

Estudo do efeito do Extrato Hidroglicólico de *Bidens pilosa* na expressão de genes relacionados à integridade da pele

GIOVANA CARAMASCHI DEGELO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) – Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu/SP

2010

Giovana Caramaschi Degelo

Estudo do efeito do Extrato Hidroglicólico de *Bidens pilosa* na expressão de genes relacionados à integridade da pele

Orientadora: DÉBORA COLOMBI

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) – Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu/SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Degelo, Giovana Caramaschi.

Estudo do efeito do Extrato Hidroglicólico de *Bidens pilosa* na expressão de genes relacionados à integridade da pele / Giovana Caramaschi Degelo. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Débora Colombi

Capes: 20205007

1. Genética humana e médica.

Palavras-chave: Aquaporinas; Fibroblastos; Proteínas dérmicas; Queratinócitos.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Flávio e Mailene, que apesar das dificuldades, com muita determinação e coragem, conseguiram dar boas condições de estudos e formação a mim e aos meus 3 irmãos. Além de condições materiais, sempre foram meus exemplos de determinação, de competência e dedicação. Tenho muito orgulho de ter vocês como pais.

Agradecimentos

A Deus, por minha família, pelas pessoas especiais que dão a minha vida um toque muito especial e com as quais cresço a cada dia e por mais esta etapa que se conclui em minha vida.

Aos meus irmãos Flávia, Sarah e Francisco pelo carinho, pelos nossos “momentos de conhecimento”, que sempre fazem parte dos almoços e cafés da tarde que são eternos aos finais de semana. Uma pena a gente não poder conviver mais, apesar de ficar feliz de saber que é porque todos estão felizes e realizados profissionalmente e pessoalmente. Amo vocês.

Ao meu cunhado mais querido e único, Leonardo Zaneti, pelos conselhos, pela torcida, por ficar feliz junto comigo a cada conquista.

A amiga Alaíde Espínhel de Jesus por me ajudar a passar por momentos difíceis e por me mostrar que no fim tudo é possível, quando se luta por um ideal com dedicação.

A minha orientadora, Dra. Débora Colombi, por ter me recebido como sua aluna, por ter me confiado este trabalho, por ter acreditado em mim, por todos os ensinamentos durante esses dois anos, pela motivação, pela paciência e dedicação com a qual corrigiu a minha dissertação, pela indicação para o doutorado com o professor Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla e por ser minha co-orientadora no doutorado.

A empresa Chemyunion Química Ltda, Sorocaba/SP, pela parceria que criou condições para a realização deste trabalho.

Aos meus ex-orientadores, Prof^a. Dra. Selma Maria Michelin, do departamento de anatomia da e Prof. Dr. Alair Aparecido Almeida, do CEATOX, ambos do IB, da UNESP-Botucatu/SP pelos primeiros ensinamentos e motivação constante. Em especial ao Dr. Marcelo Sady Plácido, do departamento de Patologia da FMB da UNESP-Botucatu/SP, por ter me proporcionado as primeiras experiências com a biologia molecular e por me mostrar como este mundo tão complexo é fascinante. A vocês, sempre dedicarei uma imensa gratidão.

Ao professor Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, da UNESP-Botucatu/SP, por ter disponibilizado seu laboratório para a realização do meu mestrado, por ter me inserido em seu grupo e reuniões de seu laboratório, pela confiança e pelo convite para continuar em seu laboratório e fazer parte de sua linha de pesquisa no doutorado.

Ao Prof. Dr. João Pessoa do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB da Unesp-Botucatu/SP, por me disponibilizar o aparelho de PCR em Tempo Real.

Aos colegas e amigos do Laboratório PANGENE: Leticia Gushi, Paulo Rufalco (Soneca), Cristiane Alves, Aline Angella, Mel e Leticia 3rd, Karina Paduan e Carine Spenassato e em especial a Ana Teresa Burlamaqui, por estar sempre do meu lado disposta a me ensinar e ajudar sempre que possível, pelas longas conversas, pelos conselhos, por ter me acolhido prontamente logo que nos conhecemos e por ficar depois do horário me fazendo companhia no laboratório e ao Diego Alonso, pela amizade, por sempre estar disposto a me ajudar e por mostrar suas inquietações sempre que as dúvidas existem. Este seu lado sempre foi motivo de admiração e um exemplo para mim. A todos vocês, meus colegas e amigos, muito obrigada por terem dividido comigo momentos, conhecimentos e dúvidas.

Aos amigos da empresa Genotyping: Leticia Alonso e Rodrigo (Smurf), pela amizade, carinho e pelo companheirismo. É sempre muito bom estar com vocês.

Aos amigos e companheiros “não-PANGENE” da parasitologia Érica, Eriquinha, Alison, Betina, Bruna, César e Larissa, pelos bons momentos que compartilhamos dentro e fora do laboratório - pelas risadas, conselhos, churrascos, pizzas e todos os nossos momentos insubstituíveis. É muito bom crescer ao lado de vocês.

Aos funcionários do departamento de Parasitologia: Márcia, Roberto (Bicho), Valdir, Nilza, dona Roseli e dona Salete, por tornar o nosso ambiente de trabalho tão agradável, divertido e único. Vocês são pessoas muito especiais e queridas.

A todos os meus amigos por fazerem parte da minha história: Silvana, Luciana, Jader, Fernanda (Van), Mirele, José Augusto, Geraldo, Marise, Renatão, Ana Carla (Ca), Wolff, Filipe (Carninha), Aline (Moranguinho), Renato Paschoal (Kéku), Bruna (Xurrus), Marcela (Saca), Fernando (Bongô), Eduardo (Frutíli/Vozinho), Patrícia Hamada (Kud), Larissa Emi (Ku), Lílian Saemi (Hentai), Helton (Borbs), Andrea Fruet (São Nunca), Juliano Jampietro (Kissi), Juliana Amaral (Duroca), Amanda (Sabugo), Alexandre (Pagode), Christian Campero (Pastel), Raquel (Contente), Suzana (Urucu), Fabiane (Rexeada), Juliano (Koala), Lucas (Ku), aos amigos da república Põe na Mão de Deus (Prozac, Laranja, Miss, Ku, Margarida, Trixon, Zaquinha, Kutako, Lanhas, Cotô) e Sobas. Muito obrigada por fazerem parte da minha vida. São muitos, mas cada um é muito especial e único para mim.

Em especial, gostaria de agradecer um grande amigo, Fernando Endrigo Bellezia Polleto, que por acreditar em mim e no meu trabalho, me apresentou a Dra. Débora Colombi, me proporcionando a oportunidade de fazer parte de um conceituado programa de pós-graduação, o da Genética, IBB-UNESP-Botucatu/SP.

À vocês,

A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.

A dor é inevitável. O sofrimento é opcional.

Carlos Drummond de Andrade

Crescer, Reproduzir e Envelhecer: isto é a vida. Intervir no envelhecimento e prolongar a vida do ser humano de forma saudável são os desafios da ciência no século XXI.

Maria Edwiges Hoffmann

Resumo

Para que a integridade da pele seja mantida é necessário que haja distribuição de água nas camadas epidérmica e dérmica, manutenção das propriedades de barreira da pele, além da manutenção da integridade estrutural, elasticidade e resiliência deste tecido. O objetivo deste estudo foi avaliar se o extrato de *Bidens pilosa* é capaz de modular a expressão dos genes *AQP3*, *AQP9*, *AQP10*, filagrina, involucrina, fibronectina e se este extrato é capaz de aumentar a quantidade de colágeno, elastina e GAGs. Esta avaliação foi realizada através da técnica de PCR em tempo real, utilizando culturas queratinócitos comerciais incubadas com extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* (EHBP) na concentração de 5,00 mg/ml nos tempos de 0, 3, 6 e 12 horas e em diferentes concentrações do EHBP (2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml) para a análise de expressão dos genes da epiderme, além do p53, importante supressor tumoral. Cultura de fibroblastos foram incubados também com o extrato por 48 horas para análise do EHBP sobre a produção de colágeno, elastina e GAGs. O tratamento das culturas de queratinócitos com EHBP no tempo de 6 horas em diferentes concentrações se mostrou capaz de modular positivamente a expressão dos genes *AQP3*, *AQP9*, fibronectina e involucrina, porém não foi possível a análise da expressão gênica da *AQP10* e filagrina. A expressão de p53 não foi modulada pelo tratamento com EHBP nas concentrações de 2,50 e 5,00 mg/ml, além disso, o EHBP se mostrou eficaz em aumentar a quantidade proteínas dérmicas em sobrenadante de cultura de fibroblastos. Nosso trabalho sugere que o uso do extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* pode modular positivamente a expressão dos genes relacionados à hidratação da epiderme e integridade desta camada por modular genes de expressão tardia de diferenciação de queratinócitos, e integridade, elasticidade e resiliência da pele pelo aumento da quantidade de proteínas dérmicas e não é capaz de modular a expressão de p53, sugerindo ausência de correlação, a curto prazo, entre o uso do EHBP e câncer. Além disso, a falta de resultados de expressão para *AQP10* coloca em dúvida a presença desta aquagliceroporina nos queratinócitos da epiderme humana.

Palavras Chave: *Bidens pilosa*, aquaporinas, proteínas dérmicas, queratinócitos, fibroblastos

Abstract

To maintaining the integrity of the skin, it is necessary water distribution on epidermis and dermis, barrier properties of the skin maintenance, in addition to structural integrity maintenance, elasticity and tissue resilience. The aim of this study was evaluate if *Bidens pilosa* extract can modulate *AQP3*, *AQP9*, *AQP10*, filaggrin, involucrin, fibronectin expression and if this extract can improve collagen, elastin and GAGs. This evaluation was performed by real time PCR, with commercial keratinocytes incubated with hydroglycolic extract of *Bidens pilosa* (EHBP) at 5.0 mg/ml in times of 3, 6 e 12 hours and at different concentrations of EHBP (2.50, 5.00 and 10.00 mg/ml) to epidermal genes expression analyze, in addition to p53, a important tumor suppressor. Fibroblasts culture were also incubated with the extract for 48 hours to access the effect of EHBP on collagen, elastin and GAGs production. The culture keratinocytes treatment with EHBP with 6 hours of incubation with different concentrations of extract was capable to up-regulates *AQP3*, *AQP9*, fibronectina and involucrin gene expression, but it was not possible *AQP10* and filaggrin gene expression analysis. The expression of p53 was not modulated by 2.50 and 5.00 mg/ml concentrations of EHBP, moreover, EHBP can increase dermal proteins amounts in fibroblasts culture supernatants. Our observation suggests that hydroglycolic extract of *Bidens pilosa* can modulate positively the expression of genes related with epidermal hydration and integrity of this layer because can modulate late expression on keratinocytes differentiation genes, and integrity, elasticity and resilience of skin by increasing amounts of dermal proteins and is unable to modulate p53 expression, suggesting absence of short-term correlation, between EHBP and cancer. Moreover, the lack of expression results to *AQP10* puts in doubt the presence of this aquaglyceroporin on human epidermal keratinocytes.

Key-Words: *Bidens pilosa*, aquaporins, dermal proteins, Keratinocytes, fibroblasts

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
1. Introdução	1
1.1. Pele	1
1.1.1. Epiderme	2
1.1.2. Derme	6
1.1.3. Hipoderme	8
1.2. Proteínas de Interesse	9
1.2.1. Aquaporinas	9
1.2.2. Fibronectina – molécula de adesão	14
1.2.3. Proteínas do Envelope	15
1.2.3.1. Filagrina	15
1.2.3.2. Involucrina (INV)	17
1.2.4. Colágeno	18
1.2.5. Elastina	21
1.2.6. Glicosaminoglicanas	22
1.3. <i>Bidens pilosa</i>	22
1.4. Retinóides	25

2. Objetivo	28
3. Material e Métodos	29
3.1. Isolamento de ativos	29
3.2. Cultura de células e tratamento com os extratos	29
3.3. Determinação da viabilidade/citotoxicidade celular	30
3.4. Extração de RNA total	30
3.5. Tratamento com DNase	31
3.6. Síntese de cDNA	31
3.7. Análise da Expressão Gênica por PCR em tempo real	31
3.8. Quantificação dos componentes da matriz extracelular (MEC) (colágeno, elastina e glicosaminoglicanas)	32
3.8.1. Colágeno	32
3.8.2. Elastina	33
3.8.3. GAGs	33
4. Resultados	34
4.1. Estudo da Citotoxicidade do EHBP	34
4.2. Expressão de Aquaporina-3	35
4.3. Expressão de Aquaporina-9	37
4.4. Expressão de Fibronectina	38
4.5. Expressão de Involucrina	38

4.6. Expressão de Filagrina	39
4.7. Expressão do p53	40
4.8. Colágeno	40
4.9. Elastina	41
4.10. Glicosaminoglicanas	42
5. Discussão	44
6. Conclusões Finais	56
7. Referências Bibliográficas	57
8. Anexo	66
8.1. Relação dos primers	66

Lista de Figuras

Figura 1 - Camadas da pele	2
Figura 2 - Estrutura esquemática da epiderme	3
Figura 3 - Processo de extrusão lamelar	5
Figura 4 - Microscopia Confocal de Varredura a Laser mostrando a epiderme (amarelo) e a derme (vermelho)	7
Figura 5 - Estrutura bidimensional da aquaporina-3 (AQP3) e da aquaporina-9 (AQP9)	11
Figura 6 - Localização da aquaporina-3 e da aquaporina-9 na pele	12
Figura 7 - Representação da proteína da Pró-Filagrina	16
Figura 8 - Proteólise e defosforilação da pro-filagrina durante a diferenciação dos queratinócitos	17
Figura 9 - Representação esquemática das diferenças de síntese de colágeno em peles jovens e envelhecidas	20
Figura 10 - <i>Bidens pilosa</i>	23
Figura 11 - Estrutura química dos retinóides	25
Figura 12 - Análise da Citotoxicidade do EHBP em cultura mista de queratinócitos e fibroblastos	34
Figura 13 - Expressão relativa de AQP3 quando as culturas de queratinócitos foram incubadas por diferentes períodos na concentração de 5,00mg/ml de EHBP	35
Figura 14 - Análise da expressão do gene que codifica a proteína aquaporina-3	36
Figura 15 - Análise da expressão do gene que codifica a proteína aquaporina-9	37
Figura 16 - Análise da expressão do gene que codifica a proteína fibronectina	38
Figura 17 - Análise da expressão do gene que codifica a proteína involucrina	39
Figura 18 - Curva de Amplificação da Filagrina	39
Figura 19 - Análise da expressão do gene que codifica a proteína p53	40

