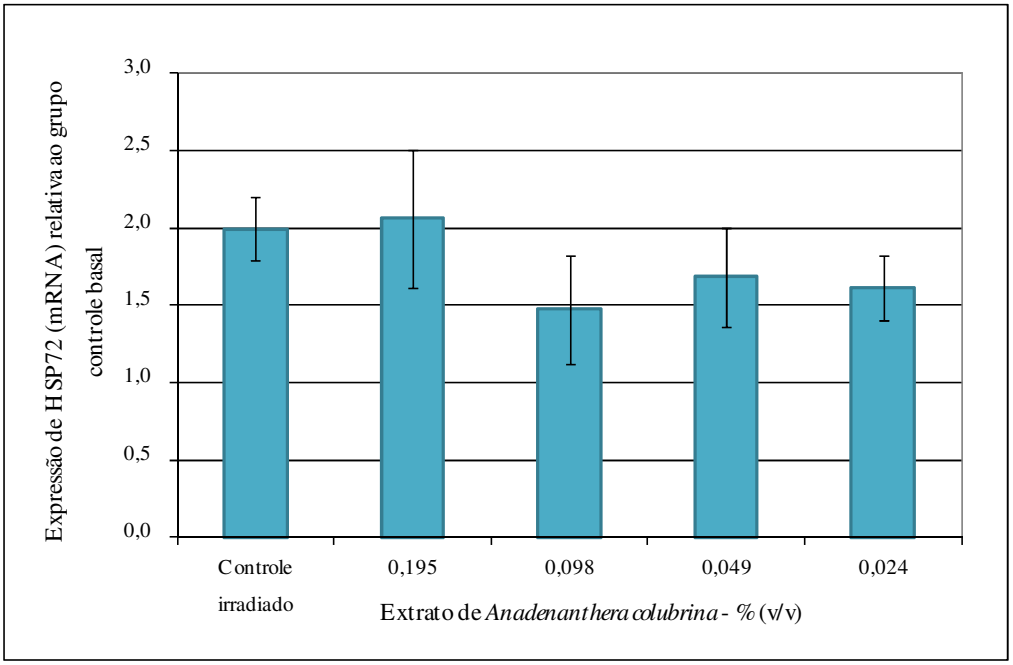


Figura 12**.** Expressão relativa de mRNA para HSP72 em culturas de fibroblastos humanos incubados com o extrato de *Anadenanthera colubrina* e, em seguida, irradiados com UVA. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

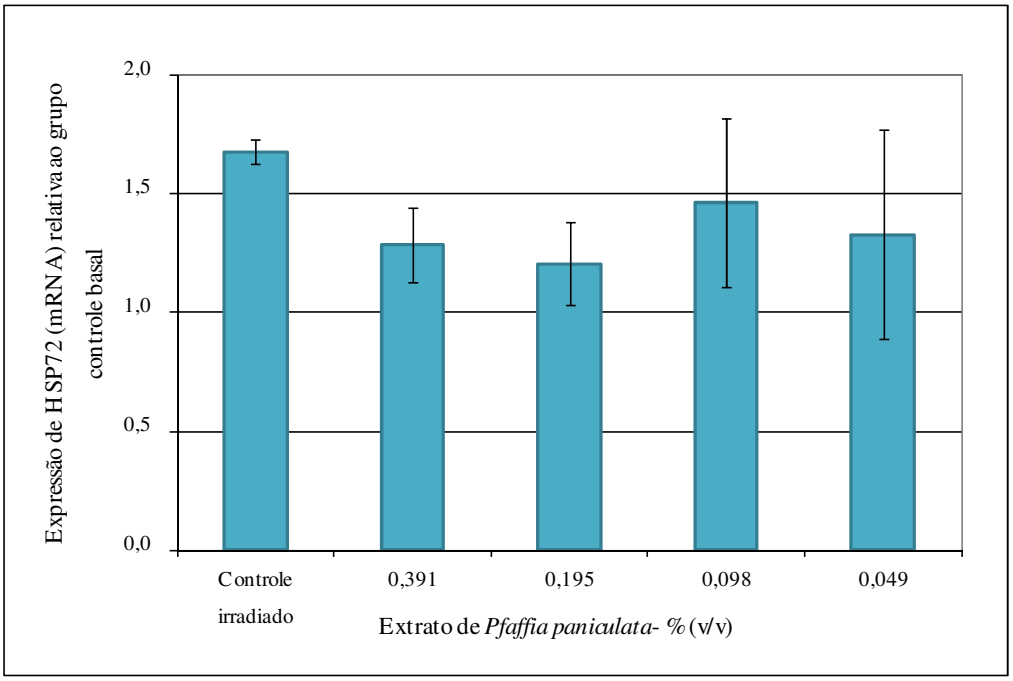


Figura 13**.** Expressão relativa de mRNA para HSP72 em culturas de fibroblastos humanos incubados com o extrato de *Pffafia paniculata* e, em seguida, irradiados com UVA. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

Com relação aos grupos tratados com os três extratos vegetais, não se observou em nenhum dos tratamentos, alterações da expressão de HSP72 significativas, ou seja, aumentos superiores a 1,5 vezes ou reduções inferiores a 0,5 vezes, em comparação ao grupo controle irradiado (**Figuras 12** e **13**).

Os tratamentos de culturas celulares, não submetidas à fotoexposição, com os extratos de *Rhodiola rosea* e *Pfaffia paniculata* também não foram capazes de modular a expressão gênica de HSP72, em qualquer uma das concentrações avaliadas (**Figuras 14** e **15**).

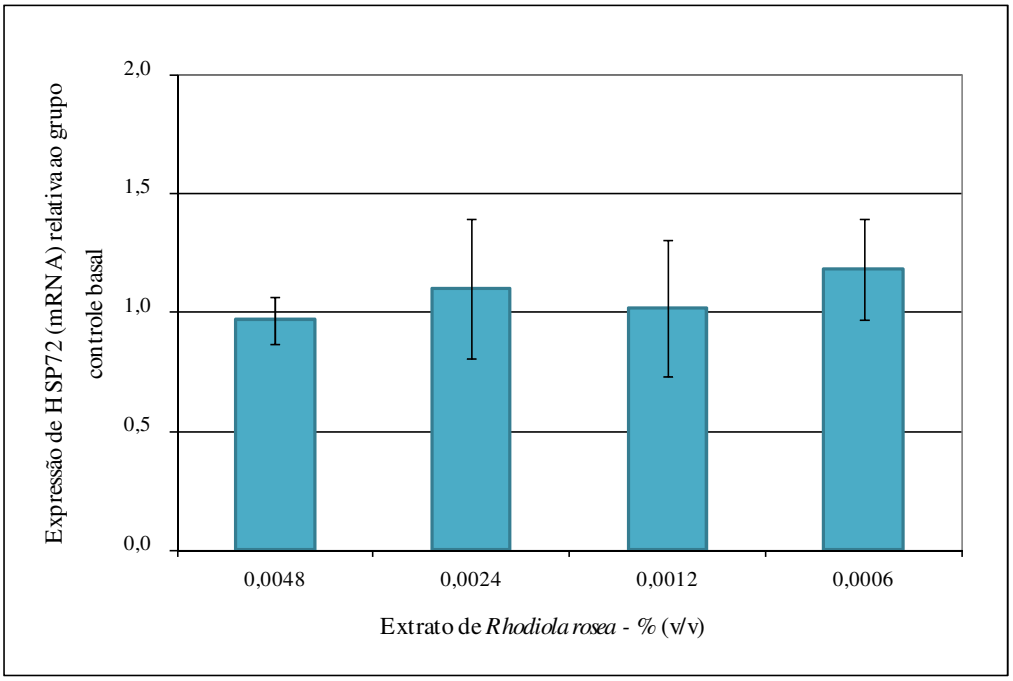


Figura 14**.** Expressão relativa de mRNA para HSP72 em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Rhodiola rosea*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

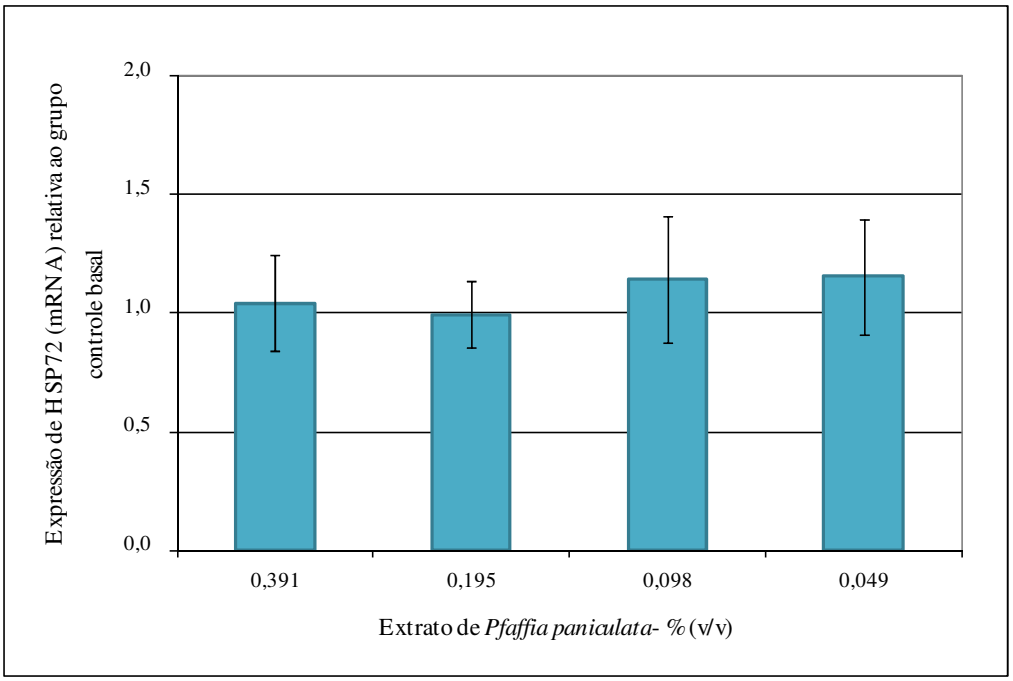


Figura 15**.** Expressão relativa de mRNA para HSP72 em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Pfaffia paniculata*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

Em contrapartida, o extrato de Angico-branco foi capaz de elevar de forma significativa a expressão gênica de HSP72 em culturas de fibroblastos humanos em condição basal (**Figura 16**). Na concentração de 0,098 % (v/v), o extrato de *A. colubrina* elevou os níveis de mRNA da chaperona molecular em 12,19 vezes em relação ao grupo controle basal. Nas concentrações de 0,195; 0,049 e 0,024 % (v/v), os aumentos observados foram de 4,89; 8,79 e 3,76 vezes, respectivamente.

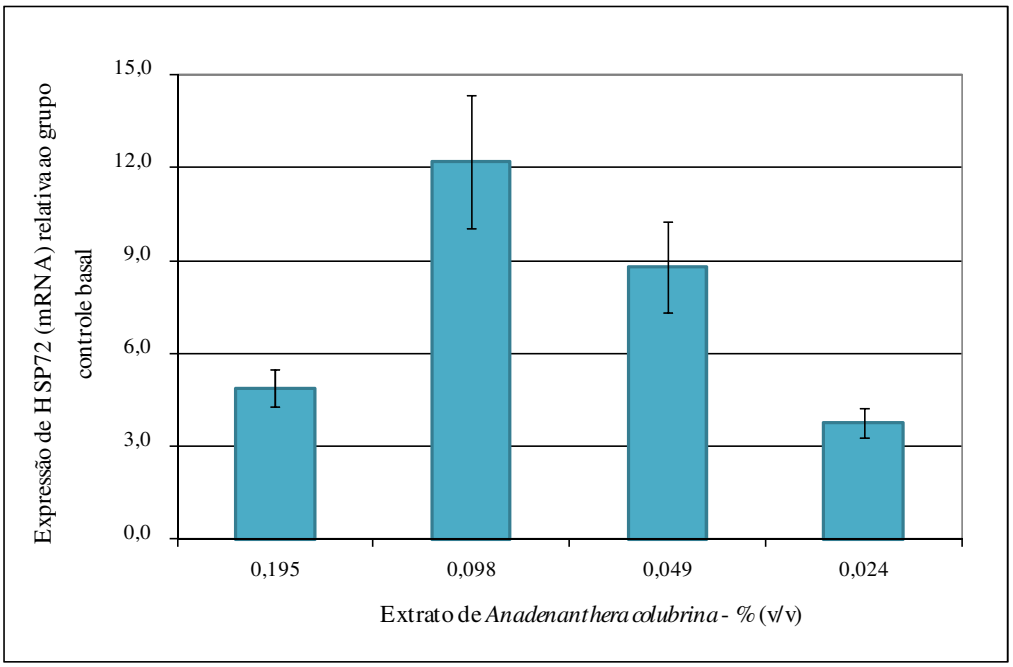


Figura 16**.** Expressão relativa de mRNA para HSP72 em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Anadenanthera colubrina*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

O conteúdo de compostos polifenólicos, representados principalmente por flavonóides, de *A. colubrina* pode justificar a capacidade do extrato vegetal de modular positivamente a expressão de HSP72. Sabe-se que as enzimas proteína quinase C (PKC), c-jun N-terminal quinase (JNK) e glicogênio sintase quinase (GSK) reprimem a ativação de HSF-1, ao interferirem na fosforilação do fator transcricional (VOELLMY, 2004). Considerando que diferentes compostos polifenólicos mostraram-se capazes de inibir tais enzimas (POZO-GUISADO *et al*., 2004; WOOD *et al*., 2004; KIM *et al*.,

2006), Putics e colaboradores (2008) sugeriram a existência de um mecanismo de ativação de HSF-1 dependente de tais compostos.

A atividade indutora de HSP72 do extrato de *A. colubrina* sugere o potencial do extrato vegetal para aplicação cosmética. Atribui-se à HSP72 a capacidade de reduzir a formação de proteínas oxidadas e glicoxidadas em fibroblastos humanos (VERBEKE; CLARK; RATTAN, 2001). Tal atividade deve-se, ao menos em parte, à sua habilidade de regular o estado redox celular através da modulação da atividade das enzimas glutationa redutase e glutationa peroxidase (GUO *et al.*, 2007). Dessa forma, o extrato de Angico-branco apresenta potencial de utilização em produtos cosméticos que previnam ou reduzam os efeitos da oxidação protéica, evento característico do fotoenvelhecimento (SANDER *et al.*, 2002).