Figura 20 - Efeito do tratamento com EHBP sobre a produção de colágeno em culturas de fibroblastos humanos	41
Figura 21 - Efeito do tratamento com EHBP sobre a produção de elastina em cultura de fibroblastos humanos	42
Figura 22 - Efeito do tratamento de EHBP sobre a produção de glicosaminoglicanas em cultura de fibroblastos humanos	43
Figura 23 - Esquema relacionado à diferenciação dos queratinócitos	46
Figura 24 - Gráfico comparativo entre as análises de expressa gênica da aquaporina-3 e da involucrina	52

Lista de Abreviações

ABIHPEC: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

AH: ácido hialurônico

AQPs: Aquaporinas

AQP3: aquaporina - 3

AQP9: aquaporina - 9

AQP10: aquaporina - 10

AQP9 +/+: presença de AQP9

AQP9 -/-: ausência de AQP9

ATP: adenosina trifosfato

atRA: todos os ácidos retinóicos em conformação trans

Ca²⁺: cálcio

CE: envelope córneo

DAG: Diacil glicerol

EHBP: extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa*

FLG: filagrina (*filament aggregation protein*)

FNH: fatores naturais de hidratação

G3P: glicerol-3-fosfato

GADPH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GAGs: glicosaminoglicanas

HPRT: *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*

IL-1: interleucina-1

INV: Involucrina

IP₃: inusitol trifosfato

MEC: matriz extracelular

MMPs: Matriz Metaloproteinases

mRNA: RNA mensageiro

NHEK: queratinócitos da epiderme normais humanos

NT: amostras não tratadas

PCR: reação em cadeia da polimerase

PIP₂: fosfatidilinusitol bifosfato

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

RAR: receptores nucleares de ácido retinóico

RXR: receptores nucleares de retinóides X

SC: Estrato Córneo

SG: estrato granuloso

TA: temperatura ambiente

TNF- α : fator de necrose tumoral α

TPPS: 5,10,15,20-tetrafenil-21,23-porfina sulfonato

UV: Luz Ultra-Violeta

1. Introdução

Dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) mostram que o Brasil ocupou o terceiro lugar em relação ao mercado mundial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos em 2009, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e do Japão. Ocupa postos significativos, como o segundo no mercado de produtos infantis, masculinos, higiene oral, proteção solar, perfumaria e banho, e o sexto lugar no mercado de produtos relacionados à pele. Dentre os principais fatores responsáveis pelo crescimento do setor, destacam-se: participação crescente da mulher brasileira no mercado de trabalho, a utilização de tecnologias de ponta e o conseqüente aumento da produtividade, favorecendo preços praticados pelo setor, que tem aumentos menores do que os índices de preços da economia geral, o lançamento constante de novos produtos atendendo cada vez mais às necessidades do mercado e o aumento da expectativa de vida, trazendo a necessidade de se conservar uma impressão de juventude.

1.1. Pele

A pele humana é um órgão complexo, formado por várias camadas e apêndices, como folículos capilares, glândulas sudoríparas e sebáceas, sendo constituída por tipos celulares heterogêneos e componentes extracelulares (Haake e cols., 2001). Possui uma importância fundamental na delimitação do meio externo e interno do organismo, desempenhando desta maneira, um importante papel de barreira. A função de barreira física é dada pelo estrato córneo, principalmente, e por junções íntimas que unem as células das camadas nucleadas da epiderme e proteínas associadas; a função de barreira química e bioquímica, contra microorganismos, é dada pela presença de lipídeos, ácidos, enzimas hidrolíticas, peptídeos antimicrobianos e macrófagos; e a função de barreira imunológica é assegurada pelos constituintes humorais e celulares do sistema imune (Proksch e cols., 2008).

O maior órgão do corpo humano, a pele, é formada de três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). A camada mais superficial é a epiderme, um tecido formado por queratinócitos, o principal tipo celular da camada (~95% das células epidérmicas), melanócitos e células de Langerhans (Boury-Jamot e cols., 2006). A

derme, que é a camada intermediária, possui uma matriz de colágeno e elastina, além de uma rede formada por capilares e fibroblastos, sendo de responsabilidade desta camada, o suporte mecânico da pele (Bouwstra e cols., 2003 e Boury-Jamot e cols., 2006). A camada mais profunda da pele é a hipoderme que contém os adipócitos. A interação dessas camadas é importante durante o crescimento e na manutenção da homeostase em adultos (Haake e cols., 2001).

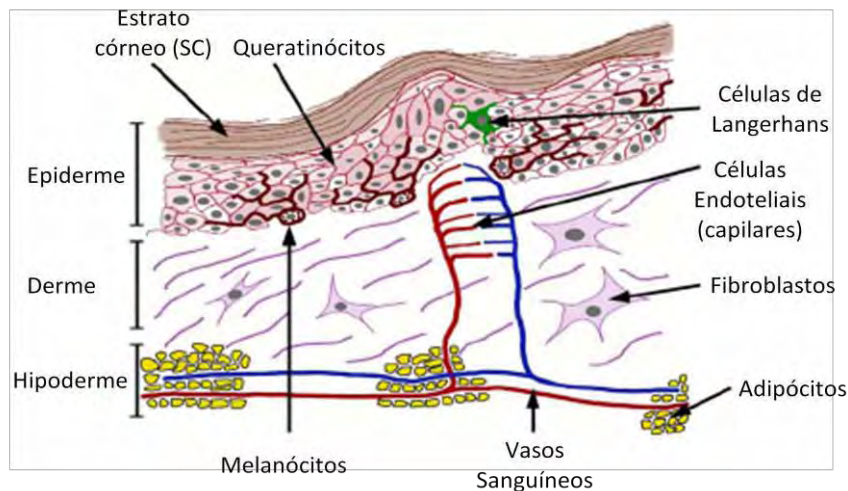


Figura 1 - **Camadas da pele.** A epiderme contém queratinócitos, principal tipo celular da camada, além de melanócitos e células de Langerhans. A derme é um tecido irrigado por capilares sanguíneos e possui fibroblastos e uma matriz de colágeno e elastina e, a hipoderme é composta por adipócitos (Adaptação de Boury-Jamot e cols., 2006).

1.1.1. Epiderme

A epiderme, camada mais superficial da pele é composta de camadas. Estas camadas são: lâmina basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (Figura 2). Estas camadas se renovam constantemente, sendo que os queratinócitos da lâmina basal, camada com um alto teor de água, se proliferam e vão migrando para as camadas mais superficiais da epiderme, até atingir o estrato córneo (SC). Conforme os queratinócitos vão migrando através das camadas epidérmicas, sofrem modificações em relação à forma, morfologia e estado de diferenciação e, para isto, sintetizam e expressam diferentes proteínas estruturais e lipídeos (Bouwstra e cols., 2003 e Boury-Jamot e cols., 2006).

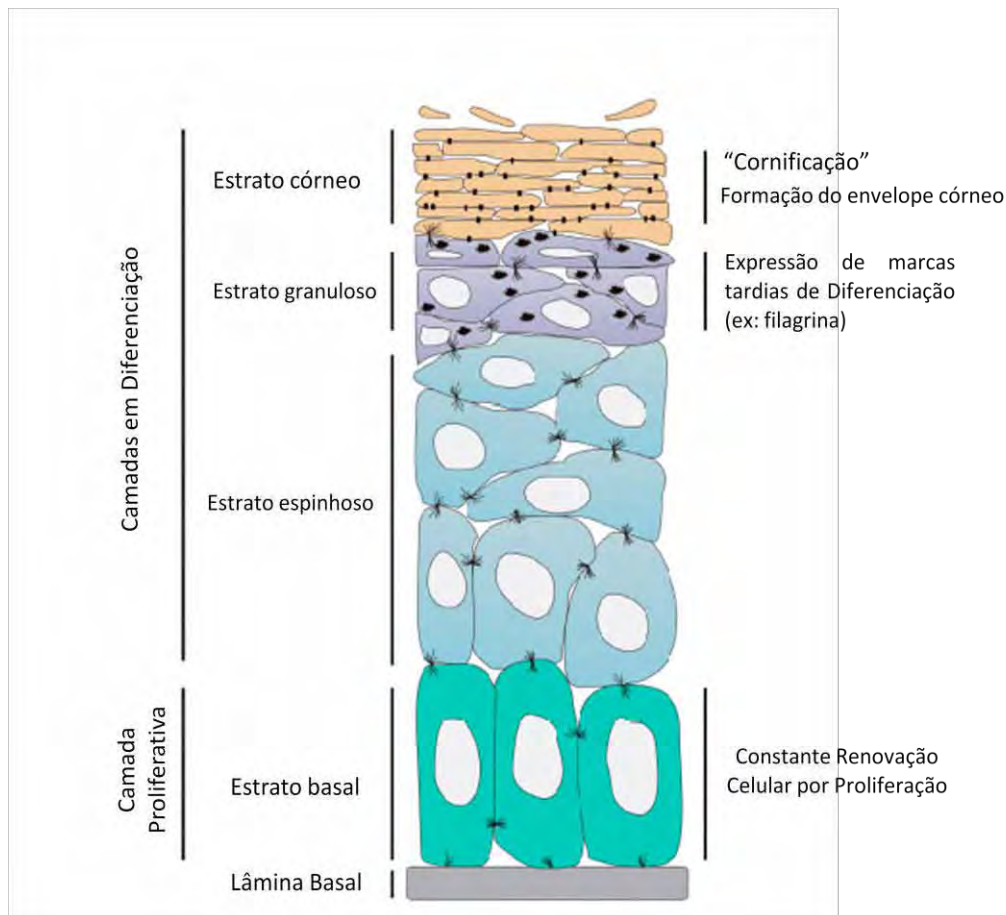


Figura 2 – **Estrutura esquemática da epiderme.** Estratos formadores da epiderme, camada mais superficial da pele: estrato basal, espinhoso, granuloso e o estrato córneo (Adaptação de Denecker e cols., 2008).

O estrato basal é a camada com o maior conteúdo de água (~75%), que decresce gradativamente através das camadas e, no SC, camada de menor conteúdo hídrico, chega a 10-15% (Boury-Jamot e cols., 2006). O estrato basal, ou estrato germinativo, é formado por uma única camada de células praticamente indiferenciadas e mitoticamente ativas, que são as células que irão se proliferar e diferenciar através das camadas da epiderme (Haake e cols., 2001). Um fino balanço entre proliferação e diferenciação é responsável pela manutenção do número de células da epiderme. O estrato superior ao estrato basal é o estrato espinhoso, que possui este nome pelo fato das células desta camada serem unidas por desmossomos que, histologicamente, aparecem como projeções estreitas. Nesta camada ainda, nos queratinócitos mais superiores, se nota a formação de corpos lamelares, que só terão ação na interface da camada granulosa e córnea (Eckert e cols., 1997 e Haake e cols.,

2001). A camada granulosa, que se localiza acima da camada espinhosa, se distingue pela presença de grânulos de querato-hialina de dois tipos: o maior contém pró-filagrina, precursora da filagrina, e o menor contém loricrina, principal componente do estrato córneo (Bikle, 2010). As células desta camada possuem também organelas e funções metabólicas, sinal de que as células desta camada são ainda vivas. Há autores que consideram outra camada, entre a granulosa e o estrato córneo, o estrato lúcido, um estrato de transição, de intensa atividade enzimática onde há destruição de organelas e ácidos nucleicos (Eckert e cols., 1997).

O estrato córneo tem um importante papel na proteção do organismo contra perda de água (Bouwstra e cols., 2003), contra a luz ultra-violeta (UV), oxidantes, antígenos e agentes tóxicos (Hara-Chikuma e Verkman, 2005) sendo composto de queratinócitos em seu maior grau de diferenciação, denominados corneócitos (Boury-Jamot e cols., 2006). Estas células, para serem denominadas corneócitos, passam por profundas mudanças em sua estrutura quando migram do estrato granuloso para o córneo, através da destruição de suas organelas (Bikle, 2010), se tornando achatadas, anucleadas, e há a estabilização de uma matriz de filamentos de queratina que está ligada ao envelope protéico dos corneócitos (estas células são células mortas), caracterizando o passo final de diferenciação dos queratinócitos (Eckert e cols., 1997 e Tagami, 2008). Além disso, os queratinócitos possuem dois envelopes celulares: o mais interno, o envelope protéico, é formado por proteínas ligadas entre si, e o mais externo é um envelope lipídico covalentemente ligado ao envelope protéico (Bouwstra e cols., 2003). Os corneócitos se dispõem em camadas sobrepostas embebidas por uma matriz intercelular enriquecida com lipídeos não polares (lipídeos estes que formam o envelope lipídico acima do envelope córneo), secretados por corpos lamelares de queratinócitos do estrato granuloso da epiderme (Figura 3), formando uma estrutura multilamelar (Tagami, 2008; Hara-Chikuma e Verkman, 2008a e Bouwstra e cols., 2003), importante na função e barreira da pele, por evitar a perda de água transepidermal (Candi e cols. 2005).

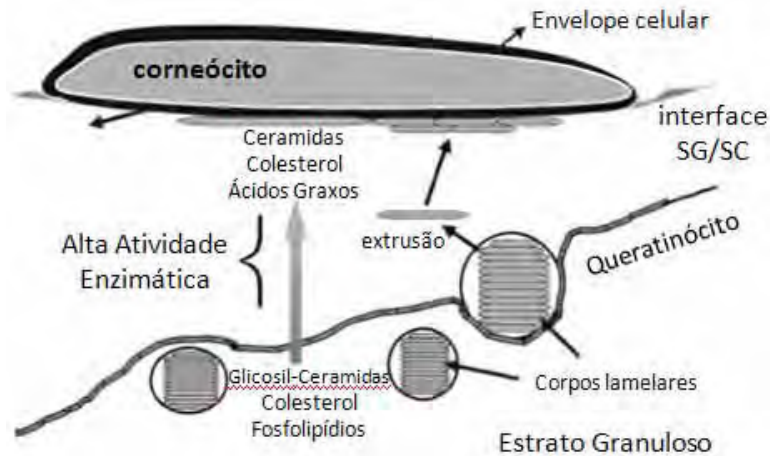


Figura 3 - **Processo de extrusão lamelar.** Os corpos lamelares são depositados nas regiões intercelulares entre o estrato granuloso e o estrato córneo. O conteúdo de lipídeos é rearranjado e há mudanças na composição lipídica (Adaptado de Bouwstra e col., 2003).

Os corpos lamelares são vesículas que se originam do complexo de Golgi, brotam dele, se movem em resposta a estímulos (provavelmente aumento na concentração de cálcio) por um sistema vesículo-tubular e se fundem à membrana apical dos queratinócitos da camada granulosa secretando seu conteúdo lipídico no meio extracelular por exocitose, contribuindo para a formação do SC. Estes lipídeos são então modificados e rearranjados paralelamente à superfície das células (Figura 3).

Os lipídeos dos corpos lamelares são principalmente glicolipídeos, esteróis e fosfolipídeos (Proksch e cols., 2008; Bouwstra e cols., 2003 e Haake e cols. 2001). Após a liberação do conteúdo dos corpos lamelares no espaço entre a camada granulosa e o SC, os lipídeos polares são enzimaticamente convertidos a lipídeos não polares e passam então a circundar os corneócitos - os glicolipídeos são convertidos em ceramidas e os fosfolipídeos em ácidos graxos. Além das ceramidas e ácidos graxos, o colesterol também é um importante lipídeo do SC. A mudança então da composição lipídica e da estrutura das células é responsável pela formação de uma estrutura densa no SC (Bouwstra e cols., 2003). Como o envelope córneo é impermeável, a composição lipídica da matriz intercelular do SC é responsável pela função de barreira atribuída à pele (barreira contra xenobióticos, perda de fluidos corporais e de água) (Bouwstra e cols., 2003 e Boury-Jamot e cols., 2006).

Os corneócitos inseridos na matriz intercelular são responsáveis pela função de barreira do estrato córneo, vital para a sobrevivência em diferentes condições

ambientais (Kalinin e cols., 2001), que é assegurada pela hidratação adequada do SC. Fatores como a umidade externa, a capacidade do tecido de recuperar a água perdida por evaporação e a capacidade de retenção de água, intrínseca ao tecido, são determinantes à hidratação do SC (Hara e cols., 2002).

A capacidade de retenção de água depende da estrutura do tecido, sua composição de lipídeos e proteínas e da concentração de osmólitos retidos na água - FNH (fatores naturais de hidratação). Tais osmólitos são representados por aminoácidos livres, íons e outros pequenos solutos (Hara-Chikuma e Verkman, 2005). Muitos componentes do FNH são provenientes de quebra de proteínas, por exemplo, a filagrina que se dá pela diminuição da umidade externa (Fluhr e cols., 2008). Além do teor de água do SC, este tecido possui um suprimento de água proveniente da derme e da epiderme, que auxilia sua hidratação em condições ambientais relativamente secas. Somados à propriedade de barreira do SC, a umidade externa e a capacidade de retenção de água pelo tecido são fatores determinantes para as propriedades físicas da pele e sua aparência (Hara-Chikuma e Verkman, 2005), uma vez que a baixa hidratação da pele é relacionada a peles envelhecidas (Brandner, 2007), e também a doenças como psoríase, dermatite atópica, eczema, ictiose hereditária e xerose senil (Hara e cols., 2002).

A importância da manutenção da hidratação adequada da pele também se relaciona com a plasticidade das proteínas dos corneócitos e do meio extracelular em que estas células estão inseridas. São também importantes para a atuação de enzimas do estrato córneo da epiderme, como por exemplo, as enzimas que atuam no processo de descamação da pele, como a predesquamina. Em peles secas há evidências da atividade prejudicada das enzimas transglutaminases, enzimas fundamentais que ligam as proteínas do envelope cornificado dos corneócitos. A hidratação da pele é, portanto, fundamental para assegurar o funcionamento normal dos processos bioquímicos e biofísicos da pele (Fluhr e cols., 2008).

1.1.2. Derme

A derme, camada da pele encontrada logo abaixo da epiderme, é um tecido que fornece suporte estrutural para a vascularização, apêndices da pele e para a

epiderme (Fisher e cols., 2008). Esta camada possui espessura variável entre 1 a 4 milímetros ao longo do organismo (Sampaio e Rivitti, 2007). É formada por uma malha de colágeno que funciona entrelaçada com as fibras de elastina, além de fibronectina, proteoglicanas, glicosaminoglicanas (GAGs), principalmente o ácido hialurônico, e outros componentes, que formam a matriz extracelular (MEC), formando um ambiente onde se encontram os fibroblastos, células do sistema imune, terminações nervosas, glândulas, como a sudorípara e a sebácea, folículos capilares, vasos sanguíneos e células endoteliais (Brohem e cols., 2010). As proteínas formadoras desta MEC são em grande parte produzidas e secretadas pelos fibroblastos (Bernstein e Uitto, 1996, Fisher e cols., 2008 e Rossetti e cols., 2010).

A derme pode ser dividida em duas partes: a derme papilar e a reticular. A derme papilar é uma camada pouco espessa que possui fibras colágenas finas, fibras elásticas e inúmeros fibroblastos, formando as papilas dérmicas. A derme reticular se encontra logo abaixo da papilar, se estende até a hipoderme e é a porção mais espessa da derme. É composta por feixes colágenos mais espessos que os da derme papilar e esses feixes são dispostos paralelamente à epiderme, em sua maioria. Possui uma menos quantidade de fibroblastos (Figura 4) (Sampaio e Rivitti, 2007).

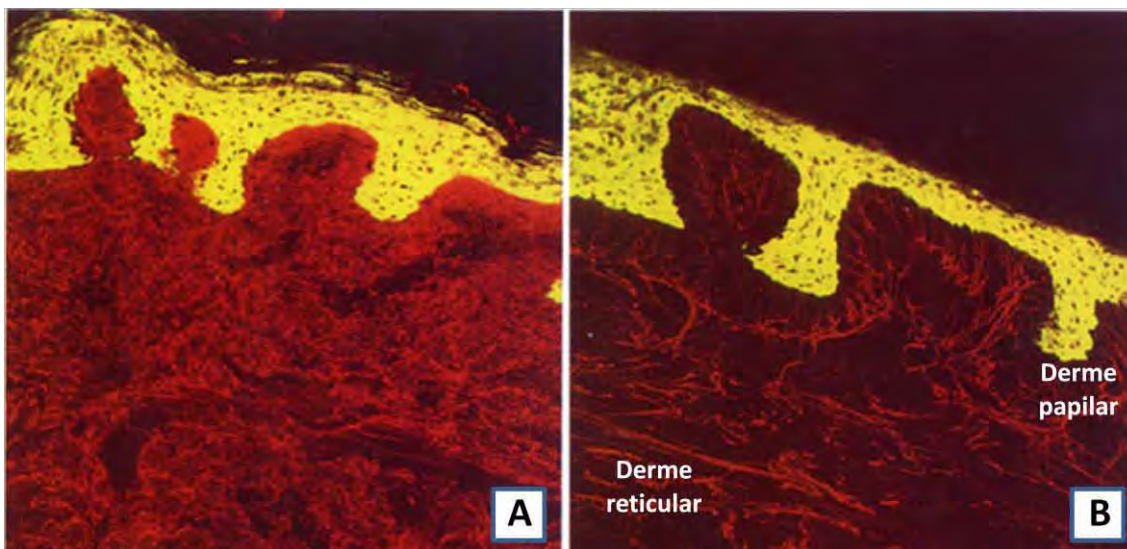


Figura 4 - **Microscopia Confocal de Varredura a Laser mostrando a epiderme (amarelo) e a derme (vermelho)**. Em A, a coloração vermelha evidencia o colágeno tipo I na derme de pele protegida da radiação UV e, a coloração amarela, evidencia a queratina epidérmica. Em B, a coloração vermelha se refere as fibras elásticas que são verticais a epiderme na derme papilar e, paralelas a epiderme na derme reticular. A coloração amarela de B se refere a queratina epidérmica (Adaptado de Bernstein e Uitto, 1996).

O envelhecimento natural da derme pode se ocorrer através de três mecanismos. Pode ocorrer atrofia dérmica por causa da perda de colágeno, degradação da rede de fibras elásticas e perda de hidratação e, essas alterações são irreversíveis e cumulativas, acompanhadas de perda da espessura da derme e diminuição da quantidade de fibroblastos (Bernstein e Uitto, 1996 e Uitto, 2008), fazendo com que rugas finas sejam vistas na pele (Uitto, 2008). Além da idade cronológica, há o envelhecimento da pele causado por fatores extrínsecos devidos a fatores ambientais, como o hábito de fumar, consumo excessivo de álcool, nutrição inadequada e exposição crônica à radiação UV (uma vez que grande parte dos sinais de envelhecimento causados pela exposição ambiental (extrínseco) são devidos a exposição à radiação UV, este é denominado fotoenvelhecimento), que são responsáveis pela maioria das características relativas à aparência envelhecida (Bernstein e Uitto, 1996; Baumann, 2007 e Uitto, 2008). Dentre as características relativas ao fotoenvelhecimento, destacam-se aparecimento de rugas mais profundas e sulcos com um aparente espessamento da pele, hipo- ou hiper-pigmentação, telangiectasias (pequenos capilares localizados na pele, finos e ramificados de coloração geralmente avermelhada) e tumores benignos e malignos e, histopatologicamente, ocorre o acúmulo de material elástico anormal (elastina e fibrilinas), ou elastose (Bernstein e Uitto, 1996 e Uitto, 2008).

São três os principais componentes estruturais da MEC dérmica: colágeno, elastina e glicosaminoglicanas, que serão discutidos detalhadamente mais adiante (Baumann, 2007).

1.1.3. Hipoderme

A hipoderme é a camada mais profunda da pele (Figura 1). Esta camada possui espessura variável e é composta exclusivamente por tecido adiposo (células repletas de gordura). Relaciona-se em sua porção superior à derme reticular. As funções da hipoderme são depósito nutritivo de reserva, participação no isolamento térmico e proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos. Esta camada

facilita a motilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (Sampaio e Rivitti, 2007).

1.2. Proteínas de Interesse

1.2.1. Aquaporinas

As membranas plasmáticas das células são, pelo menos moderadamente, permeáveis a água. Mas há células que transportam mais água do que pode explicar o simples processo de difusão pela membrana plasmática (Knepper, 1994). A maior permeabilidade à água de alguns tipos celulares está associada à presença de uma família de canais transmembrana, pequenos, hidrofóbicos que formam um canal seletivo de água através da membrana plasmática das células, as aquaporinas (AQPs), que aumentam o transporte de água de 5 a 50 vezes, quando comparadas a células que transportam água principalmente pela bicamada lipídica (Hara-Chikuma e Verkman, 2008a e Papadopoulos e cols., 2008). Ishibashi e colaboradores (1997) descrevem as AQPs de uma forma geral, como proteínas que contêm 6 domínios transmembrana, unidos por 5 *loopings*. Em relação a sua montagem na membrana plasmática, são estruturas homotetraméricas montadas na membrana plasmática das células onde cada monômero se estabelece como um poro funcional, e cada poro têm aproximadamente o diâmetro de uma molécula de água (Knepper, 1994). As aquaporinas funcionam então como poros para o transporte passivo, de acordo com um gradiente osmótico transmembrana no transporte de água e de acordo com um gradiente de glicerol, quando ocorre transporte do mesmo (Hara-Chikuma e Verkman, 2008a).

Várias centenas de AQPs foram identificadas em vários organismos, como fungos, bactérias, insetos, anfíbios, mamíferos e plantas (Boury-Jamot e cols, 2006 e Wang e cols., 2005). Em mamíferos, são 13 as AQPs descritas (AQP 0-12) que são divididas de acordo com sua permeabilidade. Há aquaporinas responsáveis apenas pelo transporte de água (AQP 0, 1, 2, 4, 5 e 8) e outras que além de água, transportam também pequenos solutos, como o glicerol, denominadas aquagliceroporinas (AQP 3,

7, 9 e 10). Os canais que transportam apenas as moléculas de água são mais estreitos em toda sua extensão que os canais das aquagliceroporinas (Boury-Jamot e cols., 2006, Hara-Chikuma e Verkman, A.S., 2008a e Wang e cols., 2005). Há também uma terceira classe de aquaporinas, AQP6, AQP11 e AQP12, que ainda não são bem compreendidas (Boury-Jamot e cols., 2009). Há AQPs que desempenham papéis relacionados à reabsorção de água e concentração de urina nos rins (AQP 1, 2, 3 e 4), transporte de glicerol nos rins (AQP7) (Boury-Jamot e cols., 2006), processos metabólicos (AQP7 em casos de obesidade e AQP9 no metabolismo de glicerol), casos de edema cerebral e migração celular, dentre outros (Hara-Chikuma e Verkman, 2008a).

Na pele humana, a aquaporina mais estudada e compreendida é a AQP3, presente em queratinócitos da epiderme (Hara-Chikuma e Verkman, 2006). Além da AQP3, outras aquaporinas são descritas na pele humana, como a AQP1, expressa em células endoteliais, facilitando o transporte de água do sangue para a derme, AQP7 em adipócitos hipodérmicos, AQP5 relacionada à secreção das glândulas sudoríparas (Boury-Jamot e cols., 2009), AQP9 em culturas de queratinócitos diferenciados humanos e no estrato granuloso da epiderme de camundongos (Hara-Chikuma e Verkman, 2008a) e AQP10 em queratinócitos não diferenciados (Boury-Jamot e cols. 2006).

A AQP3 e a AQP9 (Figura 5) são proteínas que transportam água e glicerol, e são por isso pertencente à classe das aquagliceroporinas estando relacionadas à hidratação da pele (Boury-Jamot e cols., 2009). A AQP3 é a aquaporina melhor estudada na pele e é a mais expressa em queratinócitos, principal tipo celular da epiderme, camada que recobre o corpo humano (Boury-Jamot e cols., 2006 e Bellemère e cols., 2008). Além da epiderme humana, a presença da AQP3 também foi descrita na epiderme de ratos e camundongos (Hara-Chikuma e Verkman, 2005).

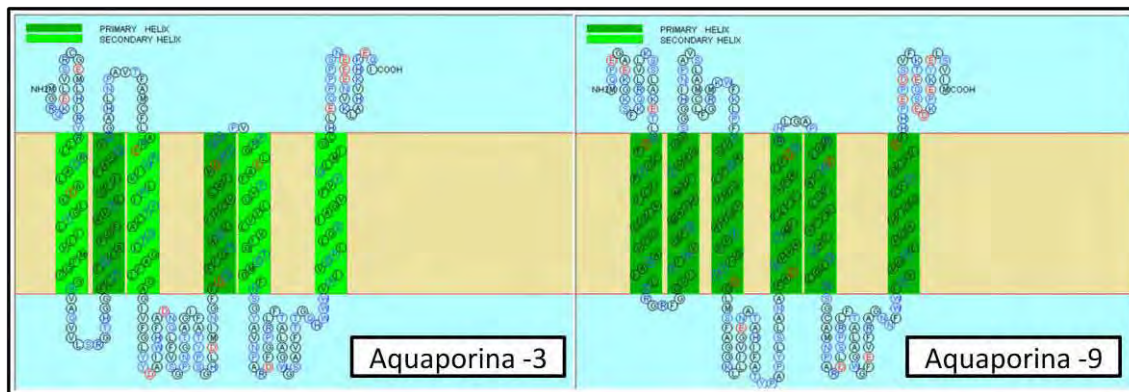


Figura 5 – **Estrutura bidimensional da aquaporina-3 (AQP3) e da aquaporina-9 (AQP9)**. A estrutura mostra que a AQP3 e a AQP9 são proteínas integrais de membrana com 6 domínios transmembranais e 5 alças unindo tais domínios (Figura gerada pelo sistema Sosui em 15/05/2009).