A HSP72 ainda desenvolve papel importante na supressão da morte celular programada (apoptose). De acordo com diferentes grupos de pesquisa, a HSP72 previne a apoptose induzida por formas de estresse proteotóxicas. Como exemplo, a super-expressão de HSP72 foi capaz de prevenir a morte celular induzida por agentes que danificam o DNA, tais como radiação UVA (SIMON *et al.*, 1995) e etoposídeo (SAMALI; COTTER, 1996).

Por fim, a utilidade de compostos ou extratos vegetais que apresentam capacidade indutora de HSP72 é corroborada por exemplos de produtos comerciais que desempenham tal atividade. Culturas primárias de queratinócitos humanos, submetidas ao estresse térmico e, em seguida, tratadas com o produto RonaCare Ectoin® (Merck®) desenvolveram um pico de produção HSP72 em um intervalo de tempo inferior em comparação ao grupo não tratado (MERCK®, 2011). Outro ativo cosmético, Thermostressine™, de acordo com sua descrição comercial, é capaz de induzir a síntese de HSP72 e, portanto, tem como apelo comercial as funções de auxílio na resistência frente ao estresse e melhora da defesa natural da pele (LIPOTEC, 2011).

6.4.3 SIRT-1

SIRT-1 é membro de um grupo de proteínas denominado histona-desacetilases de classe III (NORTH; VERDIN, 2004). Essa proteína é capaz de desacetilar uma variedade de substratos e, portanto, está envolvida em uma ampla gama de funções fisiológicas, incluindo o controle da expressão gênica, metabolismo e envelhecimento (YAMAMOTO; SCHOONJANS; AUWER, 2007; MICHAN; SINCLAIR, 2007). O papel biológico de SIRT-1 na pele também tem sido investigado, especialmente em situações de estresse celular. Em um estudo avaliando os efeitos de condições estressantes sobre a síntese de SIRT-1, fragmentos de pele humana irradiados com UVB (50-200mJ/cm²) exibiram um aumento da expressão nuclear de SIRT-1 (IMBERT; FARRA; DOMLOGE, 2008). Nas **figuras 17** e **18** são exibidos os padrões de expressão gênica de SIRT-1 mediante exposição à radiação UVA.

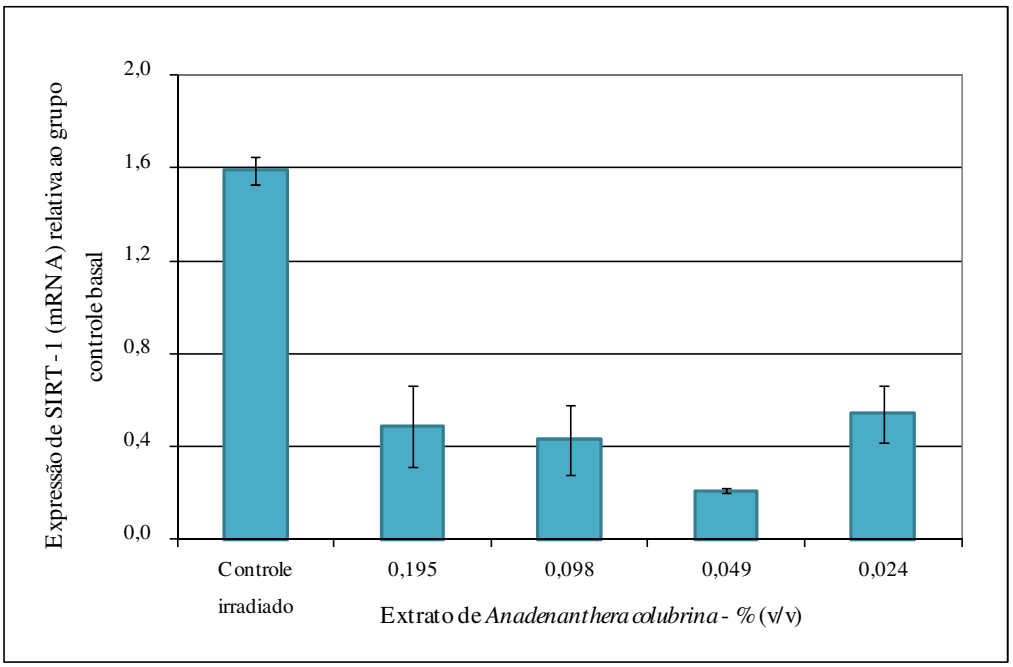


Figura 17**.** Expressão relativa de mRNA para SIRT-1 em culturas de fibroblastos humanos incubados com o extrato de *Anadenanthera colubrina* e, em seguida, irradiados com UVA. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

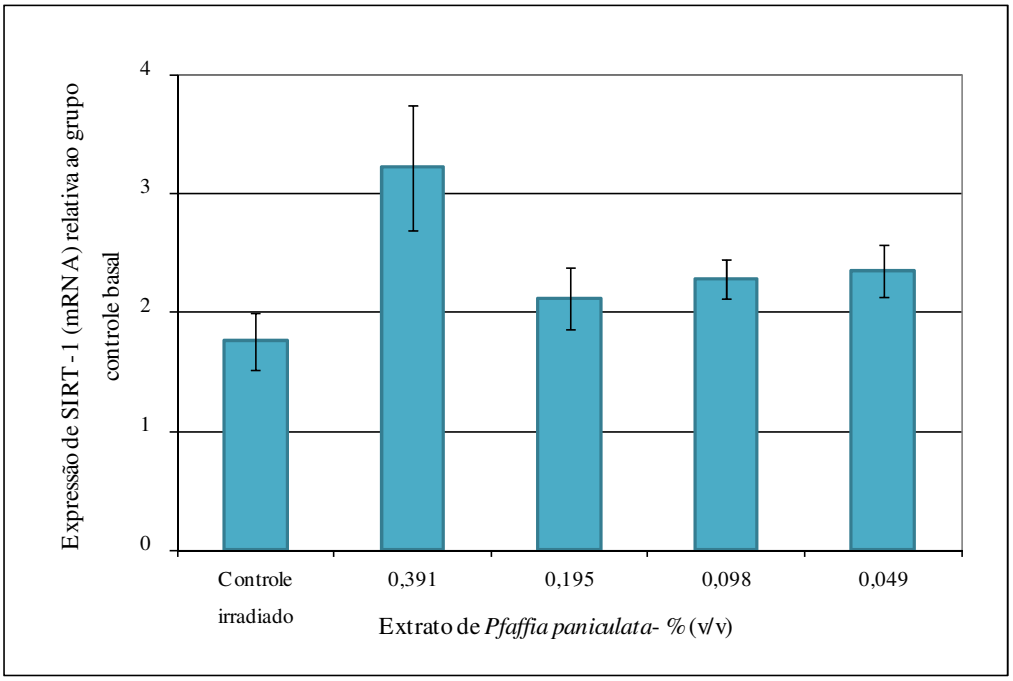


Figura 18**.** Expressão relativa de mRNA para SIRT-1 em culturas de fibroblastos humanos incubados com o extrato de *Pfaffia paniculata* e, em seguida, irradiados com UVA. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

De acordo com as **figuras 17** e **18**, é possível observar o efeito da radiação UVA sobre os níveis de mRNA para SIRT-1. Fibroblastos humanos submetidos à fotoexposição, e não tratados, tiveram a expressão gênica da proteína aumentada, com elevações de 1,59 e 1,76 vezes em relação aos níveis observados no grupo controle basal. A indução de SIRT-1 frente à exposição à radiação UVA foi recentemente demonstrada por Tian e colaboradores (2010). Nesse estudo, voluntários submetidos à radiação UVA três vezes por semana, durante 13 semanas, apresentaram os níveis de expressão de SIRT-1 elevados significativamente.

Entre os principais efeitos celulares da exposição à radiação UV-A, destaca-se a geração de danos no DNA, representados principalmente na forma de fotoprodutos ou quebra da molécula do material genético (DOUKI *et al*., 2003; COURDAVAULT *et al*., 2004). Tais injúrias ao DNA podem justificar o incremento dos níveis de SIRT-1 após a fotoexposição. Estudo realizado por Jeong e colaboradores (2007) demonstrou que SIRT-1 eleva a atividade de reparo do DNA, além de formar complexos com a proteína de reparo Ku70, em células submetidas à irradiação. Diversos outros trabalhos

relatam a capacidade de SIRT-1 em reparar o material genético após estímulos estressores (WANG *et al*., 2008; FAN; LUO, 2010; MING *et al*., 2010).

De acordo ainda com as **Figuras 17** e **18**, é possível observar os efeitos da incubação das culturas celulares com os extratos de *Anadenanthera colubrina* e *Pfaffia paniculata*, respectivamente, e, em seguida, irradiadas sobre a expressão gênica de SIRT1. O tratamento com o extrato de Angico-branco reduziu de forma significativa (reduções inferiores a 0,5 vezes) a expressão de SIRT-1 em todas as concentrações avaliadas, em comparação ao grupo controle não tratado e submetido à irradiação. Assim como proposto para o efeito inibidor de HSP32, sugere-se que regulação negativa da expressão de SIRT-1 decorra do efeito citoprotetor químico exercido pela composição fitoquímica de *Anadenanthera colubrina*, especialmente pelo conteúdo de flavonóides.

Em contrapartida, o extrato de *P. paniculata*, na concentração de 0,391 % (v/v), foi capaz de elevar em 82 % a expressão de SIRT-1 em relação ao grupo controle irradiado. O extrato hidroglicólico de *P. paniculata* também foi capaz de elevar significativamente a expressão gênica de SIRT-1 em cultura de fibroblastos humanos em condição basal (**Figura 19**). Nas concentrações de 0,391; 0,195 e 0,098 % (v/v), o extrato de *P. paniculata* promoveu aumentos de 2,3; 2,09 e 2,91 vezes em comparação ao grupo controle basal.

Já o extrato de *Rhodiola rosea* não foi capaz de alterar significativamente os níveis de mRNA para SIRT-1 em qualquer das concentrações avaliadas (**Figura 20**).

Nas mesmas condições, o extrato de *Anadenanthera colubrina*, assim como o extrato de *Pfaffia paniculata*, mostrou capacidade de induzir a expressão de SIRT-1 (**Figura 21**). Na concentração de 0,098 % (v/v), o extrato vegetal elevou em 91 % os níveis de mRNA para SIRT-1. A atividade indutora de SIRT-1 dos extratos de *Pfaffia paniculata* e *Anadenanthera colubrina* apresenta grande potencial devido à escassez de compostos descritos na literatura, capazes de modular positivamente essa proteína. Além do resveratrol, poucos trabalhos relatam a existência de ativadores ou indutores da expressão de SIRT-1, tais como buteína e visfatina (QUIDEAU, 2003; MOTTA *et al*., 2004; GRUBER *et al*., 2007; TERZIBASI *et al*., 2007).

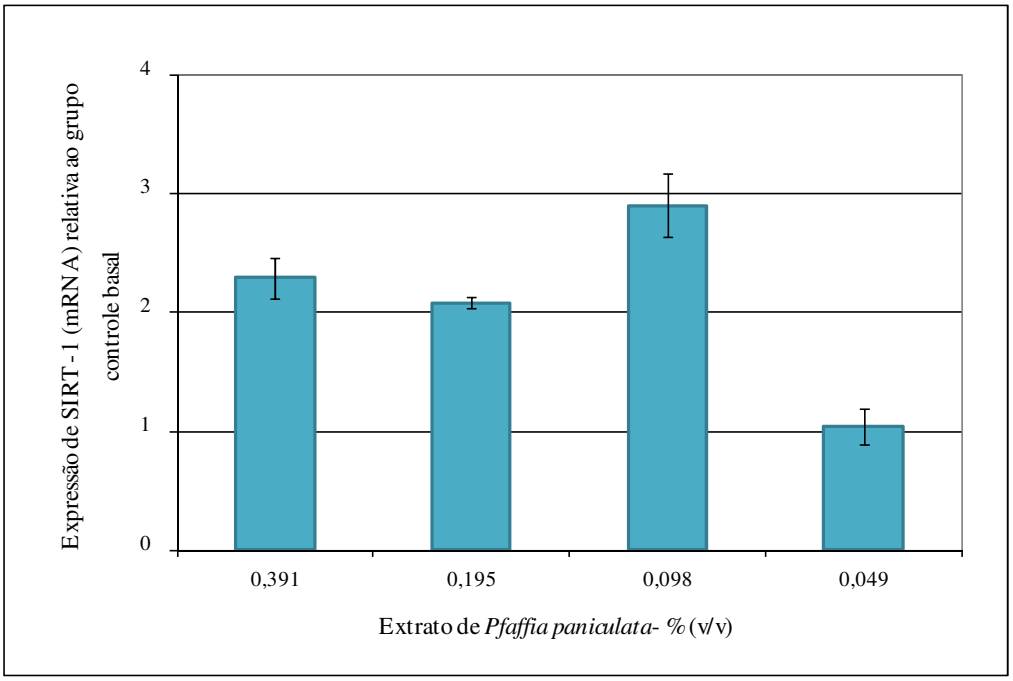


Figura 19**.** Expressão relativa de mRNA para SIRT-1 em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Pfaffia paniculata*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