A AQP9, além de permeável a água e ao glicerol, é também permeável a solutos não carregados como uréia, purinas e pirimidinas (Sugiyama e cols., 2001 e Rojek e cols., 2007). Esta aquagliceroporina é expressa na membrana plasmática das células de Leydig em testículos de ratos, no cérebro e na medula espinhal também de ratos, na membrana apical da trofoderme do blastocisto de camundongos, no sinciotrofoblasto da placenta humana e em linfócitos periféricos, mas é no fígado que é principalmente expressa, onde se acredita que tenha um importante papel no metabolismo de glicerol, uma vez que camundongos AQP9 nulos possuem altos níveis de glicerol no plasma (Rojek e cols., 2007). Também foi descrita em culturas de queratinócitos humanos apenas já diferenciados e no estrato granuloso da epiderme de camundongos (Figura 6) (Sugiyama e cols., 2001 e Rojek e cols., 2007).

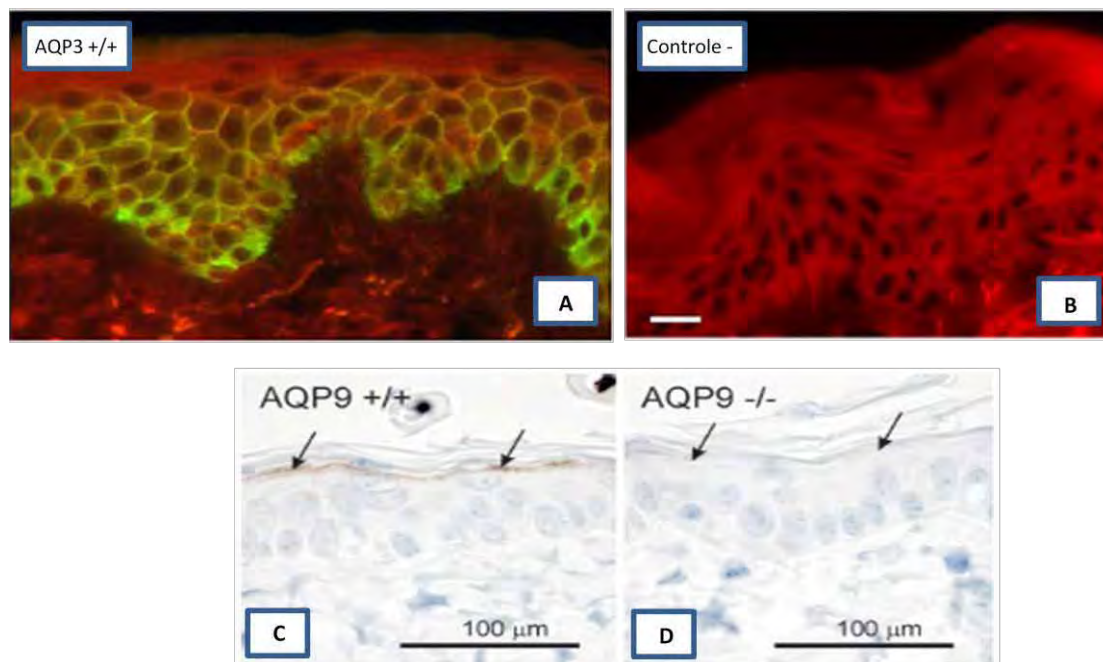


Figura 6 - **Localização da aquaporina-3 e da aquaporina-9 na pele.** Imunofluorescência da pele epiderme humana (A e B). A AQP3 está presente no estrato basal e no estrato granuloso (A). Em B, controle negativo para a coloração (Boury-Jamot e cols., 2006). Imunohistoquímica da pele normal do dorso de camundongos AQP9 +/+ (C) e AQP9 -/- (D). Em C, a coloração é referente à presença de AQP9 no estrato granuloso da epiderme de camundongos AQP9 +/+ e, em D, a ausência de coloração significa ausência de AQP9 em camundongos AQP9 -/- (Adaptação de Boury-Jamot e cols., 2006 e Rojek e cols., 2007).

Em relação à distribuição na epiderme humana, a AQP3 é localizada em quase todas as camadas da epiderme, exceto no estrato córneo. Como dito anteriormente, é muito expressa na camada basal dos queratinócitos epidermais, porém muito pouco expressa no estrato granuloso (Brandner e cols., 2007 e Li e cols., 2010). Esta diferença de expressão entre os estratos da epiderme pode estar relacionada ao aumento da impermeabilidade a água na interface do estrato granuloso e do estrato córneo. Esta descontinuidade de água entre estes dois estratos é importante na manutenção da estrutura da epiderme pelo fato da estrutura de água e lipídeo lamelar do SC (importante na manutenção da permeabilidade da pele) ficar altamente organizada em condições de baixa hidratação (Li e cols., 2010). Em relação ao estrato granuloso, a presença de AQP3 é incerta. Boury-Jamot e colaboradores (2009) mostraram por ensaio de imuno-histoquímica ausência da AQP3 na camada em questão.

As análises a respeito da função da AQP3 na pele têm sido realizadas em camundongos nulos (*knockout*) para este gene. Estes camundongos *knockout* apontam

um papel importante da AQP3 na manutenção da hidratação da pele, por apresentarem diminuição da permeabilidade à água e ao glicerol e diminuição da capacidade de retenção de água pelo SC. A AQP3 também pode estar relacionada à regulação da diferenciação e proliferação dos queratinócitos, pelo fato de camundongos AQP3 nulos apresentarem atraso na recuperação de barreira e no processo de cicatrização. Além disso, estes camundongos apresentam redução da elasticidade da pele e, apesar de apresentarem estrutura normal da pele, a hidratação do SC é baixa, ocasionando o fenótipo de pele seca e diminuição da quantidade de glicerol no SC (Boury-Jamot e cols., 2006 e Bellemère e cols., 2008 e Hara-Chikuma e Verkman, 2007). Esses fenótipos sugerem a participação da AQP3 na regulação da diferenciação e proliferação dos queratinócitos (Zheng e Bollag, 2003).

Como na epiderme humana há expressão de AQP3 e AQP9 e o fato de camundongos AQP3 nulos apresentarem deficiência na hidratação da pele e diminuição da elasticidade deste tecido, a AQP9 pode estar envolvida na manutenção da hidratação da pele (Rojek e cols., 2007).

Em grande parte, os fenótipos provocados pelo *knockout* da AQP3 são corrigidos pela aplicação tópica ou oral de glicerol cujo transporte comprometido pela ausência de canais de AQP3 na membrana plasmática de queratinócitos da epiderme. A hidratação, elasticidade e funções de barreira prejudicadas são corrigidas pela aplicação do glicerol (Zheng e Bollag, 2003), pelo fato do glicerol ter propriedades umectantes (retenção de água na pele) e osmóticas, mostrando que a AQP3 é fundamental, portanto, para a manutenção das características da pele e para assegurar as propriedades bioquímicas do glicerol (Hara-Chikuma e Verkman, 2006).

Das importantes funções do glicerol, se destacam: metabolismo energético, funcionando como substrato para a biosíntese de vários lipídeos e desempenhando importante papel em funções fisiológicas como glicogênese, síntese de lipídeos, homeostase da glicose, osmoregulação e apoptose (Zheng e Bollag, 2003).

A expressão da AQP3 é diminuída, de maneira dose-dependente e tempo-dependente, em culturas de queratinócitos humanos submetidas à radiação UV (Cao e cols., 2008). Por ser relacionada à hidratação da pele, mudanças na expressão da AQP3

podem ser causa ou conseqüência da desidratação da pele e, conseqüentemente, sinais de fotoenvelhecimento (Cao e cols., 2008 e Boury-Jamot e cols., 2009). Sua expressão é aumentada em condições de estresse osmótico, em condições de hiperosmolaridade e é também expressa em tecidos expostos a perda de água (Boury-Jamot e cols., 2009).

A AQP3 transporta o glicerol que é importante para a regulação da diferenciação e proliferação dos queratinócitos. Enquanto o aumento da expressão de AQP3 estimula a diferenciação dos queratinócitos, via proteína quinase C (PKC), ela inibe a proliferação destas células epidermais. A diferenciação é estimulada pelo aumento da síntese de marcadores de diferenciação, como a involucrina, que tem seu ciclo coincidindo com o ciclo modulador dos queratinócitos. A modulação da expressão da AQP3 é um processo complexo e de grande importância na regulação da proliferação e diferenciação dos queratinócitos e juntamente com a AQP1 e AQP4 é importante em processos de cicatrização (Boury-Jamot e cols. 2009).

1.2.2. Fibronectina – molécula de adesão

De grande importância para a homeostase da epiderme e manutenção do equilíbrio hídrico da pele é a adesão entre os queratinócitos, dos queratinócitos com a lâmina basal e a interação destas células com a derme, uma camada subjacente. (Haake e cols., 2001). Uma proteína fundamental para esse processo é a fibronectina, uma glicoproteína da matriz extracelular, que interage fortemente com outros componentes da matriz e é utilizada por muitos tipos celulares como substrato para a adesão celular e organização tecidual (McKeown-Longo e Mosher, 1983, Kwon e cols., 2007 e Kang e Jang, 2009). Possui uma estreita associação com colágeno, proteoglicanas, ácido hialurônico, componentes da matriz extracelular, e com outras células a partir de receptores específicos para integrina (McKeown-Longo e Mosher, 1983).

A fibronectina é a principal proteína da matriz extracelular, está presente na junção derme-epiderme e é envolvida na adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Kang e Jang, 2009 e Obara e cols., 2010), tendo sua expressão

umentada durante a embriogênese, angiogênese e em sítios de cicatrização (Antia e cols., 2008 e Kang e Jang, 2009).

1.2.3. Proteínas do envelope

1.2.3.1. Filagrina

Conforme os queratinócitos vão se diferenciando e migrando para camadas mais externas da epiderme vão acumulando proteínas responsáveis pela diferenciação terminal que ocorre com as células que atingem o estrato córneo epidérmico (Proksch e cols., 2008). Um importante passo para esta diferenciação ocorre entre o estrato granuloso e o estrato córneo, com a expressão da filagrina (do inglês *filament-aggregation protein*), proteína responsável pela agregação dos filamentos de queratina durante a diferenciação terminal dos queratinócitos (Kuechle e cols. 2000 e Sandilands e cols. 2009), e tem seu gene situado dentro do complexo de diferenciação epidermal, um cluster de mais de 30 genes expressos durante a diferenciação terminal dos queratinócitos, localizado no cromossomo humano 1q21 (Koch e cols., 2000 e Sevilla e cols., 2007). O estrato granuloso, como discutido anteriormente, contém grânulos de querato-hialina que contém principalmente pró-filagrina em seu interior.

A pró-filagrina é uma proteína grande altamente fosforilada (prevenindo sua associação prematura com filamentos de queratina) e insolúvel (facilitando seu armazenamento nos grânulos de querato-hialina), esta proteína possui repetições em tandem de unidades de polipeptídeos de filagrina em sua região central, que varia de 10, 11 ou 12 repetições (Figura 7).

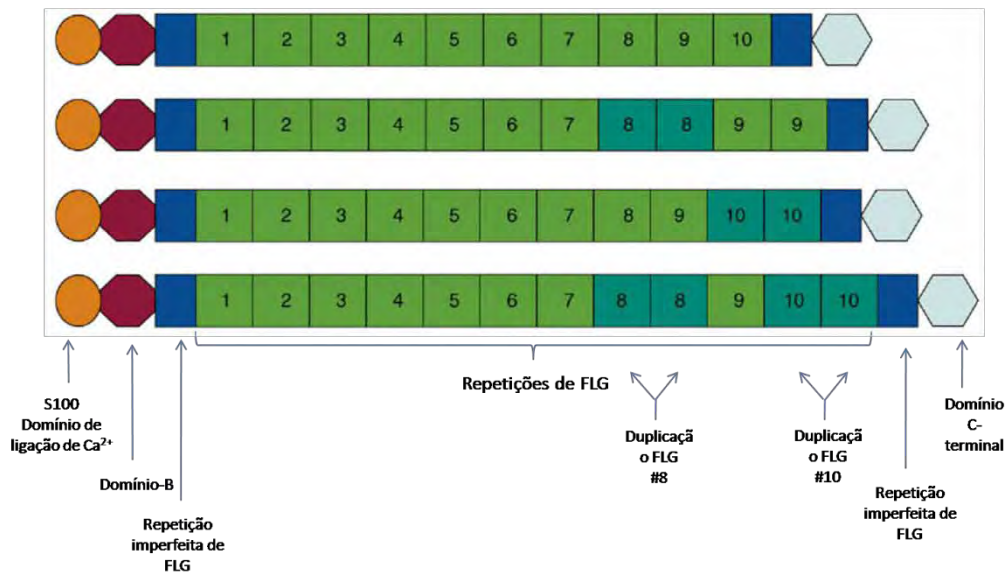


Figura 7 – **Representação da proteína da Pró-Filagrina.** A região central da proteína pró-filagrina, precursora da filagrina (FLG) é organizada em tandem, com repetições de polipeptídeos de filagrina que variam de 10, 11 ou 12 repetições. A enzima caspase-14 é responsável pela proteólise da pró-filagrina a monômeros de filagrina (Adaptado de McGrath e Uitto, 2007).

Durante a diferenciação dos queratinócitos, por aumento dos níveis de cálcio, há degranulação dos grânulos de querato-hialina dos queratinócitos e a pro-filagrina sofre proteólise, pela ação da enzima proteolítica caspase-14, e posterior defosforilação a monômeros de filagrina (FLG) (Figura 8). A filagrina, ao contrário da pró-filagrina, agrega e alinha os filamentos intermediários de queratina, principal produto dos queratinócitos, em arranjos firmes, contribuindo para a compactação celular, fazendo com que as células se tornem achatadas, e permitindo a ação de transglutaminases, enzimas que atuam ligando estes filamentos intermediários de queratina formando uma matriz lipoprotéica altamente insolúvel (Sandilands e cols., 2009, Proksch e cols., 2008 e McGrath e Uitto, 2007) no estrato córneo (Haake e cols., 2001). Juntas, filagrina e queratina constituem 80-90% em massa protéica da epiderme (Haake e cols., 2001).

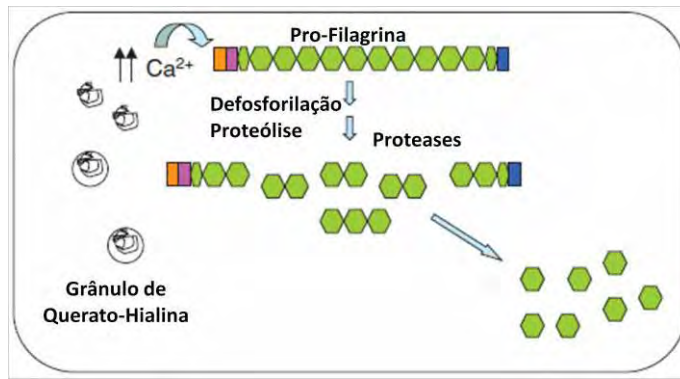


Figura 8 – **Proteólise e defosforilação da pro-filagrina durante a diferenciação dos queratinócitos.** Os grânulos de querato-hialina do estrato granuloso sofrem degranulação em resposta ao aumento de cálcio, ocasionando a defosforilação e proteólise da pró-filagrina em filagrina, proteína responsável pela agregação dos filamentos de queratina (Adaptado de Sandilands e cols., 2009).

Problemas na formação da filagrina em camundongos Caspase-14 nulos mostram que esta proteína é responsável pela manutenção das propriedades de barreira fisiológica da pele humana. Estes camundongos apresentaram aumento da perda trans-epidermal de água, afetando a osmolaridade e hidratação da pele (McGrath e Uitto, 2007). Ainda relacionadas à expressão anormal de filagrina, aparecem doenças como dermatite atópica e ictiose vulgar, acarretando características de pele seca e escamosa em ambas, pela alteração da diferenciação terminal dos queratinócitos (Kuechle e cols., 2000 e McGrath e Uitto, 2007).

Ainda no estrato granuloso, os queratinócitos expulsam os grânulos lamelares, derivados de Golgi, e a morte celular é iniciada. Há posterior proteólise do núcleo e de organelas celulares, e a capacidade da síntese protéica é perdida (McGrath e Uitto, 2007).

1.2.3.2. Involucrina (INV)

A involucrina é uma proteína estrutural que é sintetizada no estrato espinhoso e tem ação no estrato granuloso da epiderme humana onde é de fundamental importância na formação do envelope córneo (Candi e cols., 2005). O locus da involucrina também se encontra dentro do complexo de diferenciação epidermal, no cromossomo humano 1q21 (Koch e cols., 2000 e Sevilla e cols., 2007). A INV é formada

por unidades peptídicas repetitivas que se reorganizam durante a diferenciação dos queratinócitos. Forma o envelope córneo, juntamente com outras proteínas como loricrina, thricohialina e pequenas proteínas ricas em prolina, servindo de molde para a formação do envelope lipídico, que se forma logo acima deste envelope protéico. A involucrina se liga a todas as outras proteínas do envelope córneo e é substrato principal para a ligação de ω -hidroxiceramidas e outros lipídeos do envelope lipídico. As proteínas do envelope córneo são ligadas por transglutaminases e constituem 7 a 10% da massa da epiderme (Candi e cols., 2005 e Sevilla e cols., 2007).

1.2.4. Colágeno

O colágeno, proteína da matriz extracelular produzida pelos fibroblastos, é a proteína mais abundante na pele (95% do tecido conectivo dérmico) em humanos e o principal componente estrutural da derme, e confere integridade para a estrutura da pele além de força e suporte para a pele (Sampaio e Rivitti, 2007, Baumann, 2007, Fisher e cols., 2008 e Uitto, 2008). A pele possui vários tipos de colágeno que se organizam em fibras, formando redes. O colágeno tipo I é o mais abundante e significativo, representando 80-90% do colágeno total (Figura 4) (Sampaio e Rivitti, 2007 e Baumann, 2007). O tipo III representa aproximadamente 15% do colágeno total e aumenta em quantidade em peles envelhecidas, onde há diminuição do colágeno tipo I. A derme ainda possui o colágeno tipo IV, constituinte da junção dermo-epidérmica e o colágeno tipo VII nas fibrilas de ancoragem que ligam a zona da membrana basal à derme papilar subjacente. A diminuição tanto de colágeno tipo IV quanto do tipo VII estão relacionados à formação de rugas (Baumann, 2007).

A rede de colágeno é organizada e mantida por tensão mecânica pelos fibroblastos (Fisher e cols., 2008 e Uitto, 2008). Esta tensão mecânica se dá pela conexão existente entre as integrinas (receptores de superfície dos fibroblastos) e o citoesqueleto de actina e miosina do interior da célula e entre as integrinas e proteínas da MEC. A ligação citoesqueleto-integrinas “puxa” a rede de fibras colágenas, gerando uma força que oferece resistência, criando tensão dentro dos fibroblastos e da matriz de colágeno. Esta força gera uma força contrária que provoca o alongamento celular

normal (Fisher e cols., 2002 e Fisher e cols., 2008). O complexo de adesão focal (formado pelas proteínas da MEC, integrinas e citoesqueleto) e as forças geradas pelas interações, dão origem a uma tensão mecânica, que possui importante função regulatória e mecânica, incluindo o balanço da produção e colapso de colágeno (quanto maior a tensão mecânica, maior a síntese de colágeno), síntese de outros componentes da MEC e formação de sítios de ligação que permitem que os fibroblastos se espalhem (característica relacionada à sobrevivência, função e crescimento) (Verani e cols., 2006 e Fisher e cols., 2008). A tensão formada pelo complexo de adesão focal diminui com o passar da idade e ocorre também o aumento da produção de metaloproteinases (MMPs), enzimas capazes de degradar o colágeno e a elastina, causas importantes das alterações moleculares que estão na base da aparência envelhecida em peles de idades mais avançadas (Fisher e cols., 2008 e Verani e cols., 2006).

Duas propriedades inatas das fibras de colágeno são responsáveis pela redução da integridade estrutural que acompanha o envelhecimento da pele: meia vida longa (~15 anos) e ligações intra e intermolecular, que são altamente resistentes ao colapso. A meia vida longa do colágeno permite o acúmulo de modificações, como o surgimento de novas ligações cruzadas, como por exemplo, pelo açúcar (Fisher e cols., 2008). Como estas novas ligações não são eficientemente removidas durante o processo lento e normal de colapso do colágeno e não podem ser reparadas ou incorporadas em novas fibras, ocorre o acúmulo de colágeno fragmentado na MEC, o que prejudica sua estrutura, integridade mecânica e função, pois juntamente com o acúmulo deste colágeno fragmentado, há a diminuição da tensão mecânica (e consequente diminuição da produção de colágeno), fazendo com que as células migrem menos, além de haver diminuição das adesões focais e dissociação das fibras de colágeno da actina (Rabe e cols., 2006, Verani e cols., 2006 e Fisher e cols., 2008). O acúmulo de colágeno fragmentado está no coração das mudanças em relação à idade na aparência da pele humana (Fisher e cols., 2008).

Além do colágeno fragmentado, em peles envelhecidas cronologicamente ou danificadas pela radiação UV (fotoenvelhecimento) há uma diminuição na síntese de colágeno pelos fibroblastos e uma diminuição no número de fibroblastos com a idade,

aumento da síntese de MMPs e conseqüente aumento da degradação do colágeno, fatores relacionados à senescência dos fibroblastos (Fisher e cols., 2002, Varani e cols., 2006 e Baumann, 2007). Esta diminuição da síntese de colágeno pode ser explicada pelo rompimento da estrutura de colágeno da MEC e concomitante diminuição da tensão mecânica, diminuindo a expressão de pró-colágeno e, a redução de fibroblastos é, em parte, devido à diminuição da tensão mecânica que aumenta apoptose em modelos de sistemas celulares (Fisher e cols., 2002). Portanto, os 2 mecanismos que contribuem para a idade cronológica da pele são a perda de tensão mecânica e a diminuição da síntese de colágeno, que permanece em baixos níveis, não sendo capaz de reparar ou repor o colágeno que sofre degradação em processos idade-dependentes (Verani e cols., 2006 e Uitto, 2008). Os mecanismos relacionados ao surgimento das características da idade avançada da pele estão ilustrados na Figura 9.

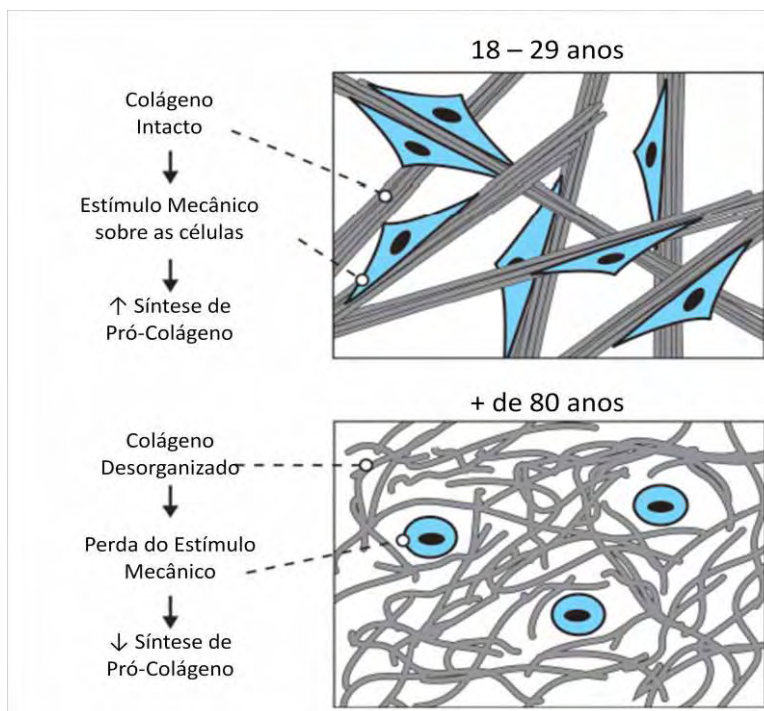


Figura 9 - **Representação esquemática das diferenças de síntese de colágeno em peles jovens e envelhecidas.** Com o passar do tempo, aumenta a quantidade de colágeno fragmentado na derme, diminui a tensão mecânica e o número de fibroblastos. (Adaptado de Verani e cols., 2006)

A exposição da pele a radiação ultravioleta, principalmente a radiação UVB, aumenta a síntese de MPPs, acentuando ainda mais os sinais de foto-envelhecimento (Baumann, 2007).

1.2.5. Elastina

As fibras elásticas da derme são essenciais ao tecido conectivo dérmico e são sintetizadas pelos fibroblastos fazendo parte da MEC (Rossetti e cols., 2010). São responsáveis por 1-2% da massa seca total da pele humana (Bernstein e Uitto, 1996). Estas fibras são formadas principalmente por um núcleo central amorfo de elastina (altamente insolúvel) e envolvidas externamente por componentes microfibrilares onde o componente mais importante é a fibrilina (Sampaio e Rivitti, 2007, Kielty e cols., 2002, Uitto, 2008 e Rossetti e cols., 2010) e são interligadas formando uma rede através de toda a derme conferindo elasticidade e resiliência para a pele (Kielty e cols., 2002 e Uitto, 2008). Na derme papilar de peles jovens, as fibras elásticas orientam-se perpendicularmente a epiderme e, na derme reticular, mostram-se mais espessas do que na derme papilar e dispostas paralelamente à epiderme (Figura 8) (Sampaio e Rivitti, 2007 e Baumann, 2007). Esta rede desaparece gradualmente com a idade, diminuindo a elasticidade da pele, causando, portanto, flacidez em peles idosas (Baumann, 2007). A taxa de biosíntese de elastina se mantém estável até cerca dos 30-40 anos de idade e, a partir daí, a capacidade de reposição da elastina é perdida e aumenta o processo de degradação, resultando em flacidez e redução da elasticidade da pele (Uitto, 2008 e Rossetti e cols., 2010).

Um balanço controlado entre a síntese da elastina e componentes microfibrilares e suas interações, são essenciais para a formação normal das fibras elásticas. A degradação da elastina pelo aumento de liberação de elastases pelos fibroblastos com o passar da idade (Rossetti e cols., 2010), ocorre ao mesmo tempo em que a capacidade de reposição de colágeno é perdida e os níveis de GAGs diminuem, reduzindo a hidratação da pele. Todos estes eventos levam a atrofia dérmica (Uitto, 2008). A radiação UV induz um acúmulo massivo de um material elastótico não funcional na derme papilar, chamado elastose solar (Baumann, 2007 e

Rossetti e cols., 2010) (ocorre pelo aumento de elastina e diminuição de fibrilina-1, um importante componente microfibrilar, prejudicando a montagem das fibras elásticas) (Lee e cols., 2008) e induz também o espessamento e enovelamento das fibras elásticas na derme papilar. Se a exposição à radiação UV for crônica, tais mudanças podem ocorrer também na derme reticular. Estas alterações no material elástico levam ao envelhecimento da pele (fotoenvelhecimento) (Baumann, 2007 e Rossetti e cols., 2010).

1.2.6. Glicosaminoglicanas

Assim como o colágeno e a elastina, as glicosaminoglicanas (GAGs) são responsáveis pela aparência da pele (Baumann, 2007). São polissacarídeos da MEC, responsáveis por 0,1-0,3% da massa seca total da pele, que podem se ligar a até 1000 vezes o seu próprio volume em água (Bernstein e Uitto, 1996 e Uitto, 2008). O conteúdo e a distribuição, portanto, destes polissacarídeos dérmicos tem uma relação direta à manutenção e retenção de água da pele, tornando este tecido macio e hidratado (Bernstein e Uitto, 1996, Baumann, 2007 e Uitto, 2008). A formação de um ambiente aquoso é fundamental para a migração celular, troca de nutrientes e remoção de resíduos (Bernstein e Uitto, 1996). O ácido hialurônico (AH) e o dermatan sulfato, são as principais GAGs presente na pele e, principalmente o primeiro aparece reduzido em peles envelhecidas. O AH aparece na periferia das fibras de colágeno e elastina, e suas intersecções e, sua diminuição, faz com que se dissocie das fibras de colágeno e elastina, diminua a sua capacidade de retenção de água, criando um ambiente propício para o surgimento de sinais relacionados ao envelhecimento da pele, como rugas, diminuição da elasticidade, da turgidez e do suporte a microvasculatura da pele (Baumann, 2007).