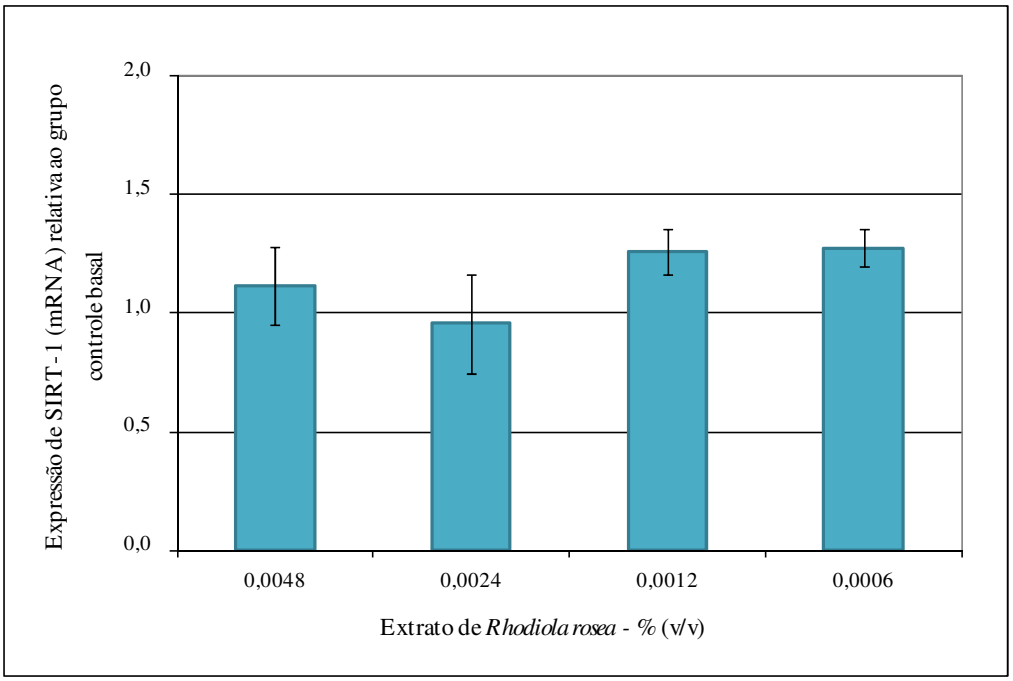


Figura 20**.** Expressão relativa de mRNA para SIRT-1 em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Rhodiola rosea*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

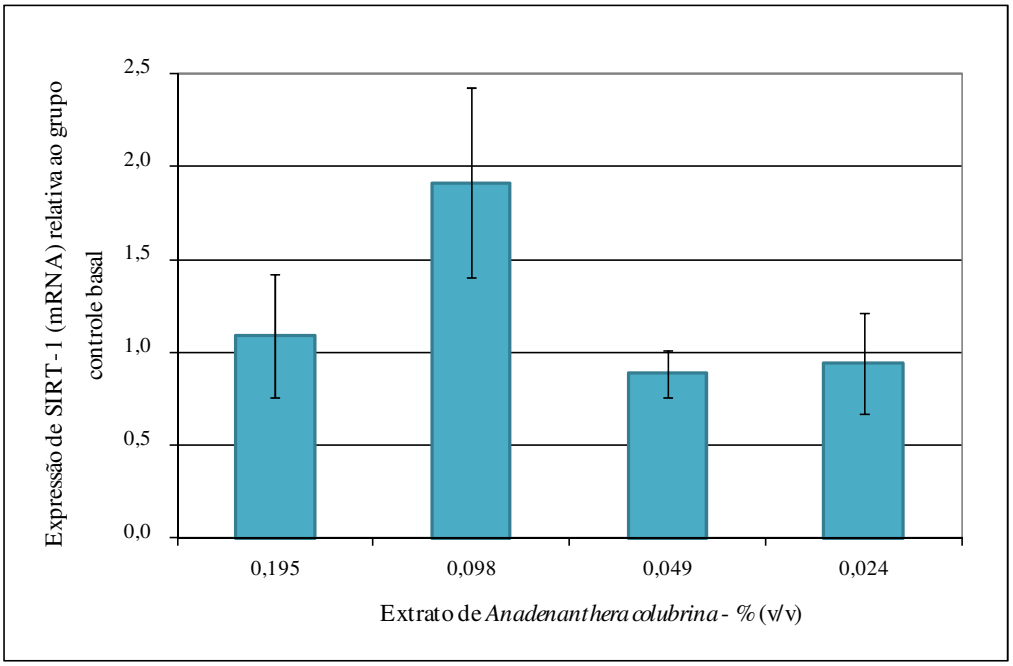


Figura 21**.** Expressão relativa de mRNA para SIRT-1 em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Anadenanthera colubrina*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

É importante destacar também o potencial dos extratos avaliados quanto à aplicação cosmética. Sirtuínas são proteínas que além de atuarem no reparo de danos ao DNA causados pela fotoexposição (WANG *et al*., 2008; FAN; LUO, 2010; MING *et al*., 2010), são descritas como agentes promotores da longevidade. Já foi mostrado que o período de vida de camundongos, incapazes de expressar SIRT-1, é reduzido tanto em condições normais como sob restrição calórica, um comprovado agente promotor da longevidade e indutor de SIRT-1 (LI *et al*., 2008).

Outra atividade de SIRT-1 que encontra importante aplicação cosmética é a de modular a expressão de metaloproteinases (MMPs). Ohguchi e colaboradores (2010) mostraram que a inibição seletiva de SIRT-1 elevou MMP-1 e MMP-3 em nível transcricional e protéico, em fibroblastos dérmicos humanos.

6.4.4 MT-I

Metalotioneínas é um grupo de polipeptídeos solúveis, ricos em cisteína e de baixo peso molecular. Duas isoformas de metalotioneínas, MT-I e MT-II, já foram detectadas na pele (COYLE *et al*, 2002). Estudos mostraram que MT-I exerce importantes funções relacionadas a ação antioxidante, ligação a metais pesados e fotoproteção (COYLE *et al*, 2002; ABLETT *et al*., 2003; TALBOURDET *et al*., 2007). Nas **Figuras 22** e **23**, são demonstrados os efeitos do tratamento de culturas celulares com os extratos vegetais de *Pfaffia paniculata* e *Anadenanthera colubrina* e, em seguida irradiadas, sobre a expressão gênica de MT-I.

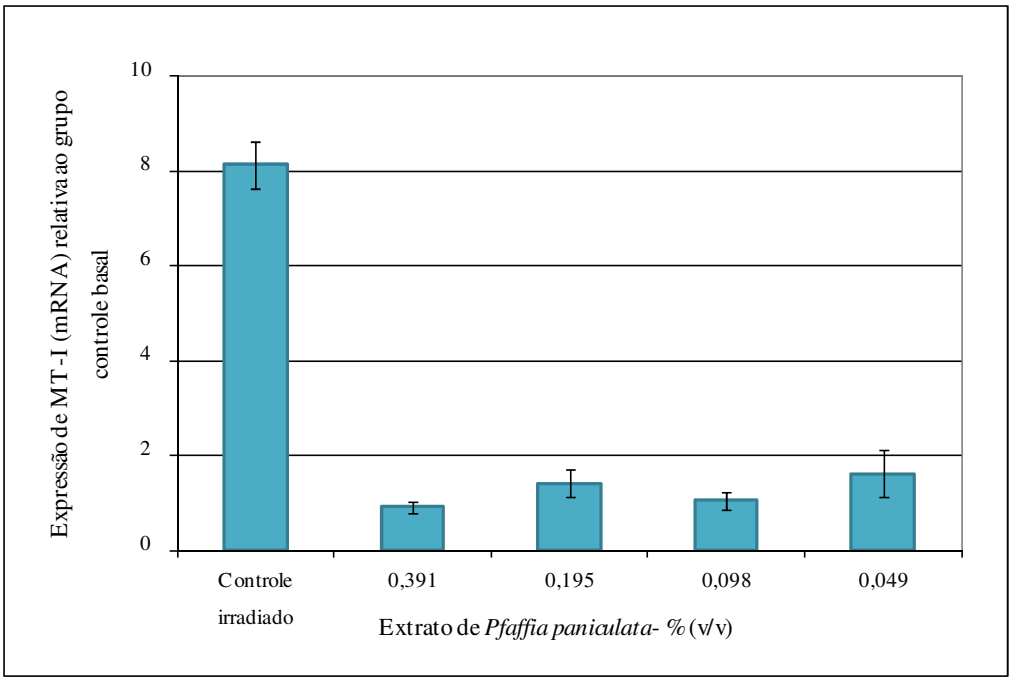


Figura 22**.** Expressão relativa de mRNA para MT-I em culturas de fibroblastos humanos incubados com o extrato de *Pfaffia paniculata* e, em seguida, irradiados com UVA. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

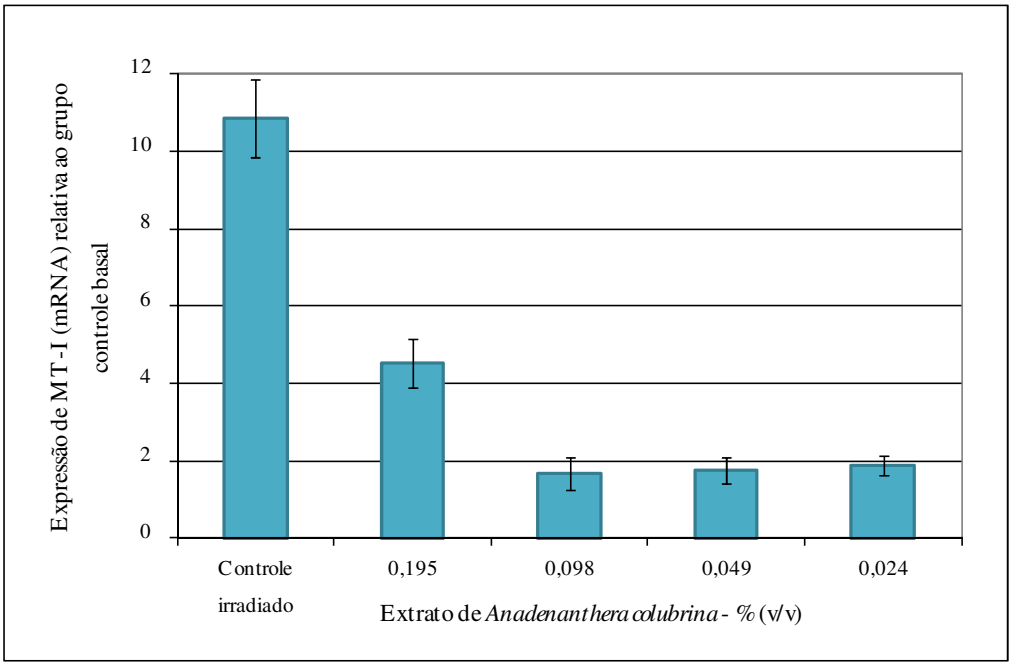


Figura 23**.** Expressão relativa de mRNA para MT-I em culturas de fibroblastos humanos incubados com o extrato de *Anadenanthera colubrina* e, em seguida, irradiados com UVA. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

De acordo com as **Figuras 22** e **23**, é possível observar que a irradiação UVA promoveu, isoladamente, em fibroblastos humanos aumentos da expressão de MT-I variando de 8,12 a 11,12 vezes em relação ao grupo controle não irradiado. Os efeitos da radiação UVA sobre a expressão de MT-I, em fragmentos de pele de camundongos, foram avaliados por Oguro e Yoshida (2001). Segundo o estudo, os níveis mRNA para MT-I foram elevados em 6 vezes, em comparação ao grupo controle, 4 h após a irradiação da pele.

De acordo ainda com as **figuras 22** e **23**, é possível observar o efeito inibidor da expressão de MT-I nos grupos tratados com os extratos vegetais, em comparação ao grupo controle irradiado. Nas concentrações de 0,391; 0,195 e 0,098 % (v/v), o extrato de *P. paniculata* promoveu reduções de 88 %, 82 %, 87% e 80 %, respectivamente, em comparação ao grupo controle irradiado. De forma semelhante, o extrato de *A. colubrina* promoveu, nas concentrações de 0,195; 0,098; 0,049 e 0,024 % (v/v), diminuições na expressão gênica de MT-I de 59 %, 84 %, 84% e 83 %, respectivamente.

A radiação UVA já foi demonstrada como agente indutor de MT-I, provavelmente, em função da geração de radicais livres (OGURO; YOSHIDA, 2001). Resultados semelhantes, aos observados nas **figuras 22** e **23,** foram relatados em um estudo, em que os compostos tocoferol e 1,4-Diazabiciclo [2,2,2] octano (DABCO), ambos agentes neutralizadores de espécies reativas de oxigênio, inibiram a expressão gênica de MT-I, previamente induzida pela exposição à radiação UVA (OGURO; YOSHIDA, 2001). Sugere-se, portanto, que a inibição da expressão de MT-I pelos extratos vegetais avaliados decorra da habilidade dos mesmos de reduzir ou prevenir os danos causados pela radiação, por outros mecanismos, tais como ação neutralizadora de radicais livres. Por essa razão, é possível que a célula não necessite recorrer à ativação da expressão gênica de metalotioneínas para suportar o estresse induzido.

A inferência quanto à atividade inibidora indireta da expressão gênica de MT-I pelos extratos de *P. paniculata* e *A. colubrina* em células submetidas à irradiação é corroborada pelos resultados mostrados na **Figuras 24** e **25**.