1.3. *Bidens pilosa*

A espécie *Bidens pilosa* possui vários nomes populares, como Picão Preto, carrapicho, carrapicho-de-agulha, carrapicho-de-duas-pontas, amor-seco, pico-pico,

coambi, dentre outros, de acordo com o local onde é encontrada (Lorenzi e Matos, 2002). É uma erva medicinal da família *Asteraceae*, proveniente da América tropical que varia em altura, de 30-130 centímetros e possui flores amarelas, como ilustra a Figura 10. É nativa da América tropical, mas tem uma ampla dispersão, nos trópicos e sub-trópicos, desde o nível do mar até cerca de 3000 metros de altitude (Lorenzi e Matos, 2002, Abajo e cols., 2004 e Costa e cols., 2008).



Figura 10 – *Bidens pilosa*. Da família *Asteraceae*, a espécie *Bidens pilosa* é uma planta que possui flores amarelas e se distribui nos trópicos e sub-trópicos.

Na agricultura brasileira, é considerada uma planta daninha, crescendo espontaneamente nas lavouras (Lorenzi e Matos, 2002). Na medicina popular, a espécie *Bidens pilosa* tem sido relacionada ao tratamento de problemas hepáticos, como hepatite e icterícia, laringites, dores de cabeça e distúrbios digestivos, além de ser utilizada como anti-inflamatório, diurético, atividade anti-reumática, anti-diabética, alta atividade bactericida, antioxidante e atividade contra a malária (Costa e cols., 2008). Também é utilizada no tratamento de dor, febre, angina, edema, infecções, feridas, resfriado, gripe e infecções do trato urinário e previne o aumento da pressão arterial por excesso de sal em ratos (Sundararajan e cols., 2006, Yang e cols., 2006 e Kwiecinski e cols., 2008).

Esta espécie possui atividades farmacológicas, devido à presença de compostos como poliacetilenos, hidrocarbonetos que absorvem ondas longas de radiação UV, modificando sua atividade após a exposição (foto-ativação), que inibem

microorganismos patogênicos, possui efeito citotóxico sobre parasitas e modificam células em cultura, e os flavonóides, que funcionam como antiinflamatório e antioxidante, sendo que esta última atividade é devida presença da quercetina, o principal flavonóide presente na espécie *B. pilosa*, que tem mostrado suprimir tumores em camundongos (Abajo e cols., 2004, Costa e cols., 2008 e Kwiecinski e cols., 2008). Estes poliacetilenos possuem importante atividade imunomodulatória atuando prioritariamente no aumento da expressão e TNF- α (fator de necrose tumoral α) e IL-1 (interleucina-1). Estes mediadores são importantes para o aumento da expressão de predesquamina (Abajo e cols., 2004), uma proteína da epiderme, expressa nos queratinócitos da superfície do estrato granuloso e nas camadas mais profundas do estrato córneo. A predesquamina está envolvida no processo de diferenciação e proliferação celular, controlando a descamação da pele e, conseqüentemente, a permeabilidade a água (Brysk e cols., 1993; Brysk e cols., 1994 e Yen e cols., 1994). Um poliacetileno presente em *Bidens pilosa*, o (*R*)-1,2-dihydroxytrideca-3,5,7,9,11-pentayne, extraído da parte aérea da planta, é descrito por Tobinaga e cols., 2009 como uma substância com potente atividade inibitória no crescimento de *Plasmodium falciparum* e bactérias patogênicas *in vitro* e diminuição do *Plasmodium berghei in vivo*. Esta espécie possui também ácido fitânico (Chang e cols., 2000), composto quimicamente semelhante ao atRA, como ilustra a Figura 11. Como discutido adiante, o ácido retinóico atua sobre a proliferação e diferenciação celular, aumentando a expressão da aquaporina-3 e aumentando a síntese de colágeno, fibras elásticas e controla a proliferação dos fibroblastos dérmicos (Bellemère e cols., 2008 e Jurzak e cols., 2008).

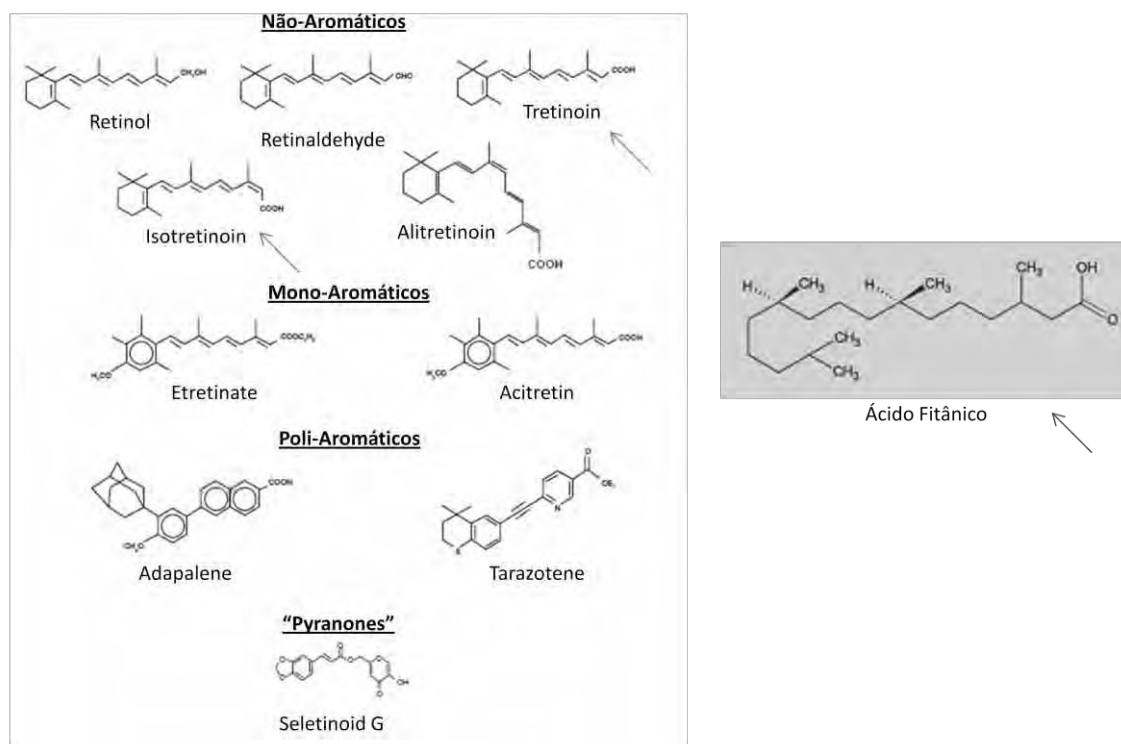


Figura 11 – **Estrutura química dos retinóides**. São apresentadas as estruturas químicas dos retinóides naturais e sintéticos e do ácido fitânico (Adaptado de Mukherjee e cols., 2006).

1.4. Retinóides

A família do ácido retinóico corresponde à vitamina A (retinol) e seus derivados naturais – retinaldeído, ácido retinóico e retinil éster - e sintéticos, chamados retinóides (Mukherjee e cols., 2006 e Rabe e cols., 2006). Estes retinóides são importantes para vários processos metabólicos, como embriogênese, reprodução, diferenciação, proliferação e apoptose (Bellemère e cols., 2008). O retinol é uma molécula de 20 carbonos, onde há um anel de seis carbonos e uma cadeia lateral com quatro duplas ligações em conformação *trans* e um grupo álcool final, daí a denominação *all-trans-retinol*. A oxidação deste grupo final leva formação de um grupo aldeído (*all-trans retinaldehyde* ou retinal) e a oxidação deste grupo aldeído, forma o grupo ácido carboxílico (todos os ácidos retinóicos em conformação *trans* ou *tretinoin*). A vitamina A não é sintetizada pelo organismo, necessitando ser administrado ao organismo (Mukherjee e cols., 2006). Os ácidos retinóicos em conformação *trans* (atRA) é o retinóide melhor compreendido nas pesquisas de cuidados da pele. Estudos mostram que a aplicação tópica do atRA diminui

significativamente os efeitos do foto-envelhecimento causado por radiação UV, como rugas, perda de água e capacidade de cicatrização diminuída (Cao e cols., 2008).

O ácido retinóico é amplamente utilizado em preparações cosméticas de uso tópico, mostrando efeitos benéficos na pele humana com sinais de envelhecimento, como a desidratação. É um ácido que minimiza a diminuição da expressão de AQP3, causada pela radiação ultra-violeta (UV), de maneira dose-dependente e tempo-dependente, diminuindo o foto-envelhecimento da pele. Isso provavelmente ocorre porque previne a diminuição da quantidade de glicerol na pele, e conseqüentemente à quantidade de água da pele, já que a desidratação da pele é o principal fator que se relaciona aos sinais de idade (Cao e cols., 2008). Outro mecanismo relacionado à prevenção do fotoenvelhecimento da pele pelo ácido retinóico é que ele estimula a proliferação dos queratinócitos e inibe sua diferenciação, aumentando a espessura do estrato córneo (Bellemère e cols., 2008).

O mecanismo de ação da tretinoína, um *atRa*, se dá através de duas famílias de receptores nucleares específicos denominados, RARs (família de receptores nucleares de ácido retinóico) e RXRs (receptor X de retinóides). Cada família possui as classes α , β e γ . Os receptores RARs sempre se associam formando heterodímeros com os RXRs. No caso do ácido retinóico, um receptor da família RAR da classe γ se liga a um receptor da classe α da família RXR, formando um heterodímero. Neste heterodímero, o receptor da família RAR é o local onde ocorre a ligação do ácido retinóico, mas para que esta ligação ocorra, é fundamental a presença física do receptor da família RXR. No RAR deste complexo heterodimérico, sequências específicas no DNA, na região promotora de genes-alvo, se ligam ativando a transcrição gênica. Estes receptores nucleares também são ativados pela vitamina D, esteróides e hormônios da tireóide (Mukherjee e cols., 2006 e Jurzak e cols., 2008). Bellemère e colaboradores, (2008) descrevem em seu trabalho que o uso de um agonista do receptor RAR γ , aumenta significativamente o mRNA de AQP3 em cultura de queratinócitos epidermais normais humanos de maneira dose-dependente.

Além de melhorar a aparência da pele com sinais de fotoenvelhecimento ou envelhecimento cronológico através de receptores intracelulares através da expressão

de AQP3 na epiderme, o ácido retinóico ou seu precursor metabólico, o retinol, regula, na derme, a proliferação dos fibroblastos, indução de angiogênese e possui um importante papel na síntese de colágeno e fibras elásticas (Jurzak e cols., 2008). Em peles envelhecidas, ocorre diminuição da síntese de colágeno, diminuição da quantidade de fibras elásticas e diminuição da quantidade de GAGs (Bernstein e Uitto, 1996, Baumann, 2007 e Kafi e cols., 2007). Os retinóides podem aumentar a produção de colágeno, elastina e proteínas associadas a formação da fibra elástica, como a fibrilina-1, e diminuir a produção de MMP-12, proteína responsável pela fragmentação das fibras elásticas, além de aumentar a produção de GAGs em modelos animais (Baumann, 2007, Lee e cols., 2008).

2. Objetivo

Este trabalho tem por objetivo o estudo do efeito dose e tempo-dependente do extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* (EHBP) na expressão de genes (aquaporina-3, aquaporina-9, aquaporina-10, filagrina, involucrina, fibronectina) e proteínas (colágeno, elastina e glicosaminoglicanas) relacionados à integridade da pele.

3. Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas e Análises Genéticas (PANGENE), do Departamento de Parasitologia, na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, SP, em parceria com a empresa Chemyunion Química Ltda, Sorocaba, SP.

3.1. Isolamento de ativos

O método de extração utilizado para a obtenção do extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* (EHBP) foi a percolação. Para isso, as raízes, caules e folhas de picão-preto foram triturados e mantidos em um sistema solvente extrator, contendo água e butilenoglicol (1:1) a uma temperatura entre 40° a 45° C por 4 horas. Essa parte do projeto foi realizada em parceria com a empresa Chemyunion Química Ltda.

O extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* (EHBP) foi padronizado em poliacetilenos (poliacetilenos totais) e está depositado no Brasil com a patente INPI 018100022739.

3.2. Cultura de células e tratamento com os extratos

Queratinócitos e fibroblastos humanos foram obtidos comercialmente (Cell Applications, Inc., San Diego-CA e Cambrex, Lonza Bioscience, Lonza Group Ltd) e mantidos em garrafas de cultura (3500 céls/cm²) com meio de cultura apropriado devidamente suplementado, em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ até atingirem 70% de confluência. Após confluência, as células foram tripsinizadas, semeadas em placas de 6 ou 24 well para posterior tratamento com os extratos.

O meio de cultura para queratinócitos consistiu de meio de cultura pronto para o uso (Keratinocyte Growth Medium, 131-500, Cell Applications). O meio para fibroblastos foi constituído por RPMI (Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – Fetal Bovine Serum, CC-4101J), 5 µg/mL de insulina bovina (Insulin Bovine, CC-4021J), 10 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos humanos (rhFGF-

B – r-Human Fibroblast Growth Factor-B, CC 4065-J) e uma associação de antibióticos contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (Penicillin-Streptomycin, 15070063, Invitrogen).

As células foram incubadas com os extratos vegetais nas concentrações de 2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml por períodos de tempo específico para cada parâmetro. Estas concentrações foram determinadas através de ensaio de citotoxicidade (XTT).

3.3. Determinação da viabilidade/citotoxicidade celular

O EHBP foi dissolvido no meio de cultura e adicionado à placa em uma diluição seriada na faixa de 0,0002 a 50 % (v/v) e mantido em contato por um período de 48 horas. Após este período, o XTT (In Cytotox XTT KXT 96.300, Xenometrix AG) foi então adicionado à cultura, a qual foi incubada por mais 4 horas. A absorbância de cada poço foi determinada a 450 nm em um leitor de microplacas. A morte celular foi expressa em porcentagem, conforme fórmula: % células mortas = $100 - ((\text{Abs amostra poço tratado} / \text{Abs controle}) \times 100)$.

3.4. Extração de RNA total

A cultura de queratinócitos tratados com EHBP foi ressuspensa em 1ml de TRIzol® (Invitrogen®). Após a homogeneização, os queratinócitos foram incubados por 5 minutos a temperatura ambiente (TA) para permitir a completa dissociação do complexo núcleo-proteína. Foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio para 1,0 ml de TRIzol®. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados a TA por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12,000 ×g por 15 minutos a 5°C. Após a centrifugação, a mistura ficou separada em uma camada inferior vermelha, fase fenol-clorofórmio, uma interfase, e uma fase incolor superior, fase aquosa (que contém o RNA). A fase aquosa foi transferida para um tubo novo. O RNA foi precipitado pela mistura de 0,5 ml de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas novamente a TA por 10 minutos e centrifugadas a 12,000 × g por 10 minutos a 5°C.

O sobrenadante foi removido e o RNA foi lavado uma vez com etanol 75%. A amostra foi misturada pelo vórtex e centrifugada a $7500 \times g$ por 5 minutos a 5°C . O RNA foi então dissolvido em água livre de RNase e incubado por 10 minutos a 55°C .

O RNA total foi quantificado e, para os passos seguintes, foram utilizados 1000 ng deste RNA.

3.5. Tratamento com DNase

O RNA total foi tratado com DNase para a completa remoção de qualquer DNA genômico que possa ter permanecido durante a preparação. Foi utilizado 1U de DNase I, tampão 1x e 0,2 ng/ μl de RNA. Essa mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos. Foi adicionado 25 mM de EDTA e a solução foi incubada a 65°C por 10 minutos.

3.6. Síntese de cDNA

Após o tratamento do RNA com DNase, uma solução de oligo dT (T_{18}) inicialmente a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; oligos aleatórios (N_8) 0,15 mM; dNTP 0,75 mM e 11 μl RNA tratado com DNase na etapa anterior, foi preparada e incubada a 65°C por 5 minutos e depois colocada no gelo por 1 minuto. A esta preparação, adicionou-se tampão 1x; DTT 0,005 M; RNase *out* 40 U e 100 U da enzima super script III. Essa preparação foi incubada a 50°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos para inativar a enzima.

3.7. Análise da Expressão Gênica por PCR em tempo real

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho ABI 7300 (Applied Biosystems) utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições: um ciclo a 50°C por 2 minutos; um ciclo a 94°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1

minuto. A curva de dissociação foi obtida da seguinte maneira: 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos.

Os primers utilizados para a análise da expressão dos genes AQP3, AQP9, AQP10, Fibronectina, Involucrina, Filagrina, Loricrina, p53, GADPH, HPRT estão expostos no anexo 1.

A seguir, as curvas de eficiência foram delineadas para cada par de oligonucleotídeos através de 7 diluições do cDNA (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320) e a eficiência (E) foi calculada através da seguinte fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{inclinação})}$$

A quantificação relativa (R) dos genes foi determinada de acordo com Pfaffl (2001), onde o CP (*crossing point*) é definido como o ponto em que a fluorescência detectada está acima da fluorescência de fundo.

$$R = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta\text{CPalvo (controle - amostra)}}}{E_{\text{endógeno}}^{\Delta\text{CP endógeno (controle - amostra)}}$$

3.8. Quantificação dos componentes da matriz extracelular (MEC) (colágeno, elastina e glicosaminoglicanas)

A determinação dos componentes da MEC foi realizada no sobrenadante de cultura de fibroblastos após 48 horas de incubação com o EHBP. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração de colágeno, elastina e glicosaminoglicanas foram determinadas seguindo os protocolos a seguir:

3.8.1. Colágeno

O colágeno total solúvel (tipo I e IV) foi mensurado utilizando o kit Sircol (Biocolor, Belfast, N. Ireland). Em tubos plásticos próprios para microcentrifuga, 1 mL do corante Sircol (Vermelho Sirius em ácido pícrico) foi adicionado em 100 µl da amostra teste e agitado durante 30 minutos (TA). O complexo colágeno-corante formado foi precipitado por centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos, o

sobrenadante foi descartado e o botão re-suspendido em 1 mL de reagente alcali (NaOH 0.5 M) . Alíquotas de 200 µL foram transferidas para uma placa de 96 poços e a absorbância foi mensurada a 540 nm. A curva de calibração foi realizada com base na curva padrão feita com padrão de colágeno fornecido pelo fabricante do kit.

3.8.2. Elastina

Os níveis de elastina foram determinados segundo o protocolo descrito no kit de detecção Fastin (Biocolor, Belfast, N. Ireland). O conteúdo de elastina das amostras foi precipitado em tubos de microcentrifuga após a adição de 1 mL de reagente de precipitação (ácido tricloroacético e arginina) e incubação a 0°C por 24 horas. Após a centrifugação destes tubos a 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o botão de elastina re-suspendido em 1 mL de TPPS (5,10,15,20-tetrafenil-21,23-porfina sulfonato) e 200 µL de sulfato de amônio saturado 90% para a formação do complexo elastina-corante. Após 60 minutos de agitação, os frascos foram centrifugados novamente a 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o complexo re-suspendido em 1 mL do reagente de dissociação (HCl guanidina e 1-propanol) que permitiu a formação da coloração, lida a 513nm. A quantidade de elastina das amostras foi calculada com base na curva padrão com concentração conhecida de elastina.

3.8.3. Glicosaminoglicanas (GAGs)

A glicosaminoglicana sulfatada foi mensurada pela reação de coloração Blyscan (Biocolor, Belfast, N. Ireland). 1 mL do corante azul 1,9-dimetilmetileno foi adicionado às amostras e homogeneizados por 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos, formando um complexo insolúvel com a GAG sulfatada. O sobrenadante foi removido e o complexo GAG-corante foi recuperado com o reagente de dissociação (sal caotrópico em 1-propanol) e a absorbância foi mensurada a 656nm. Os níveis de GAG foram calculados a partir da curva padrão.

4. Resultados

4.1. Estudo da Citotoxicidade do EHBP

Para a determinação das concentrações de EHBP a serem utilizadas no tratamento das culturas foi realizado o método de XTT. As culturas de queratinócitos e fibroblastos foram tratadas por 48 horas com diluições seriadas do EHBP (concentração inicial 32% (v/v) e fator de diluição de $\frac{1}{2}$ e, os resultados correspondentes a porcentagem de células mortas, em contato com as diferentes concentrações de EHBP testadas, estão expostos na Figura 12. As concentrações de EHBP acima de 1%, ou 10,00 mg/ml, apresentam toxicidade considerável nas culturas. Por isso, as concentrações de extrato escolhidas para o tratamento das culturas e análise de expressão gênica por tempo real foram 0,25%; 0,50% e 1,00%, ou seja, 2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml, respectivamente.

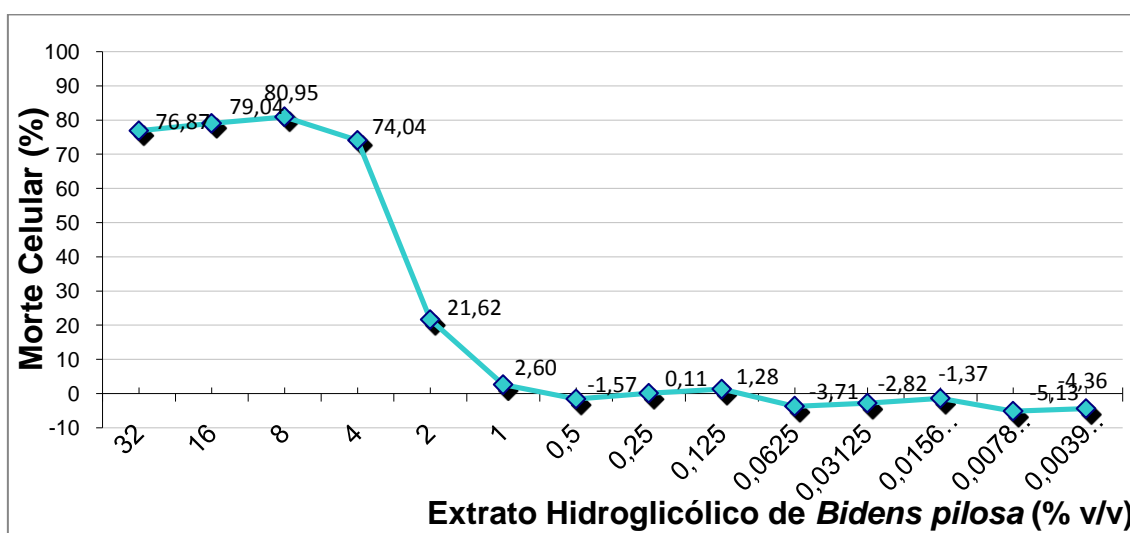


Figura 12 - **Análise da Citotoxicidade do EHBP em cultura mista de queratinócitos e fibroblastos.** A análise de citotoxicidade foi realizada pela incubação dos queratinócitos e fibroblastos por um período de 48 horas com diferentes concentrações de EHBP. Os resultados são expressos em quantidade de células mortas e, as maiores concentrações não citotóxicas foram utilizadas para as análises de PCR em Tempo Real (1,0; 0,5 e 0,25%). Os dados representam os valores obtidos de 2 experimentos biológicos.

4.2. Expressão de Aquaporina-3

As culturas de queratinócitos humanos foram semeadas até atingirem a densidade de 3500 células/cm². Neste momento, foram incubadas com extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* 5,00 mg/ml nos tempos de 0, 3, 6 e 9 horas ou mantidas sem tratamento (controle). A seguir, as células foram tripsinizadas, lavadas e ressuspensas em TRIzol® (Invitrogen®) para a extração do RNA total das amostras. Após a extração do RNA total, este foi quantificado e analisado em gel de agarose 1% (resultado não mostrado) a fim de verificar a integridade do material através da visualização das bandas referentes aos RNAs ribossômicos. A seguir foi realizada a síntese do DNA complementar das amostras utilizando a enzima Superscript III (Invitrogen), e o cDNA submetido a PCR em Tempo Real. Para a quantificação da expressão da aquaporina-3 foram utilizados os pares de primers AQP3A e do gene endógeno *HPRT*.

O aumento mais significativo de transcritos de AQP3 aparece com 6 horas após tratamento das culturas de queratinócitos, com expressão de 4,01 vezes maior em relação às culturas não tratadas (desvio padrão = 0,30) (Figura 13). Quando o tempo de incubação com o extrato é de 3 e 9 horas, o aumento da expressão de AQP3 foi de 2,7 (desvio padrão = 0,6) e de 1,2 (desvio padrão = 0,23)

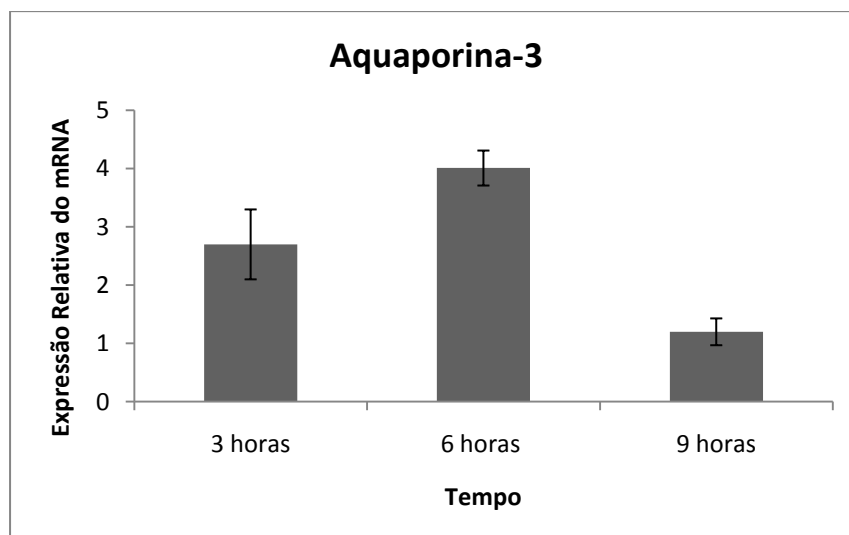


Figura 13 - **Expressão relativa de aquaporina-3 quando as culturas de queratinócitos foram incubadas por diferentes períodos na concentração de 5,00 mg/ml de EHBP.** Para que o tempo de incubação das culturas com EHBP fosse estabelecido, foi

realizado um ensaio que mostrou que no tempo de 6 horas de incubação, ocorreu o maior acúmulo de transcritos de AQP3. Por esta razão para as demais análises, este tempo de incubação foi estabelecido. Os dados representam os valores obtidos de 3 experimentos biológicos realizados em triplicata. As barras indicam o desvio padrão.

A seguir, diferentes concentrações do extrato foram testadas no tempo de 6 horas (2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml) e a Figura 14 mostra a expressão gênica relativa de AQP3 nas amostras tratadas com o EHBP por 6 horas nas diferentes concentrações quando comparada à expressão da amostra não tratada (NT). Através do gráfico podemos observar que o pico da expressão se deu quando a cultura mista foi tratada com EHBP na concentração de 5,00 mg/ml, aumentando 4,36 vezes (desvio padrão = 0,25). O aumento da expressão nas concentrações de 2,50 mg/ml e de 10,00 mg/ml foi de 1,68 vezes (desvio padrão = 0,20) e de 1,92 (desvio padrão = 0,50) vezes respectivamente.

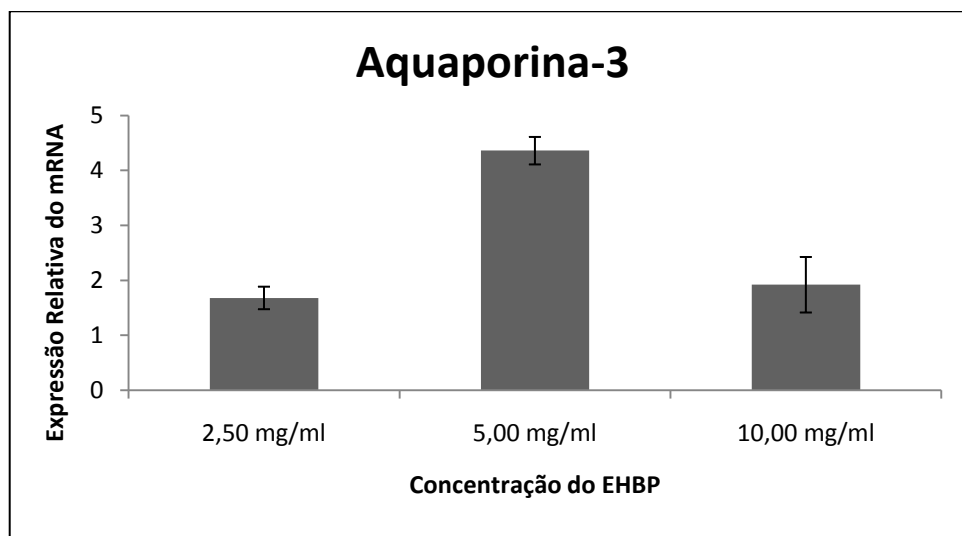


Figura 14 - **Análise da expressão do gene que codifica a proteína aquaporina-3** – Análise da expressão foi realizada por PCR em tempo real através da utilização de cDNA obtido de culturas de queratinócitos tratados com extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* em diferentes concentrações (2,50 mg/ml; 5,00 mg/ml e 10,00 mg/ml) no tempo de 6 horas. Os dados representam os valores obtidos de 3 experimentos biológicos realizados em triplicata. As barras indicam o desvio padrão.