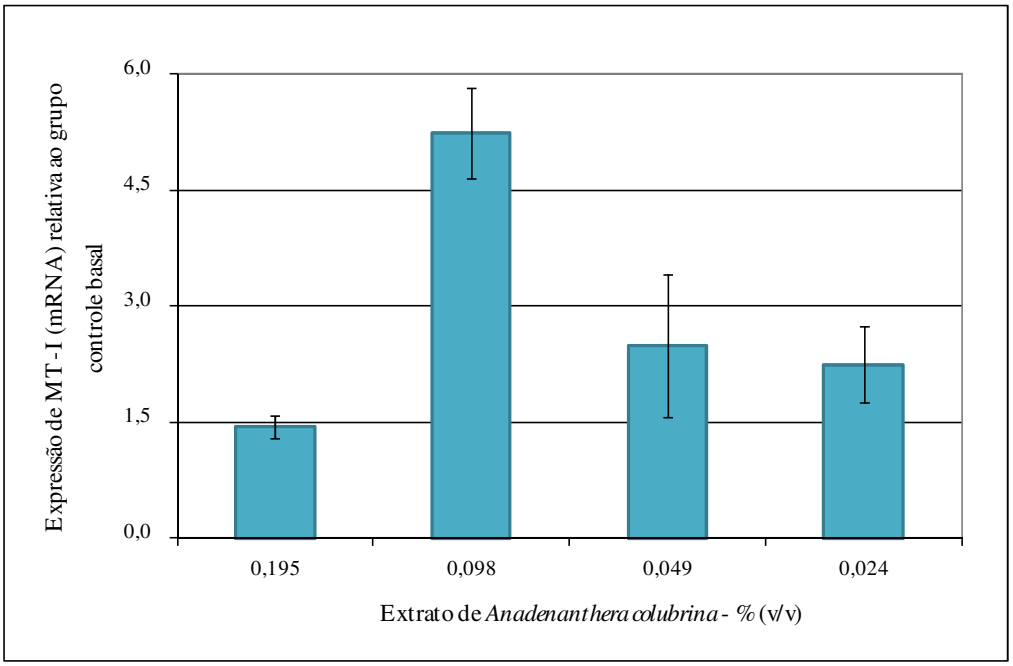


Figura 24**.** Expressão relativa de mRNA para MT-I em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Anadenanthera colubrina*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

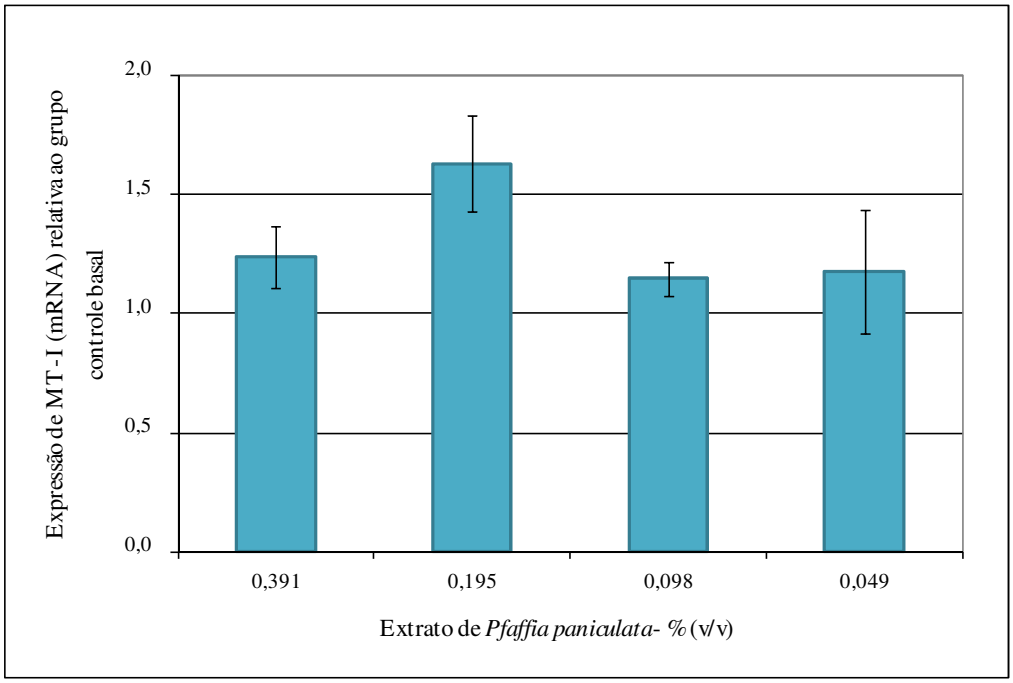


Figura 25**.** Expressão relativa de mRNA para MT-I em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Pfaffia paniculata*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

É possível observar que ambos os extratos foram capazes de modular positivamente a expressão gênica de MT-I em fibroblastos humanos sob condição basal. O extrato de *A. colubrina* promoveu, nas concentrações de 0,098; 0,049 e 0,024 % (v/v), aumentos na expressão gênica de MT-I de 5,24; 2,48 e 2,24 vezes, respectivamente, em comparação ao grupo controle basal (**Figura 24**). Nas mesmas condições, o extrato de *P. paniculata*, *n*a concentração de 0,195 (v/v), elevou em 63 % os níveis de mRNA para MT-I (**Figura 25**).

O extrato de *Rhodiola rosea* também mostrou-se capaz de induzir a expressão gênica da metalotioneína (**Figura 26**). Nas concentrações de 0,0048; 0,0024; 0,0012 e 0,0006 % (p/v), o extrato vegetal promoveu aumentos na expressão gênica de MT-I de 2,62; 1,87; 5,86 e 6,48 vezes, respectivamente, em comparação ao grupo controle basal.

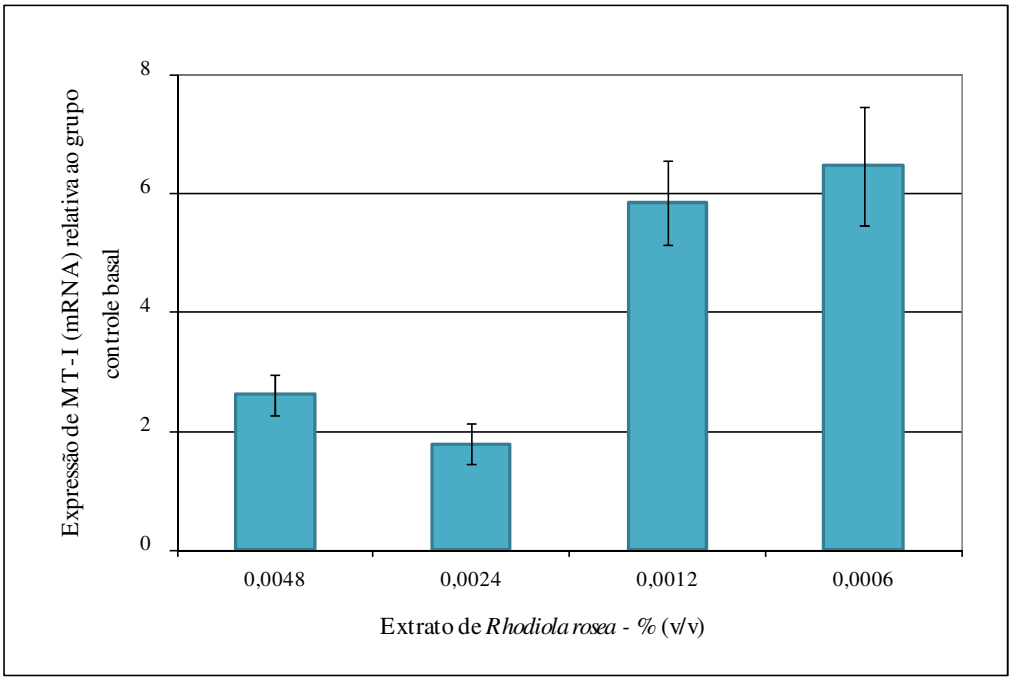


Figura 26. Expressão relativa de mRNA para MT-I em culturas de fibroblastos humanos em condição basal e incubados com o extrato de *Rhodiola rosea*. Os dados representam a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes.

Uma das principais atividades de MT-I é a função reparadora do material genético, que apresenta importante aplicação cosmética. De acordo com estudo realizado por Takaishi e colaboradores (2009), camundongos incapazes de expressar as metalotioneínas MT-I e MT-II apresentaram a freqüência de danos ao DNA, tais como fragmentação, formação de adutos e dano oxidativo, aumentada.

Outros estudos atribuem à metalotioneína importante ação antioxidante (HANADA *et al*., 1993; OTA; HANADA; HASHIMOTO, 1996). Em função de sua ação antioxidante, MT-I desenvolve, indiretamente, papel relevante no processo de despigmentação. Sabe-se que, durante o processo de pigmentação induzido por UV-B, queratinócitos secretam inúmeras citocinas, hormônios e mediadores químicos, tais como endotelina-1, hormônio de estimulação de melanócitos e prostaglandina E_2, os quais estimulam a produção de melanina (HACHIYA *et al*., 2004; TOMITA *et al*., 1987; BOLOGNIA; MURRAY; PAWELEK, 1989). Considerando a atividade antioxidante de MT-I, Ochiai e colaboradores (2008) avaliaram a capacidade do complexo glicina-Zn(II), um indutor de MT-I, de suprimir a produção de melanina

induzida por UV-B. De acordo com o estudo, o complexo mostrou-se capaz de reduzir a síntese do pigmento melanina, tornando-o um candidato a novo ativo cosmético clareador de pele.

Dessa forma, a capacidade indutora de MT-I dos extratos de *Anadenanthera colubrina*, *Pfaffia paniculata* e *Rhodiola rosea*, demonstrada no presente estudo, sugere o potencial de uso dos extratos em produtos cosméticos, devido, principalmente, às ações antioxidante e reparadora de danos no DNA.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo permitem concluir que:

- O extrato de *Anadenanthera colubrina* foi capaz de reduzir as expressões gênicas de HSP32, SIRT-1 e MT-I, em fibroblastos irradiados por UVA após incubação com o extrato vegetal, provavelmente, devido à capacidade citoprotetora química do extrato vegetal frente à radiação;
- O extrato de *Anadenanthera colubrina* foi capaz de modular positivamente as expressões gênicas de HSP72, SIRT-1 e MT-I, em fibroblastos sob condição basal;
- O extrato de *Pfaffia paniculata* foi capaz de suprimir a expressão de MT-I, além de elevar a expressão gênicas de SIRT-1, em fibroblastos irradiados por UVA após incubação com o extrato vegetal;
- Em fibroblastos humanos sob condição basal, o extrato de *Pfaffia paniculata* elevou os níveis de mRNA para SIRT-1 e MT-I;
- Por fim, o extrato de *Rhodiola rosea* mostrou-se capaz de aumentar as expressões de HSP32 e MT-I, em fibroblastos sob condição basal.

Dessa forma, sugere-se, de forma geral, que os extratos de *Pfaffia paniculata*, *Rhodiola rosea* e *Anadenanthera colubrina* apresentem potencial para atuarem como agentes antioxidantes biológicos, promotores da citoproteção celular e da longevidade celular devido à capacidade de estimularem a expressão gênica das proteínas de estresse. Devido a tal capacidade, os extratos vegetais avaliados tem potencial para utilização em produtos cosméticos, especialmente, com finalidade antienvelhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, A.; YANG, G.; WONG, R.J.; SCHRODER, H.; STEVENSON, D.K.; DENNERY, P.A. Apigenin decreases hemin-mediated heme oxygenase-1 induction. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, n.6, p.711-718, 2005.

ABLETT, E. *et al*. Induction of metallothionein n human skin by routine exposure to sunlight: evidence for a systemic response and enhanced induction at certain body sites. **Journal of Investigative Dermatology**, v.120, p.318–324, 2003.

ABRAVAYA, K. *et al*. The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. **Genes & Development**., v.6, p.1153–1164, 1992.

ADELMAN, R.; SAUL, R. L.; AMES, B. N. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.85, p.2706-2708, abr 1988.

ALLANSON, M.; REEVE, V. Immunoprotective UVA (320-400 nm) irradiation upregulates heme oxygenase-1 in the dermis and epidermis of hairless mouse skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.122, p.1030-1036, 2004.

AMES, B. N.; GOLD, L. S. Carcinogens and Human Health: Part 3 (Letter). **Science**, v.251, p.606-608, 1991.

ANSTEY, A. *et al*. *In vivo* photoinduction of metallothionein in human skin by ultraviolet irradiation. **Journal of Pathology**, v.178, p.84-88, jan 1996.

APPLEGATE, L.A. *et al*. Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, n. 3, p.285-291, 1995.

ASHRAF, N. *et al*. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. **British Journal of Cancer**, v.95, p.1056–1061, ago 2006.

BOLOGNIA, J.; MURRAY, M.; PAWELEK, J. UVB-induced melanogenesis may be mediated through the MSH-receptor system. **Journal of Investigative Dermatology**, v.92, p.651–656, 1989.

BONELLI, M. A. *et al*. Attenuated Expression of 70-kDa Heat Shock Protein in WI-38 Human Fibroblasts during Aging *in Vitro*. **Experimental Cell Research**, v.252, p.20-32, out 1999.

BREKHMAN, I. I.; DARDYMOV, I. V. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance, **Annual Review Pharmacology**, v.8, p.419–430, 1969.

BROOKS, C.L.; GU, W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? **Nature Reviews Cancer**, v.9, p.123–128, 2009.

CALABRESE, E.J. Hormesis and medicine. **British Journal of Clinical Pharmacology,** v.66, p.594–617, 2008.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, ago 2005.

CALTABIANO, M.M. *et al*. Induction of 32- and 34-kDa stress proteins by sodium arsenite, heavy metals, and thiol-reactive agents. **Journal of Biological Chemistry**, v.261, p13381-13386, 1986.

CAO, C. *et al*. SIRT1 confers protection against UVB- and H_2O_2-induced cell death via modulation of p53 and JNK in cultured skin keratinocytes. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.9999, n.999a, p.1582-4934, jul 2008.

CARLINI, E. A.. Efeito adaptógeno ou resistógeno de algumas plantas. In: Buchillet, D. **Medicinas tradicionais e medicina ocidental na Amazônia.** Edições Cejup, Belém, 1991, p.45-59.

CHARVERON, M.; CALVO, M.; GALL, Y. Cell stress and implications of the heat-shock response in skin. **Cell Biology and Toxicology**, v.11, n.3-4, p.161-5, 1995.

CHEN, X.L.; KUNSCH, C. Induction of cytoprotective genes through NRF2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. **Current Pharmaceutical Design,** v.10, p.879–891, 2004.

CHEN, C.Y. *et al*. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.331, n.4, p.993-1000, 2005.

CHEN, T.S.; LIOU, S.Y.; CHANG, Y.L. Antioxidant evaluation of three adaptogen extracts. **American Journal of Chinese Medicine**, v.36, p.1209-17, 2008.

COMISSÃO DE HOMEOPATIA E FITOTERAPIA DO SINDUSFARM-SP. **Lista de plantas SINDUSFARM**. São Paulo: SINDUSFARM, p.9-13, 1995.

COURDAVAULT, S. *et al*. Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.556, n.1-2, p.135-142, 2004.

COYLE, P. *et al*. Metallothionein: the multipurpose protein. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.59, p.627–647, 2002.

DAHLGGARD, J. *et al*. Induced thermotolerance and associated expression of the heat-shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. **Functional Ecology**, v.12, p.786-93, 1998.

DE PARIS, F. *et al*. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng (Amaranthaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.261-269, 2000.

DIEAMANT, G. C. Resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele relacionada ao fotoenvelhecimento: avaliação *in vitro* e clínica de um novo composto como alternativa terapêutica em dermatologia. 2008. 357 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; TALALAY, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. **Molecular Nutrition & Food Research,** v.52 (Suppl 1), p.S128-S138, 2008.

DONG, K. K. *et al*. UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. **Experimental Dermatology**, v.17, p.1037–1044, dez 2008.

DOUKI, T. *et al*. Bipyrimidine Photoproducts Rather than Oxidative Lesions Are the Main Type of DNA Damage Involved in the Genotoxic Effect of Solar UVA Radiation. **Biochemistry**, v.42, n.30, p.9221–9226, 2003.

DUNN, M. A.; BLALOCK, T. L.; COUSINS, R. J. Metallothionein. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicined**, v.185, p.107-119, 1987.

DUNSMORE, K. E.; CHEN, P. G.; WONG, H. R. Curcumin, a medicinal herbal compound capable of inducing the heat shock response. **Critical Care Medicine**, v.29, n.11, p.2199-2204, nov 2001.

EBERLIN, S. Avaliação dos efeitos de um ativo dermocosmético composto pelos extratos de *Pfaffia paniculata* e *Ptychopetalum olacoides* na prevenção e tratamento de desordens periorbitais. 2008. 203 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

FAN, W.; LUO, J. SIRT1 Regulates UV-Induced DNA Repair through Deacetylating XPA. **Molecular cell**, v.39, n.2, p.247-258, 2010.

FARIAS, T.S.M.A. Pele e Anexos. In: MAIO, M. **Tratado de Medicina Estética**. v.1 São Paulo: Roca, 2004, cap 2, p.19-35.

FEBBRAIO, M. A.; KOUKOULAS, I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.89, p.1055-1060, set 2000.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M.W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, n.2-3, p.126-39, 2006.

FLORIAŃCZYK, B. Metallothioneins and its role in metal regulation, binding of reactive oxygen species, apoptosis and cell differentiation. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, v.1, n.1, p.16-18.

FREEMAN, S.E. *et al*. Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, p.5605-9, jul 1989.

FULDER, S. The Drug that builds Russians, **New Scientists**, v.21, p.83–84, 1980.

GABORAN, F., et al. Membrane damage induced in cultured human skin fibroblast by UVA irradation. **Photochemistry and Photobiology,** v.58, p.515-520, 1993.

GANZERA, M.; YAYLA, Y.; KHAN, I.A. Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L. (golden root) by reversed phase high performance liquid chromatography, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.49, p.465–467, 2001.

GATTEFOSSÉ, 2007. Apresenta a descrição do produto ZIN'CÎTE™. Disponível em: <http://www.gattefosse.fr/internet/gatt-wk3.nsf/TECHDOCPARCLEFPOPUP/PRD00003531?OpenDocument>. Acesso em: 22 mar 2009.

GILCHREST, B.A. **Photodamage.** Cambridge, New York, 1995. 295p

GILCHREST, B.A. Dermatoheliosis (sun-induced aging). In: GILCHREST, B.A. **Skin and Aging Processes**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989. p.97–116.

GRUBER, J.; TANG, S.Y.; HALLIWELL, B. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1100, p.530–542, 2007.

GUARATINI, T. *et al*. Natural products derived sunscreen: market perspectives and interactions between business and research institutes. **Quím. Nova**, vol.32, n.3, p.717-721, 2009.

GUO, S. *et al*. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress Chaperones*, v.12, p.245-254, 2007.

HACHIYA, A. *et al*. G. Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. **American Journal of Pathology**, v.165, p.2099–2109, 2004.

HANADA, K. *et al*. Possible role of cutaneous metallothionein in protection against photo-oxidative stress--epidermal localization and scavenging activity for superoxide and hydroxyl radicals. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v.9, n.5, p.209-213, 1993.

HANADA, K.. *et al*. Possible role of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced metallothionein in photoprotection against UVB injury in mouse skin and cultured rat keratinocytes. **Journal of Dermatological Science**, v.9, n.3,p.203-208, 1995.

HANADA, K.. *et al*. Epidermal proliferation of the skin in metallothionein-null mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v.110, p.259–62, 1998.

HANADA, K. Photoprotective role of metallothionein in UV-injury - metallothionein-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet-B. **Journal of Dermatological Science**, v.53, p.S51-S56, mar 2000.

HENDRICK, J.P.; HARTL, F.U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v.62, p.349-384, 1993.

HIWASA, T.; SAKIYAMA, S. Increase in the synthesis of a Mr 32,000 protein in BALBic 3T3 cells after treatment with tumor promoters, chemical carcinogens, metal salts, and heat shock. **Cancer research**, v.46, p.2474-2481, 1986.

HOEHNE, F.C. **Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais**, Graphicars, São Paulo, SP, p. 355, 1939.

HOWITZ, K. T. *et al*. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature** v.425, p.191-196, ago 2003.

IKEYAMA, S., *et al*. Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. **The FASEB Journal,** v.16, p.114–116, 2001.

IMBERT, I.; FARRA, C.; DOMLOGE, N. Sirtuins: A Breakthrough in Antiaging Research. **Cosmetics & Toiletries**, v.123, p.69-74, 2008.

IMMENSCHUH, S.; RAMADORI, G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. **Biochemical Pharmacology**, v.60, n.8, p.1121-1128, 2000.

INSTITUCIONAL ANNA PEGOVA. Apresenta a descrição de produtos comercializados pela empresa. Disponível em: http://www.annapegova.com.br/institucional.asp?id=204&pid=21B3EC13E83346C4980429F24957D54A66249721. Acesso em: 21 mar 2009.

JANTSCHITSCH, C. *et al*. The influence of heat shock on DNA-repair after UVB. **Journal of Investigative Dermatology**, v.119, p.739, 2002.

JEONG, J. *et al*. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. **Experimental and Molecular Medicine**, v.39, p.8-13, fev 2007.

JOHNSTON, D.; OPPERMANN, H.; JACKSON, J.; LEVINSON, W. Induction of four proteins in chick embryo cells by sodium arsenitc. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.6975-6980, 1980.

JONAK, C.; KLOSNER, G.; TRAUTINGER, F. Heat shock proteins in the skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v.28, p.233-241, mar 2006.

JURIVICH, D.A., et al. Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. **Science**, v.255, p.1243-1245, 1992.

KAMADA, T., et al. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy,** v. 31, n. 3, p. 403-409, 2009.

KANE, K. S.; MAYTIN, E. V. Ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes in murine skin is reduced by mild local hyperthermia. **Journal of Investigative Dermatology**, v.104, p.62–67, jan 1995.

KANG, H.S., et al. Regulatory roles of *Chrysanthemum zawadskii* roots in nuclear factor E2-related factor 2/antioxidant response element pathway. **Food Science *and* Biotechnology,** v.17, p.367–372, 2008.

KARTEN, B. *et al*. A. Mechanism of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. **Chemistry Physics of Lipids**, v.88, p.83-96, ago 1988.

KAWAGUCHI, Y. Effect of Reactive Oxygen Species on the Elastin mRNA Expression in Cultured Human Dermal Fibroblasts. **Free Radical Biology and Medicine**, v.23, n.1, p.162-165, 1997.

KELLY, G. S. *Rhodiola rosea*: A Possible Plant Adaptogen. **Alternative Medicine Review**, v.6, p.293-302, 2001.

KEYSE, S.M.; TYRRELL, R.M. Both ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.14821-14825, 1987.

KEYSE, S. M.; TYRREL, R. M. Induction of the heme oxygenase gene in human skin fibroblasts by hydrogen peroxide and UVA (365 nm) radiation: evidence for the involvement of the hydroxyl radical. **Carcinogenesis**, v.11, n.5, p.787-791, 1990.

KIM, K-B, et al. Anti-oxidative Activities of Commercial Edible Plant Extracts Distributed in Korea. **Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.49, n.4,p.328-333, 2006.

KOBAYASHI, A, et al. Oxidative and Electrophilic Stresses Activate NRF2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. **Molecular and Cellular Biology**, v.26, n.1, p.221-229, jan, 2006.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. **Biomedicine and pharmacotherapy**, v.53, p.18l-192, mai 1999.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Livraria e Editora Medfarma, 2004. 234 p.

LI, Y. *et al*. SIRT1 inhibition reduces IGF-1 / IRS-2 / Ras / ERK1 / 2 signaling and protects neurons. **Cell Metabolism**, v.8, p.38–48, 2008.

LINH, P.T. *et al*. Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography. **Archieves Pharmaceutical Researches,** v.23, p349-352, 2000.

LIPOTEC. Thermostressine: no signs of stress in skin. Disponível em: <http://www.lipotec.com/archivos/Thermostressine_E.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2011

LISTOPAD, J. *et al*.Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells. **Experimental Dermatology**, v.16, p.661 – 670, 2007.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}{}_{T}$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, fev 2001.

LJUNGMAN, M.; ZHANG, F. Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for uv light-induced apoptosis. **Oncogene**, v.13, p.823–831, 1996.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512p, 2002.

LUO, J. *et al*. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. **Cell**, v.107, p.137–148, out 2001.

MA, C.Y. *et al*. Simultaneous determination of six active compounds in *Rhodiola l.* by RP-LC, **Chromatographia**, v.67, p.383–388, 2008.

MCCARTHY, D.J.; SMYTH, G.K. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. **Bioinformatics**, v.25, n.6, p.765-771, 2009.

MAINES, M. D. **Heme Oxygenase: Clinical Applications and Functions**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992, 288p.

MALAVOLTA, M. *et al*. Metallothionein Downregulation in Very Old Age: A Phenomenon Associated with Cellular Senescence? **Rejuvenation Research**, v.11, n.2, p.455-459, abr 2008.

MARROT, L.; MEUNIER, J.R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **Journal of the American Academy of Dermatology**, n.5, p.139-148, mai 2008.

MASAKI, H. *et al*., A zinc(II)–glycine complex is an effective inducer of metallothionein and removes oxidative stress.

Journal of Dermatological Science, v.45, p.73-75, 2007.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. **Front. Biosci**. v.7, p.765–783, 2002.

MAZZANTI, G.; BRAGHIROLI, L. Analgesic antiinflamatory action of Pfaffia paniculata (Martius) Kuntze. **Phytotherapy Research**, v. 8, p.413-416, 1994.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.493-500, set 2006.

MENZEL, D.B. The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress. **Toxicol. Lett**. v.72, p.269–277, 1994.

MERCK. RonaCare® Ectoin - Defesa e Proteção contra Estresse. Disponível em:

<http://www.merck-chemicals.com.br/cosmetic-ingredients/stress-defense-and-stress-protection/c_zY6b.s1ODP4AAAEdJu0MDnYj>. Acesso em: 18 nov. 2011.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochemical Journal**, v.404, n.1, p.1–13, 2007.

MING, M. *et al*. Regulation of global genome nucleotide excision repair by SIRT1 through xeroderma pigmentosum C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, n.52, p.22623–22628, 2010.

MINOWADA, G.; WELCH W. I. Clinical implications of the stress response. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, p.3-12, jan 1995.

MIYAUCHI, Y.; YASHIMOTO, T,; MINAMI, K. Extractives of hardwood, IX, Extractives from hertwoods of *Piptadenia sp*. **Mokuzai gakkaishi**, v.22, n.1, p.47-50, 1976.

MOI *et al*. Isolation of NF-E2-related factor 2 (NRF2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, p.9926–9930, 1994.

MONOGRAPH. Rhodiola Rosea. Alternative Medicine Review, v.7, n.5, p.421-423, 2002.

MONTAGNA, W.; CARLISLE, K. Structural changes in aging human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.73, p.47–53, 1979.

MOREAU, M. *et al*. Enhancing cell longevity for cosmetic application: a complementary approach. **Journal of Drugs in Dermatology**, v.6, p.14-19, jun 2007.

MORIMOTO, R.I.; SARGE, K.D.; ABRAVAYA, K. Transcriptional regulation of heat shock genes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.21987-90, 1992.

MORIMOTO, R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. **Genes & Development**, v.12, p.3788-96, 1998.

MOTTA, M. C. *et al*. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. **Cell**, v.116, p.551-563, fev 2004.

MOTTERLINI, R. *et al*. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n.8, p.1303-1312, abr 2000.

MUKHERJEE, S. *et al*. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. **Free Radical Biology & Medicine**, v.46, p.573–578, 2009.

NAKAI, S. et al. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v.23, p.1703-1705, 1984.

NORIEGA, L.G; FEIGE, J.N.; CANTO, C.;YAMAMOTO, H.; YU, J.; HERMAN, M.A.; MATAKI, C.; KAHN, B.B.; AUWERX, J. CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. **EMBO Reports**, v.30, n.12, p.1069-1076, 2011.

NORTH, B. J.; VERDIN, E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. **Genome Biology**, v.5, p.224-225, abr 2004.

OCHIAI, Y. *et al*. A Zn(II)–glycine complex suppresses UVB-induced melanin production by stimulating metallothionein expression. **International Journal of Cosmetic Science**, v.30, n.2, p.105–112, 2008.

OLIVEIRA, F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze - o ginseng-brasileiro. **Revista brasileira farmacognosia.** v.1, p.86-92, 1986.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, C.; AKISUE, M.K. Contribuição para o estudo farmacognóstico do "Ginseng Brasileiro" *Pfaffia paniculata* (Martins) Kuntze. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, São Paulo, v. 20, p. 261-277, 1980.

OGURO, T.; YOSHIDA, T. Effect of ultraviolet A on ornithine decarboxylase and metallothionein gene expression in mouse skin. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v.17, n.2, p.71-78, 2001.

OHGUCHI, K. *et al*. SIRT1 modulates expression of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts**. British Journal of Dermatology**, v.163, n.4, p.689–694, 2010.

ORGANIC MONITOR. The North American Market for Natural & Organic Personal Care Products. Report: 3001-60. Disponível em:

<http://www.marketresearch.com/vendors/viewvendor.asp?g=1&vendorid=2701>. Acesso em: 22 Maio 2011.

OTA, H. *et al*. Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.43, p.571-579, nov 2007.

OTA, T.; HANADA, K.; HASHIMOTO, I. The Effect of Cold Stress on UVB Injury in Mouse Skin and Cultured Keratinocytes. **Photochemistry and Photobiology**, v.64, n.6, p.984–987, 1996.

PANOSSIAN, A. *et al*. Adaptogens exert a stress-protective effect by modulation of expression of molecular chaperones. **Phytomedicine**, v.16, p.617-622, fev 2009.

PARIS, R.; SAINT-FIRMIN, A.; ETCHEPARE S. On the alkaloids and flavonoids of a leguminous plant of Haiti: Piptadenia peregrina Benth. Absence of alkaloids in Piptadenia africana Hook. **Ann Pharm Fr**, v.25, n.7, p.509-513, 1967.

PAUL, R.G.; BAILEY, J. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,** v.28, p.1297–1210, 1996.

PENKOWA, M. *et al*. Exercise-induced metallothionein expression in human skeletal muscle fibres. Experimental Physiology, v.90, p.477-486, jul 2005.

PEYREFITTE, G. *et al*. **Cosmetologia, biologia geral e biologia da pele**. São Paulo: Ed. Andrei, 1998, 1ed, 508p.

PFAFFL, M. Quantification strategies in real-time PCR In: BUSTIN, S. **A-Z of quantitative PCR.** S.A. Bustin; International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA, 2001, p.87-112.

PINOT, F. *et al*. Induction of stress proteins by tobacco smoke in human monocytes: modulation by antioxidants. **Cell Stress**; v.2, p.156-161, set 1997.

POZO-GUISADO, E. *et al*. Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation. **Int J Cancer**, v.109, p.167–173, 2004.

PRANCE, G.T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.64, n.4, p. 659-684, 1977.

PRIVES, C.; HALL, P.A. The p53 pathway. **J.Pathol**, v.187, p.112–126, 1999.

PUTICS, A. *et al*. Resveratrol Induces the Heat-Shock Response and Protects Human Cells from Severe Heat Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10, n.1, p.65-76, 2008.

QUIDEAU, S. Plant "polyphenolic" small molecules can induce a calorie restriction-mimetic life-span extension by activating sirtuins: will "polyphenols" someday be used as chemotherapeutic drugs in Western medicine? **Chembiochem**, v.5, n.4, p.427-430, 2004.

RASCHKE, M. *et al*. Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress. **Carcinogenesis**, v.27, p.2322-2330, nov 2006.

RAVINDRAN, R.K. *et al*. Resistance to dehydration damage in hela cells correlates with the presence of endogenous heat shock proteins. **Cell Preserv Technol**, v.3, p.155-164, 2005.

RIZZINI, C.T. 1971. Plantas do Brasil. árvores e madeiras úteis do brasil. manual de dendrologia brasileira. Ed. Edgar Blücher e Ed. USP, São Paulo.

RUSSO, E. 2001. Adaptogens. In: E. Russo, Editor, Handbook of psychotropic herbs. A scientific analysis of herbal remedies for psychiatric conditions, The Haworth Press Inc., New York, p. 181–198.

SAMALI, A.; COTTER, T.G. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. **Experimental Cell Research**, v.223, n.1, p.163-70, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSELL, D.W. A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ª ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap.7, p.7.9-7.12a.

SAMBROOK, J.; RUSELL, D.W. Agarose gel electrophoresis. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ª ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap.7, p.743-7.45b.

SANDERS, C.S. *et al*. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology**, v.118, n.4, p.618-625, 2002.

SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. *et al*. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, v.35, p.307–316, mai 2000.

SCHULTES, R.E. *et al*. De plantis toxicariis e Mundo Novvo tropicale commentationes XVIII. Phytochemical examination of Spruce's ethnobotanical collection of *Anadenanthera peregrine*. **Botanical Museum Leaflets Harvard University**, v.25, p.273-287.

SIMON, M.M. *et al*. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, p.926–933, 1995.

SMITH, G. Quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Analysis of Drug Metabolizing and Cytoprotective Genes in Psoriasis and Regulation by Ultraviolet Radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.121, p.390-398, mar 2003.

SOTI, C. *et al*. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology**, v.146, p.769-80, 2005.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Science**, v.257, p.1220-1224, ago 1990.

SUDEL, K. M. *et al*. Novel Aspects of Intrinsic and Extrinsic Aging of Human Skin: Beneficial Effects of Soy Extract. **Photochemistry and Photobiology**, v.81, p.581–587, mai 2005.

SURH, Y. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p.768-780, 2003.

TAKAISHI, M. Protective role of metallothionein in benzo[a]pyrene-induced DNA damage. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.34,n.5, .449-458, 2009.

TALALAY, P.; DE LONG, M.; PROCHASKA, H.J. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.85, n.21, p.8261–8265, 1988.

TALBOURDET, S. *et al*. Modulation of gene expression as a new skin anti-ageing strategy. **Journal of Drugs in Dermatology**, v.6, p.25–33, 2007.

TAYLOR, C. R. *et al*. Photoaging/photodamage and photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.22, p.1-15, jan 1990.

TERZIBASI, E. *et al*. The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. **Exp Gerontol**, v.42, p.81-89, 2007.

THOMAS, P.J.; QU, B.H.; PEDERSEN, P.L. Defective protein folding as a basis of human disease**. Trends Biochem. Sci.**, v.20, p.456–459, 1995.

TIAN, Y. *et al*. Effects of repeated low-dose UVA irradiation on human skin. **Journal of Clinical Dermatology**, v.39, n.11, p.677-680, 2010.

TOLONEN, A. *et al.* Phenylpropanoid glycosides from *Rhodiola rosea*. **Chem. Pharm. Bull**. v.51, p.467-470, 2003.

TOMITA, Y. Stimulatory effect of prostaglandin E2 on the ,onfiguration of normal human melanocytes in vitro. **Journal of Investigative Dermatology**. v.89, p.299–301, 1987.

TORELLO, C.O. Avaliação dos efeitos do extrato padronizado de *Rhodiola rosea L.* na resposta imunohematopoetica de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*. 2009. 99f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

TRAUTINGER, F. 72-kD heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet light B. **Journal of Investigative Dermatology**, v.105, p.160-162, ago 1995.

TRAUTINGER F. *et al*. Expression of the 72-kD heat shock protein is induced by ultraviolet A radiation in a human fibrosarcoma cell line. **Experimental Dermatology**, v.8, p.187–193, 1999.

TRAUTINGER, F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.26, p.573-577, 2001.

TZAPHLIDOU, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. **Micron**, v.35, p.73–177, 2004.

VANDESOMPELE, J. *et al*. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.7, p.1-12, 2002.

VAZIRI, H. *et al*. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. **Cell**, v.107, p.149-159, out 2001.

VERBEKE, P.; CLARK, B. F. C.; RATTAN, S. S. Reduced levels of oxidized and glycoxidized proteins in human fibroblasts exposed to repeated mild heat shock during serial passaging *in vitro*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.12, p.1593-1602, dez 2001.

VÍGH,L. et al. Bimoclomol: a non toxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. **Nature Medicine**, v.3, p.1150–1154, 1997.

VIVANCOS, M.; MORENO, J.J. Beta-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. **Free Radical Biol. Med.**, v.39, p.91-97, 2005.

VOELLMY, R. Transcriptional regulation of the metazoan stress protein response. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**. v.78, p.143-85, 2004.

WANG, R. *et al*. Impaired DNA Damage Response, Genome Instability, and Tumorigenesis in SIRT1 Mutant Mice. **Cancer cell**, v.14, n.4, p.312-323, 2008.

WENK, J. et al. UV-induced oxidative stress and photoaging. **Current Problems in Dermatology**, v.29, p.83–94, 2001.

WESTERHEIDE, S.J., et al. Celastrols as Inducers of the Human Heat Shock Response and Cytoprotection, **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.56053-56060, dec 2004.

WIDYARINI, S. *et al*. Isoflavonoid photoprotection in mouse and human skin is dependent on metallothionein. **Journal of Investigative Dermatology**, v.126, p.198–204, jan 2006.

WIEGANT, F. A. C. *et al*. Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C.elegans*. **Biogerontology**, v.10, p.27-42, fev 2009.

WOOD, J. G. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. **Nature**, v.430, p.686-689, ago 2004.

XIAO-CHUN, C. *et al*. Involvement of CDK4, pRB, and E2F1 in ginsenoside Rg^1 protecting rat cortical neurons from β-amyloid-induced apoptosis. **Acta Pharmacol Sin, v.**24, p.1259-64, 2003.

YAMAMOTO, H.; SCHOONJANS, K.; AUWER, J. Sirtuin Functions in Health and Disease. **Molecular Endocrinology**, v.21, n.8, p.1745-1755, 2007.

ZIEGLER, A. *et al*. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer**. Nature**, v.372, p.773 –776, 1994.

ZHANG, L. *et al*. Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v.564, n.1-3, p.18-25, 2007.

ZHOU, X.; TRON, V.A.; LI, G.; TROTTER, M.J. Heat shock transcription factor-1 regulates heat shock protein-72 expression in human keratinocytes exposed to ultraviolet B light. **Journal of Investigative Dermatology**, v.111, n.2, p.194-198, 1998.

ANEXOS

ANEXO A. Relatório de análise de flavonóides totais de amostra do extrato hidroglicólico de *Anadenanthera colubrina*, através da técnica de Follin-Ciocalteu.

CHEMYUNION

RELATÓRIO DE ANÁLISE - LABORATÓRIO INSTRUMENTAL

RELATÓRIO Nº: 0898/11

PRODUTO: Aquasense **LOTE:** CN018-0111

ANÁLISE: Conteúdo de Fitosteróis Totais; Beta-Sitosterol e Fitosteróis Totais

SOLICITANTE: Wagner Magalhães **DEPARTAMENTO:** P&D (LSE)

OBSERVAÇÕES: Extrato de Angico Branco

Técnica utilizada: FLAV_FOL.M (UV-VIS)

Concentração: 407,04 µg/mL

Arquivos: C:\HPCHEM\1\DATA\FLAVON\ANGICO\A091211.STD

Curva de Processamento: C091211.STD

Referência: Log Book (EQ06) - Análise Nº 140/11

Especificação/Resultado esperado: N.C.

RESULTADOS:

Conteúdo de Flavonóides Totais = 1,11%

*A quantificação dos Flavonóides Totais foi realizada pela técnica de Follin-Ciocalteu, utilizando Quercetina como padrão.

Análise Informativa.

** Não foi possível detectar a presença de fitosteróis na amostra, no qual foram realizadas duas técnicas para identificação, uma por cromatografia gasosa e a outra envolvendo a reação de Lierbermann Burchard.

Responsável: Samuel Highet **DATA:** : 14/12/2011

Revisado por: Edu

FQ P&D_023 (05/08) SA 3584/08 Pag. 1/1

ANEXO B. Resultados da quantificação de RNA total extraído de culturas celulares incubadas com o extrato hidroglicólico de *Rhodiola rosea*.

	Quantificação de RNA total Tratamento com *Rhodiola rosea*		
	Grupos	**µg/ml**	**µg em 29 µL**
Grupos Irradiados	1 - Controle UV	**220**	6,38
	2 - Controle UV	**240**	6,96
	3 - 0,0048 % (p/v)	**10**	0,29
	4 - 0,0048 % (p/v)	**9**	0,26
	5 - 0,0024 % (p/v)	**10**	0,29
	6 - 0,0024 % (p/v)	**20**	0,58
	7 - 0,0012 % (p/v)	**8**	0,23
	8 - 0,0012 % (p/v)	**5**	0,15
	9 - 0,0006 % (p/v)	**5**	0,15
	10 - 0,0006 % (p/v)	**13**	0,38
Grupos Basais	1 -Controle Basal	**280**	8,12
	2 - Controle Basal	**320**	9,28
	3 - 0,0048 % (p/v)	**380**	11,02
	4 - 0,0048 % (p/v)	**400**	11,60
	5 - 0,0024 % (p/v)	**340**	9,86
	6 - 0,0024 % (p/v)	**320**	9,28
	7 - 0,0012 % (p/v)	**400**	11,60
	8 - 0,0012 % (p/v)	**340**	9,86
	9 - 0,0006 % (p/v)	**340**	9,86
	10 - 0,0006 % (p/v)	**360**	10,44

ANEXO C. Resultados da quantificação de RNA total extraído de culturas celulares incubadas com o extrato hidroglicólico de *Anadenanthera colubrina*.

	Quantificação de RNA total Tratamento com *Anadenanthera colubrina*		
	Grupos	**µg/ml**	**µg em 29 µL**
Grupos Irradiados	1 - Controle UV	**280**	8,12
	2 - Controle UV	**220**	6,38
	3 - 0,195 % (p/v)	**340**	9,86
	4 - 0,195 % (p/v)	**320**	9,28
	5 - 0,098 % (p/v)	**300**	8,70
	6 - 0,098 % (p/v)	**280**	8,12
	7 - 0,049 % (p/v)	**140**	4,06
	8 - 0,049 % (p/v)	**190**	5,51
	9 - 0,024 % (p/v)	**180**	5,22
	10 - 0,024 % (p/v)	**200**	5,80
Grupos Basais	1 -Controle Basal	**360**	10,44
	2 - Controle Basal	**370**	10,73
	3 - 0,195 % (p/v)	**320**	9,28
	4 - 0,195 % (p/v)	**340**	9,86
	5 - 0,098 % (p/v)	**400**	11,60
	6 - 0,098 % (p/v)	**400**	11,60
	7 - 0,049 % (p/v)	**360**	10,44
	8 - 0,049 % (p/v)	**380**	11,02
	9 - 0,024 % (p/v)	**360**	10,44
	10 - 0,024 % (p/v)	**360**	10,44

ANEXO D. Artigo de revisão intitulado "Heat shock proteins (HSP): dermatological implications and perspectives".

Review article

Eur J Dermatol 2011 (epub ahead of print)

Wagner VIDAL MAGALHÃES[1]
Marcelo Fábio GOUVEIA NOGUEIRA[2]
Telma Mary KANEKO[1]

[1] Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos - Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 13, São Paulo, Brasil
[2] Laboratório de Micromanipulação Embrionária - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Avenida Dom Antônio, 2100, Assis, Brasil

Reprints: W. Vidal Magalhães
<wmagalhaes@usp.br>

Article accepted on 8/4/2011

Heat shock proteins (HSP): dermatological implications and perspectives

In recent years, several studies have demonstrated the protective effect of Heat Shock Proteins (HSP) on different organs and tissues under stressful conditions. However, most research explores the performance of those molecular chaperones during immune responses or pathological conditions like cancer, whereas the number of studies related to the performance of HSPs in the skin during diverse natural or physiopathological conditions is very low. Therefore, the aim of this article was to summarize the main concepts concerning the expression and performance of HSPs, from analysis of current medicine and cosmetics publications, as well as exploring the importance of these proteins in the dermatological area in physiological events such as cutaneous aging, skin cancer and wound healing and to present final considerations related to biotechnology performance in this area.

Key words: heat-shock proteins, skin, gene expression, skin manifestations, prevention and control

UNCORRECTED PROOF

Heat shock proteins (HSPs) are the most abundant proteins in the biosphere [1]. The fact that they show remarkable evolutionary conservation suggests they are essential for basic cellular function. A number of studies have shown that the expression of these proteins has a close relationship with life history, exerting influence on biological phenomena such as stress resistance [2, 3] and longevity [4-6]. HSPs are identified and classified into families according to their molecular masses measured in kilodaltons (kDa). In *table 1*, the major HSPs and their functions are represented.

The initial step for the discovery of this broad group of shock proteins occurred in 1962, when RITOSSA (1962) [7] incidentally observed a new pattern of chromosomes thickening in *Drosophila* salivary gland cells exposed to high temperatures. Besides heat shock there are different factors responsible for the expression of HSPs. The most studied category of stimuli corresponds to environmental stress, which are the best known inducing agents, such as radiation [8-10], oxidative damage [11, 12], heavy metals [13, 14] and even heat stress [15, 16]. Many of these stressors share the property of being proteotoxic, *i.e.* elements that adversely affect the correct conformation and, consequently, functioning of proteins [17]. In such circumstances, HSPs are synthesized largely as a response which aims at minimizing cell damage, ensuring the survival of the cell or organism, and also inducing subsequent stress resistance. This inducible cellular tolerance was firstly reported after heat shock and was thus called thermotolerance [18].

There are also constitutively expressed HSPs that under normal conditions act as molecular chaperones. Chaperones exert activity in the synthesis, folding and transport of newly synthesized proteins (see the review in [19]), reducing the likelihood of inappropriate protein interactions, which can result in pathological changes in a given organism (see the review in [20]).

HSPs in skin

In recent years, numerous studies have demonstrated the protective effects of HSPs on different organs subjected to different stressful conditions. In skin, cells of both dermis and epidermis express HSPs [21, 22], which confer resistance to damage caused by stressors such as sunlight exposure [23].

However, these proteins show expression patterns that vary with the stressor and cell type. Keratinocytes, for example, constitutively express HSP 72, which is consistent with the need for these cells to protect themselves against numerous forms of environmental stress to which they are subjected daily and constantly [24]. In fibroblasts, on the other hand, HSP 72 expression is almost undetectable in normal conditions [25]. Other HSP families - such as HSPs 27, 60, 90 and 110 - are also normally present on skin, predominantly in the epidermis [26].

Each HSP has essential and specific functions in the skin - the HSP 27 stabilizes the actin cytoskeleton [27] and is involved in keratinocyte differentiation [28], whereas HSP 47 is associated with collagen synthesis in fibroblasts [29]. In recent decades, many studies have investigated the expression of different HSP families in various situations, such as aging and tissue repair, in order to unravel the role of these proteins during such events.

HSPs in photoaging

Photoaging is mainly the result of UV-induced damage of the dermal connective tissue of the skin [30]. DNA damage and oxidative stress are the initial molecular events that lead to the majority of clinical and histopathological

doi:10.1684/ejd.2011.1530

To cite this article: Vidal Magalhães W, Gouveia Nogueira MF, Kaneko TM. Heat shock proteins (HSP): dermatological implications and perspectives. *Eur J Dermatol* 2011 (epub ahead of print) doi:10.1684/ejd.2011.1530

Table 1. Major HSPs and their functions.

Name	Molecular mass (kDa)	Localization	Function
Ubiquitin	8	Cytosol/Nucleus	Protein degradation
HSP 10	10	Mitochondrion/Chloroplast	HSP60 cofactor
HSP 27	27	Cytosol/Nucleous	Keratinocytes growth and differentiation
Heme oxygenase-1	32	Cytosol	Antioxidant, wound healing, anti-inflammatory
HSP 47	47	Endoplasmic reticulum	Procollagen chaperone, wound healing
HSP 60	60	Mitochondrion/Chloroplast	Molecular chaperone
HSP 72	70	Cytosol/Nucleous	Longevity, stress resistance, anti-inflammatory, anti-photoaging
HSP 90	90	Cytosol/Nucleous	HSPs expression control
HSP 110	110	Cytosol/Nucleous	Molecular chaperone

features of photoaging, as a result of UV radiation exposure [31].

UV-B radiation induces the synthesis of photoproducts, dimers, between adjacent pyrimidine bases in DNA strands [32]. If not repaired, the dimers are propagated over cell multiplication and may result in tumor formation [33]. These lesions in DNA also contribute to the process of skin aging by signaling the release of metalloproteinase-1 (MMP-1) from fibroblasts, the enzyme responsible for collagen degradation [34].

Moreover, the skin is one of the organs most affected by oxidative stress, by exposure to external agents such as air pollution [35] and radiation [36], as well as by normal metabolism of cells [37, 38]. In all cases, the production of reactive oxygen species (ROS) occurs, which are capable of damaging biological sites, such as lipids, proteins and DNA. Damage to any of these components can interfere seriously with the normal functions of cells and can result in pathological processes such as inflammation and cancer [39].

The development of characteristic changes in collagen and elastic fibers, observed in photoaging, also has a direct relationship with the generation of ROS. According to a study by CHOI *et al.* (2009) [40], the increase of tropoelastin (precursor molecule of elastin) mRNA levels, due to the generation of ROS, contributes to the accumulation of abnormal elastic material. This phenomenon, known as solar elastosis, is considered the most evident pathological change in photodamaged skin. Moreover, oxidative stress induces the synthesis and activation of metalloproteinases [41, 42] and inactivates inhibitors of these enzymes [43].

In this context, it is important to highlight HSP 72 as an agent of great potential in the fight against photoaging. This protein was able to reduce the accumulation of oxidized and glycoxidized proteins of human fibroblasts in *in vitro* tests [44]. Such capacity may be due, at least in part, to its ability to regulate cellular redox status by modulating glutathione peroxidase and glutathione reductase activities [45].

Furthermore, heat shock (a potent HSP inducing stimulus) has been described to attenuate UVB-induced cell death in human skin cells [46]. The HSPs role during this protection process was observed in one study that demonstrated that inhibition of HSP 72 expression nullifies the protective effect of a prior hyperthermia on subsequent UV-induced damage on human A431 keratinocytes [47]. Jantschitsch *et al.* (2002) [48] observed that the heat preconditioning of human melanocytes, keratinocytes and fibroblasts was also able to slightly increase the rate of repair of UV-induced thymine dimers 3 hours after exposure to UV-B, compared to controls.

Besides HSP 72, another stress protein plays a fundamental role in adaptive responses against oxidative stress. HSP 32, also known as heme oxygenase, is considered an antioxidant enzyme because of its protective role against the toxic effects of free radicals generation. This enzyme catalyzes the degradation of free heme (a potent oxidizing agent) in Fe^{3+}, carbon monoxide and biliverdin, which is converted under the action of biliverdin reductase to bilirubin [49], a pigment that has antioxidant properties [50].

The role of HSPs during the aging process is also highlighted by the fact that induction of these molecular chaperones is intimately related to increased longevity. Tatar and colleagues (1997) [51] found that heat-induced expression of HSP 70 increased *Drosophila melanogaster* lifespan at normal temperatures. Also, it is known that HSP 90 is essential for the proper functioning of telomerase, the enzyme that regulates cellular lifespan [52].

Despite the enormous importance of heat shock proteins in the aging process, in various experimental models the stimulation potential of HSP synthesis in senescent cells submitted to a stressor or inducer was shown to be lower than in young cells. Nizard *et al.* (2004) [53] demonstrated that the induction of HSP 47 expression in response to application of *Salix alba* extract in cultured fibroblasts is significantly more severe in young cells. In addition, a decreased level of induction of HSP 72 in aged skin cells subjected to heat stress (45°C for 1 hour) was observed [54].

HSPs in skin cancer

Currently, skin cancer is considered the greatest incident cancer type worldwide, predominantly in Caucasians. The total number of procedures for skin cancer increased 76.9% in the Medicare fee-for-service population during the period between 1992 and 2006 [55]. A 2004 survey showed the existence of 2.9 million new cases and an average of 1.7 million deaths annually, considering the population of 25 European countries [56].

Skin cancer is characterized by abnormal and uncontrolled growth of cells that make up the skin. UV is experimentally and epidemiologically proved as the main "causal agent" of skin cancer [57]. Notably, the prevalence of these lesions is directly related to the individual's age [58, 59] and it may be conjectured that this fact is due to cumulative exposure to radiation. The protection of epidermal cells against damage by UV radiation is mediated by numerous mechanisms such as DNA repair, activation of antioxidant enzymes, increased melanin and the expression of some HSPs. It is known that during UV exposure the transcription factor HSF-1 (responsible for controlling the expression of HSP 72) is activated, resulting in increased expression of HSP 72 in keratinocytes [60].

A group of researchers demonstrated the ability of HSPs to protect against skin cancer [61]. In this study, it was reported that overexpression of HSP 27 in transfected cell line A431 (human epidermal carcinoma) injected into nude mice was able to slow tumor development. Also, clinical trials in melanoma have demonstrated that HSP-peptide complexes (HSPPC-96) derived from autologous tumors can be used as a vaccine to treat melanoma [62].

In contrast to HSPs' therapeutic potential in cancer treatment, it has also been shown that HSP 72 expression favors the survival of cancer cells [63]. In this study, the authors observed that after neutralization of HSP 72 by a peptide, mouse melanoma cells (B16F10) became more susceptible to apoptosis.

HSPs in wound healing

The wound healing process comprises several complex interdependent phases. These phases consist of three important steps: inflammation, granulation tissue formation with extracellular matrix deposition (proliferation) and remodeling (maturation) [64]. Failure or prolongation of these phases can result in delayed healing or non-closure of surgical wounds, which represent a significant cause of morbidity and mortality that implies an increased cost to health systems [65, 66].

In this context, it is important to emphasize the role of HSPs. During tissue repair, several cells inside or near the lesion are subjected to a wide variety of stressful conditions such as dehydration, exposure to oxygen, interruption of blood supply and decreased glucose levels [67]. Laplante *et al.* (1998) [68] examined the expression of HSPs 27, 60, 72 and 90 during the repair process, and observed changes in the expression pattern of these proteins in such situations. In the thickened epidermis, HSP 70 showed a reduced expression, HSP 60 was induced in low suprabasal and basal cells, whereas HSP 90 and HSP 27 preserved a suprabasal pattern with an induction in basal and low suprabasal cells.

HSP 47, HSP 72 and HSP 32 are among the most important HSPs during tissue repair. HSP 47, located in the endoplasmic reticulum lumen, participates in the early stages of synthesis, folding and assembly of the trimeric structure of procollagen, a precursor molecule of collagen [29, 69]. In addition, it has been shown that overexpression of HSP 47 is responsible for the overproduction of collagen, the predominant phenomenon in the formation of keloids [70]. HSP 72, also known as HSP 70, is a cytosolic protein that acts in different forms during wound healing. Besides acting as a molecular chaperone and helping with homeostasis and cell survival, the expression of HSP 72 is related to the increased phagocytic ability of macrophages during healing [71]. Constitutively, this protein is little expressed in the epidermis whereas, in the dermis, its expression is not observed before or after an injury. However, its presence is remarkable in epidermal cells near the injured area [72]. One study has also shown that delivery of HSP 72 into renal tubular cells confers anti-inflammatory action due to its ability to block activation of nuclear factor NF-kB [73], responsible for activation of several pro-inflammatory molecules.

After a tissue injury, increased expression of HSP 32 occurs in the early days, being probably important for cells to support oxidative stress due to resulting inflammatory response [72]. Increased expression and activity of HSP 32, depending on the treatment of C57BL6 mice with tin chloride, resulted in a significant acceleration of wound healing and attenuation of the inflammatory response [74].

Interestingly, application of recombinant HSP 90 in a carboxymethylcellulose cream enhanced skin wound healing during days 5–13, with an overall 30% improvement of mice wound healing time [75].

Pharmacological inducers

Given the diversity of cytoprotective properties of HSPs, there is enormous interest in discovering and developing pharmacological agents capable of safely modulating the expression of these proteins. Despite the use of pharmacological inducers which flee the field of emergencies, due to the fact that cells require a period of time to fully develop the production of HSPs, such agents find applications in elective surgery [76] or in the prevention of skin disorders through their incorporation into cosmetic products.

As already mentioned, there are numerous agents capable of elevating the expression of HSPs. However, the vast majority of these inducers, such as heat shock, UV radiation or ethanol exhibit significant cytotoxicity and thereby compromise cell viability, which explains the induction of these agents. However, the induction of HSPs by known drugs such as geranylgeranylacetone [77] and bimoclomol [78] has been verified, which demonstrably do not constitute a form of stress to cells. The ability of plant extracts and compounds to induce HSPs has also been verified, such as the extract of *Salix alba*, which can raise levels of HSP 47 in fibroblasts [53], and pigment curcumin, derived from *Curcuma longa*, which induced expression of HSP 32 in a non-toxic manner in normal adult skin fibroblasts [79]. In addition, paeoniflorin, one of the major constituents of a herbal medicine derived from *Paeonia lactiflora*, showed activity in inducing HSP 27, 40 and 72 in *in vitro* tests [80].

Conclusion and perspectives

Recent studies have demonstrated the therapeutic potential of manipulating HSP expression, including, most importantly, vaccines against tumors and cell protection against lethal damage caused by stress agents.

UNCORRECTED PROOF

With regard to dermatology, protection against environmental stresses such as UV radiation, heat and pollution, prevention and repair of the effects of skin aging, and the optimization of the wound healing process are possible application fields for topical and systemic HSP-inducer compounds. Induction of HSP 72, for example, find applications in anti-aging products, due to its ability to reduce the accumulation of oxidized and glycoxidized proteins in skin cells, and also to decrease cell damage induced by UVB. In turn, HSP 32 is a key enzyme that exerts an antioxidant role, protecting cells against oxidative damage, presenting potential for use in products that reduce oxidative damage caused by sun exposure. HSP 47 is another protein of huge dermatological importance because it is related to collagen synthesis by fibroblasts, and is thus a target protein both for cosmetics and for skin wound healing products.

Besides the use of expression inducers, encapsulation vehicles, such as liposomes, emerge as a likely alternative for protection of skin cells by HSPs for topical application in order to generate direct cytoprotective effects.

Considering the search for eternal beauty built into the current cultures in different nations and social classes, as well as the increased demand for multi-functional cosmetic products, the direct availability or induction of HSPs by products of this genre comes with excellent success prospects, both for the cosmetics market and for dermatological medicine. As an example, Crème Reminéralisante® marketed by Anna Pegova can be mentioned. According to the product description, its anti-aging property is due to its ability to stimulate the synthesis of heat shock proteins [81]. Another example, Langerhans cells treated with RonaCare Ectoin® (Merk®) showed, under stress conditions, faster formation of HSP 72 in comparison to untreated cells [82]. Because of HSPs' remarkable protective and preventive capacity, the development and evaluation of active compounds capable of inducing their expression should be considered as essential goals of the current scientific community. ■

Disclosure. *Financial support: none. Conflicts of interest: none.*

References

1. Kaufmann SHE. Heat shock proteins: a missing link in the host-parasite relationship. *Med Microbiol Immunol* 1990; 179: 61-6.

2. Gupta S, Deepti A, Deegan S, Lisbona F, Hetz C, Samali A. HSP72 protects cells from er stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1A-XBP1 signaling through a physical interaction. *PloS Biol* 2010; 8: e1000410.

3. Shao L, Perez RE, Gerthoffer WT, Truog WE, Xu D. Heat shock protein 27 protects lung epithelial cells from hyperoxia-induced apoptotic cell death. *Pediatr Res* 2009; 65: 328-33.

4. Calderwood SK, Murshid A, Prince T. The Shock of Aging: Molecular Chaperones and the Heat Shock Response in Longevity and Aging – A Mini-Review. *Gerontology* 2009; 55: 550-8.

5. Tao D, Lu J, Sun H, *et al.* Trichostatin A extends the lifespan of Drosophila melanogaster by elevating hsp22 expression. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2004; 36: 618-22.

6. Morley JF, Morimoto RI. Regulation of longevity in Caenorhabditis elegans by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 657-64.

7. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experientia* 1962; 18: 571-3.

8. Calini V, Urani C, Camatini M. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro* 2003; 17: 561-6.

9. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 99-103.

10. Tyrrell RM. Solar ultraviolet A radiation: an oxidizing skin carcinogen that activates heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 835-40.

11. Stahnke T, Richter-Landsberg C, Stadelmann C, Netzler A, Brück W. Differential upregulation of heme oxygenase-1 (HSP32) in glial cells after oxidative stress and in demyelinating disorders. *J Mol Neurosci* 2007; 32: 25-37.

12. Zoppi CC, Macedo DV. Overreaching-induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation. *Scand J Med Sci Sports* 2008; 18: 67-76.

13. Escobar MC, Souza V, Bucio L, Hernández E, Gómez-Quiroz LE, Ruiz MCG. MAPK activation is involved in Cadmium-induced Hsp70 expression in HepG2 cells. *Toxicol Mech Methods* 2009; 19: 503-9.

14. Wang L, Weng CY, Wang YJ, Wu MJ. Lipoic acid ameliorates arsenic trioxide-induced HO-1 expression and oxidative stress in THP-1 monocytes and macrophages. *Chem Biol Interact* 2011; 190: 129-38.

15. Ruell PA, Hoffman KM, Chow CM, Thompson MW, Thompson MW. Effect of temperature and duration of hyperthermia on HSP72 induction in rat tissue. *Mol Cell Biochem* 2004; 267: 187-94.

16. Tulapurkar ME, Asiegbu BE, Singh IS, Hasday JD. Hyperthermia in the febrile range induces HSP72 expression proportional to exposure temperature but not to HSF-1 DNA-binding activity in human lung epithelial A549 cells. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 499-508.

17. Douglas PM, Summers DW, Cyr DM. Molecular chaperones antagonize proteotoxicity by differentially modulating protein aggregation pathways. *Prion* 2009; 3: 51-8.

18. Subjeck JR, Sciandra JJ, Johnson RJ. Heat shock proteins and thermotolerance; a comparison of induction kinetics. *Br J Radiol* 1982; 55: 579-84.

19. Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Rev Biochem* 1993; 62: 349-84.

20. Hebert DN, Molinari M. In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases. *Physiol Rev* 2007; 87: 1377-408.

21. Edwards MJ, Marks R, Dykes PJ, Merrett VR, Morgan HE, O'Donovan MR. Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 392-6.

22. Trautinger F, Kindas-Mugge I, Dekrout B, Knobler RM, Metze D. Expression of the 27-kDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: An immunohistological study. *Br J Dermatol* 1995; 133: 194-202.

23. Roh BH, Kim DH, Cho MK, Park YL, Whang KU. Expression of Heat Shock Protein 70 in Human Skin Cells as a Photoprotective Function after UV Exposure. *Ann Dermatol* 2008; 20: 184-9.

24. Trautinger F, Trautinger I, Kindas-Mugge I, Metze D, Luger TA. Human keratinocytes in vivo and in vitro constitutively express the 72-kD heat shock protein. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 334-8.

25. Fonager J, Beedholm R, Clark BF, Rattan SI. Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp Gerontol* 2002; 37: 1223-8.

26. Wilson N, Mcardle A, Guerin D, *et al.* Hyperthermia to normal human skin *in vivo* upregulates heat shock proteins 27, 60, 72i and 90. *J Cutan Pathol* 2000; 27: 176-82.

27. Doshi BM, Hightower LE, Lee J. HSPB1, actin filament dynamics, and aging cells. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1197: 76-84.

28. Jonak C, Mildner M, Klosner G, *et al.* The hsp27 kD heat shock protein and p38-MAPK signaling are required for regular epidermal differentiation. *J Dermatol Sci* 2011; 61: 32-7.

29. Satoh M, Hirayoshi K, Yokota S, Hosokawa N, Nagata K. Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J Cell Biol* 1996; 133: 469-83.

UNCORRECTED PROOF

30. Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Naderi L, *et al.* Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* 2001; 63: 41-51.

31. Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 573-7.

32. Besaratinia A, Synold TW, Chen HH, *et al.* DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: Comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10058-63.

33. Marrot L, Meunier JR. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58: 139-48.

34. Dong KK, Damaghi N, Picart SD, *et al.* UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. *Exp Dermatol* 2008; 17: 1037-44.

35. Burke KE. Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicol Ind Health* 2009; 25: 219-24.

36. Podda M, Traber MG, Weber C, Yan LJ, Packer L. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 55-65.

37. Burke KE. Photoaging: The role of oxidative stress. *G Ital Dermatol Venereol* 2010; 145: 445-59.

38. Kohen R, Fanberstein D, Tirosh O. Reducing equivalents in the aging process. *Arch Gerontol Geriatr* 1997; 24: 103-23.

39. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

40. Choi WS, Mitsumoto A, Kochevar IE. Involvement of reactive oxygen species in tgf-β1-induced tropoelastin expression by human dermal fibroblasts. *Photochem Photobiol* 2009; 85: 1425-33.

41. Fisher GJ, Quan T, Purohit T, *et al.* Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am J Pathol* 2009; 174: 101-14.

42. Brenneisen P, Briviba K, Wlaschek M, Wenk J, Scharffetter-Kochanek K. Hydrogen peroxide (H2O2) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 515-24.

43. Wang Y, Rosen H, Madtes DK, *et al.* Myeloperoxidase inactivates TIMP-1 by oxidizing its N-terminal cysteine residue: an oxidative mechanism for regulating proteolysis during inflammation. *J Biol Chem* 2007; 282: 31826-34.

44. Verbeke P, Clark BF, Rattan SI. Reduced levels of oxidized and glycoxidized proteins in human fibroblasts exposed to repeated mild heat shock during serial passaging *in vitro*. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1593-602.

45. Guo S, Wharton W, Moseley P, Shi H. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress Chaperones* 2007; 12: 245-54.

46. Chinnathambi S, Tomanek-Chalkley A, Bickenbach JR. HSP70 and EndoG Modulate Cell Death by Heat in Human Skin Keratinocytes in vitro. *Cells Tissues Organs* 2008; 187: 131-40.

47. Trautinger F, Kindås-Mügge I, Barlan B, Neuner B, Knobler RM. 72-kD Heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet b light. *J Investigative Dermatol* 1995; 105: 160-2.

48. Jantschitsch C, Klosner G, Jonak G, Kokesch C, Kindas-Mügge I, Trautinger F. The influence of heat shock on DNA-repair after UVB. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 739.

49. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61: 748-55.

50. Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 5171-6.

51. Tatar M, Khazaeli AA, Curtsinger JW. Chaperoning extended life. *Nature* 1997; 390: 30.

52. Toogun OA, Diane CZ, Freeman C. The HSP90 molecular chaperone modulates multiple telomerase activities. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 457-67.

53. Nizard C, Noblesse E, Boisde C, *et al.* Heat shock protein 47 expression in aged normal human fibroblasts: modulation by Salix alba extract. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1019: 223-7.

54. Muramatsu T, Hatoko M, Tada H, Shirai T, Ohnishi T. Age-related decrease in the inductability of heat shock protein 72 in normal human skin. *Br J Dermatol* 1996; 134: 1035-8.

55. Rogers HW, Weinstock MA, Harris AR, *et al.* Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the united states, 2006. *Arch Dermatol* 2010; 146: 283-7.

56. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-8.

57. Armstrong BK, Kricker A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 2001; 63: 8-18.

58. Agelli M, Clegg LX. Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 832-41.

59. Hemminki K, Zhang H, Czene K. Time trends and familial risks in squamous cell carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 2003; 139: 885-9.

60. Zhou X, Tron VA, Li G, Trotter MJ. Heat shock transcription factor-1 regulates heat shock protein-72 expression in human keratinocytes exposed to ultraviolet B light. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 194-8.

61. Kindas-Mugge I, Herbacek I, Jantschitsch C, Micksche M, Trautinger F. Modification of growth and tumorigenicity in epidermal cell lines by DNA-mediated gene transfer of heat shock protein 27 KD (hsp27). *Cell Growth Differ* 1996; 7: 1167-74.

62. Belli F, Testori A, Rivoltini L, *et al.* Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4169-80.

63. Schmitt E, Maingret L, Puig PE, *et al.* Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer Res* 2006; 66: 4191-7.

64. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 514-25.

65. Ragnarson Tennvall G, Apelqvist J. Health-economic consequences of diabetic foot lesions. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 132-9.

66. Rezende KF, Ferraz MB, Malerbi DA, *et al.* Predicted annual costs for inpatients with diabetes and foot ulcers in a developing country-a simulation of the current situation in Brazil. *Diabet Med* 2010; 27: 109-12.

67. Hunt TK, Hussain Z. Wound microenvironment. In: Cohen KI, Diegelmann RF, Lindblad WJ, eds. *Wound Healing, Biochemical & Clinical Aspects.* Philadelphia: WB Saunders, 1992: 274-81.

68. Laplante AF, Moulin V, Auger FA, *et al.* Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1291-301.

69. Nagata K. Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biol* 1998; 16: 379-86.

70. Chen JJ, Zhao S, Cen Y, Liu XX, Yu R, Wu DM. Effect of heat shock protein 47 on collagen accumulation in keloid fibroblast cells. *Br J Dermatol* 2007; 156: 1188-95.

71. Kovalchin JT, Wang R, Wagh MS, Azoulay J, Sanders M, Chandawarkar RY. In vivo delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 129-37.

72. Keagle JN, Welch WJ, Young DM. Expression of heat shock proteins in a linear rodent wound. *Wound Repair Regen* 2001; 9: 378-85.

73. Meldrum KK, Burnett AL, Meng X, *et al.* Liposomal delivery of heat shock protein 72 into renal tubular cells blocks nuclear factor-kappaB activation, tumor necrosis factor-alpha production, and subsequent ischemia-induced apoptosis. *Circ Res* 2003; 92: 293-9.

74. Patil K, Bellner L, Cullaro G, Gotlinger K H, Dunn M W, Schwartzman M L. Heme oxygenase-1 induction attenuates corneal inflammation and accelerates wound healing after epithelial injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 3379-86.

75. Li W, Li Y, Guan S, *et al.* Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J* 2007; 26: 1221-33.

76. Minowada G, Welch WI. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 1995; 95: 3-12.

UNCORRECTED PROOF

77. Otaka M, Yamamoto S, Ogasawara K, *et al*. The induction mechanism of the molecular chaperone HSP70 in the gastric mucosa by Geranylgeranylacetone (HSP-inducer). *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353: 399-404.

78. Hargitai J, Lewis H, Boros I, *et al*. Bimoclomol, a heat shock protein co-inducer, acts by the prolonged activation of heat shock factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 689-95.

79. Demirovic D, Rattan SI. Curcumin induces stress response and hormetically modulates wound healing ability of human skin fibroblasts undergoing ageing in vitro. *Biogerontology* 2011 [Epub ahead of print].

80. Yan D, Saito K, Ohmi Y, Fujie N, Ohtsuka K. Paeoniflorin, a novel heat shock protein–inducing compound. *Cell Stress Chaperones* 2004; 9: 378-89.

81. Cosméticos, Tratamentos Estéticos Anna Pegova. Web site available at: http://www.annapegova.com.br/gp.aspx?id=103&a=pegotan-fps-60%26rcbID=RadComboBox1%26rcbServerID=RadComboBox1/. Accessed 1 May 2011.

82. RonaCare® Ectoin - Stress Defense and Stress Protection. Web site available at: http://www.merck-chemicals.com/cosmetic-ingredients/stress-defense-and-stress-protection/c_zY6b.s1ODP4AAAEdJu0MDnYj/ Accessed 3 May 2011.

UNCORRECTED PROOF

ANEXO E – Parecer de Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP/FCF/56/2011

São Paulo, 26 de abril de 2011.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
FBF

Senhor(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 25 de abril de 2011, **aprovou** as alterações do projeto "Avaliação da atividade antimicrobiana e da citoxicidade de extratos vegetais visando sua aplicação como conservantes", bem como a mudança do título para **"Avaliação da citotoxicidade de produtos de origem vegetal visando à aplicação em medicamentos tópicos e cosméticos".**

Atenciosamente,

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622, Fone/Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br