Além dos resultados em relação a AQP3, outros genes relacionados à hidratação da pele foram testados. O tempo do tratamento testado nas diferentes concentrações de EHBP para os demais genes foi de 6 horas, que corresponde ao pico de expressão da AQP3, foco principal do presente trabalho.

4.3. Expressão de Aquaporina-9

A expressão gênica da AQP9 em culturas de queratinócitos tratadas com EHBP em diferentes concentrações (2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml) com 6 horas de incubação é ilustrada na Figura 15. O pico de expressão para esta aquagliceroporina se deu no tratamento da cultura com 10,00 mg/ml de EHBP, aumentando a expressão em 4,95 vezes (desvio padrão = 0,76) em relação à cultura não tratada. Quando a cultura foi tratada com o extrato na concentração de 2,50 mg/ml, a expressão de AQP9 aumentou 1,53 vezes (desvio padrão = 0,42) e, um aumento 1,82 vezes (desvio padrão = 0,40) foi observado quando o tratamento se deu na concentração de 5,00 mg/ml do extrato.

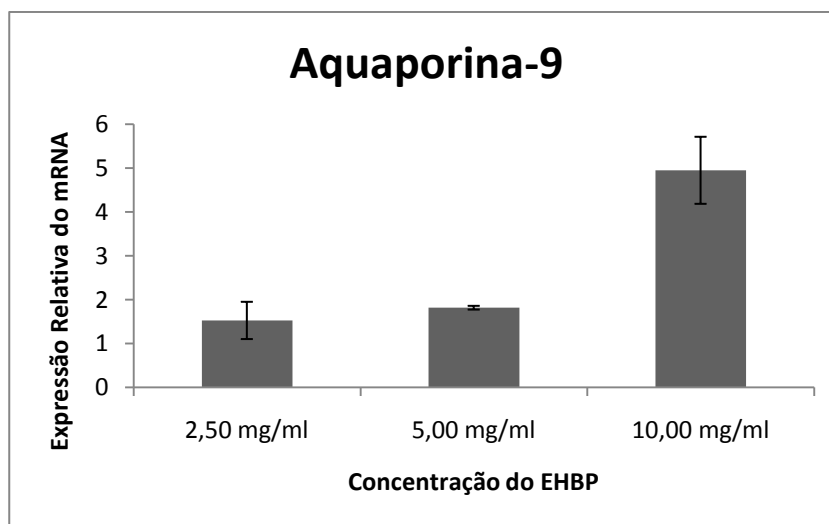


Figura 15 – **Análise da expressão do gene que codifica a proteína aquaporina-9** – A análise foi realizada por PCR em tempo real através da utilização de cDNA obtidos de culturas de queratinócitos tratados com extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* em diferentes concentrações (2,50 mg/ml; 5,00 mg/ml e 10,00 mg/ml) no tempo de 6 horas. Dados referentes a 3 experimentos biológicos. As barras indicam o desvio padrão.

4.4. Expressão de Fibronectina

O pico de expressão do gene fibronectina em culturas de queratinócitos humanos tratados com EHBP ocorreu na dose de 5,00mg/ml, onde a expressão é 7,20 vezes maior (desvio padrão = 0,37) do que em culturas não tratadas. A aumento da expressão nas concentrações de 2,50 mg/ml e de 10,00 mg/ml é de 3,27 (desvio padrão = 1,14) e 0,72 vezes (desvio padrão = 0,25), respectivamente. Os resultados referentes à expressão da fibronectina estão representados na Figura 16.

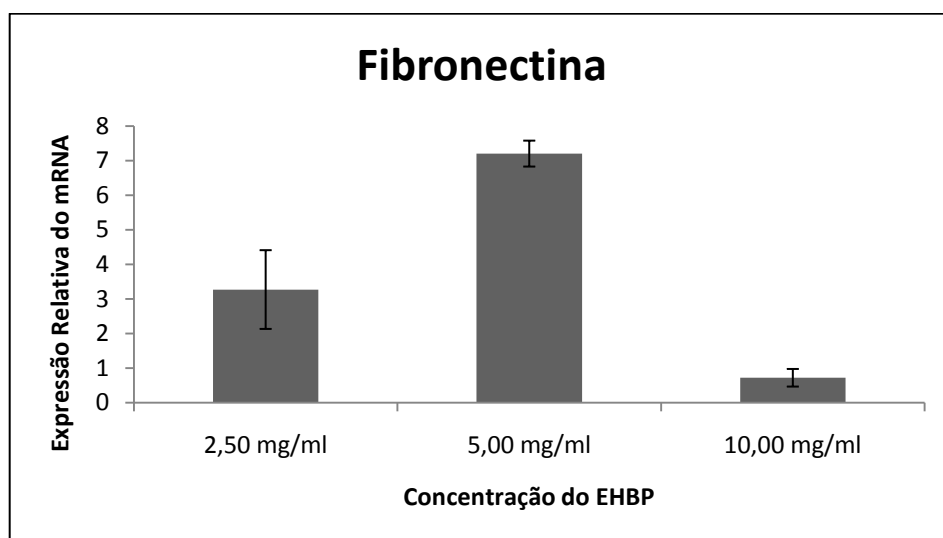


Figura 16 – **Análise da expressão do gene que codifica a proteína fibronectina** – Análise foi realizada por PCR em tempo real através da utilização de cDNA obtidos de culturas de queratinócitos tratados com extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* em diferentes concentrações (2,50 mg/ml; 5,00 mg/ml e 10,00 mg/ml) no tempo de 6 horas. Dados referentes a 2 experimentos biológicos, as barras indicam o desvio padrão.

4.5. Expressão de Involucrina

O estudo da expressão da involucrina nos diferentes tratamentos com EHBP (2,50; 5,00 e 10,00 mg/m) mostrou que este gene possui um pico de expressão com 6 horas de tratamento na concentração de 10,00 mg/ml de EHBP, aumentando a expressão em 6,75 vezes (desvio padrão = 2,90) em relação a culturas não tratadas. O aumento das expressões gênicas referentes ao tratamento de 2,50 e 5,00 mg/ml é muito próximo – respectivamente 2,48 (desvio padrão = 0,06) e 2,16 vezes (desvio padrão = 0,96), respectivamente, e são mostradas na Figura 17.

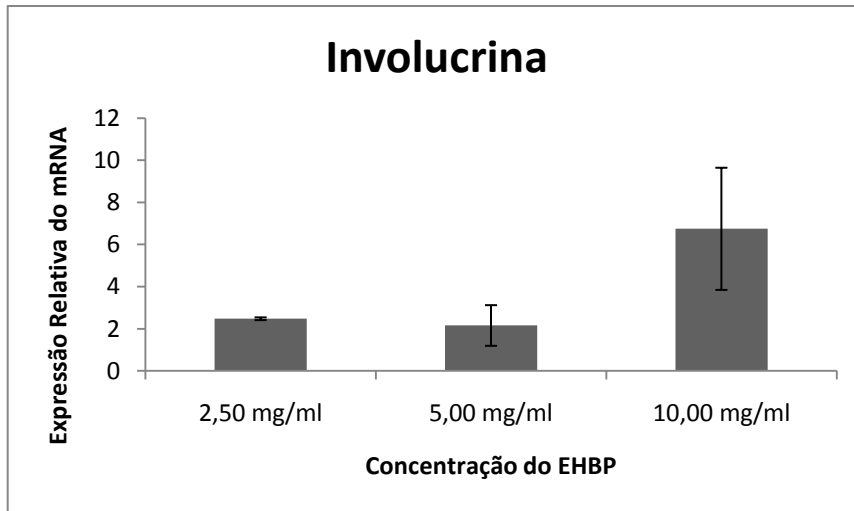


Figura 17 – **Análise da expressão do gene que codifica a proteína involucrina** – Análise foi realizada por PCR em tempo real através da utilização de cDNA obtido de culturas de queratinócitos tratados com extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* em diferentes concentrações (2,50 mg/ml; 5,00 mg/ml e 10,00 mg/ml) no tempo de 6 horas. As barras indicam os desvios padrão obtidos de 2 experimentos biológicos realizados em triplicata.

4.6. Expressão de Filagrina

O experimento de PCR em tempo real realizado para o estudo da expressão do gene da filagrina demonstrou a amplificação deste gene em ciclos tardios, como mostra a Figura 18, não sendo possível o cálculo da expressão gênica.

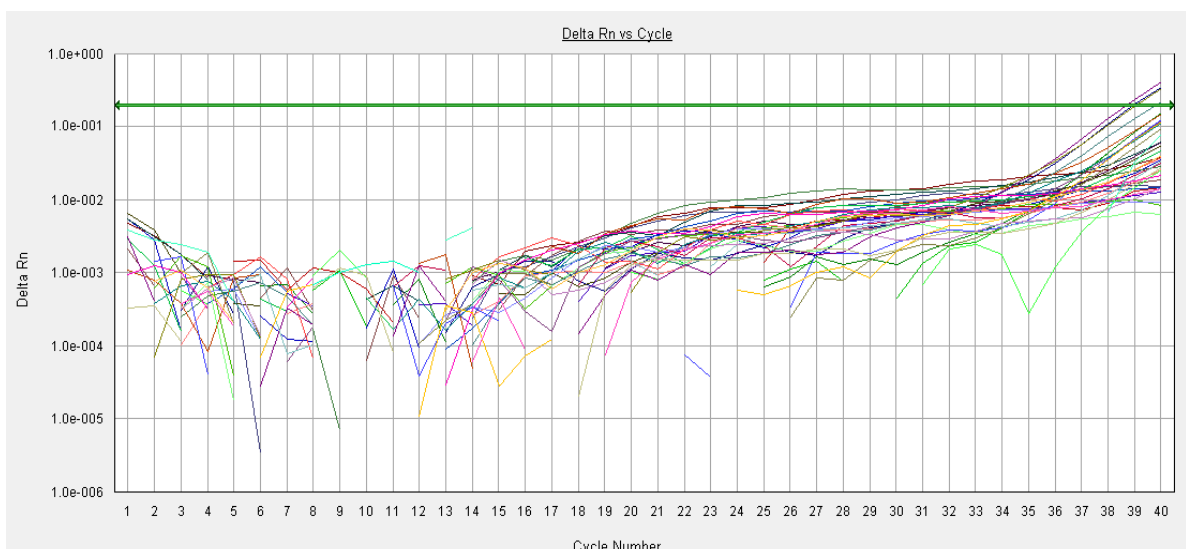


Figura 18 - **Curva de Amplificação da Filagrina**. Imagem gerada pelo software ABI 7300 da Applied Biosystems que mostra a amplificação do gene da filagrina em ciclos tardios.

4.7. Expressão do p53

Como Hara-Chikuma e Verkman (2008) publicaram um artigo sugerindo a relação entre a expressão de AQP3 e o surgimento de tumor, analisamos também a expressão do gene p53 e através dos nossos experimentos, pudemos observar que a p53 não tem sua expressão alterada com o tratamento das culturas de queratinócitos com EHBP. A expressão de p53 com o tratamento das culturas no tempo de 6 horas nas concentrações de 2,50 e 5,00 mg/ml foi de 1,37 (desvio padrão = 0,33) e de 1,57 (desvio padrão = 0,18), respectivamente, como ilustra a Figura 19.

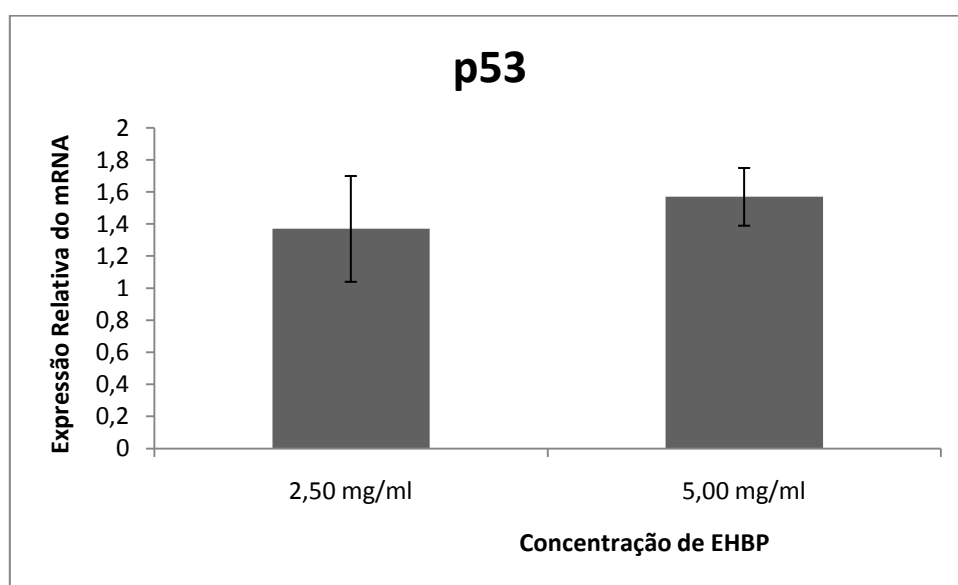


Figura 19 - **Análise da expressão do gene que codifica a proteína p53** - Análise foi realizada por PCR em tempo real através da utilização de cDNA obtido de culturas de queratinócitos tratados com extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* em diferentes concentrações (2,50 mg/ml; 5,00 mg/ml e 10,00 mg/ml) no tempo de 6 horas. As barras indicam os desvios padrão obtidos de 2 experimentos biológicos realizados em triplicata.

4.8. Colágeno

A mensuração de colágeno foi feita com o kit Sircol (Biocolor, Belfast, N. Ireland) em sobrenadante de cultura de fibroblastos que foram incubados com EHBP durante um período de 48 horas. De acordo com os resultados mostrados na Figura 20, o tratamento com EHBP apresentou efeitos expressivos sobre a estimulação da síntese de colágeno em cultura de fibroblastos humanos. O tratamento da cultura de fibroblastos com EHBP nas concentrações de 2,50 e 5,00 mg/ml induziu uma síntese de

colágeno 3,68 vezes superior ao controle (desvio padrão = 0,42) e 5,34 vezes superior ao controle (desvio padrão = 0,64), respectivamente. O tratamento da cultura de fibroblastos com o EHBP na concentração de 10,00 mg/ml foi o que mais induziu a síntese de colágeno, onde esta foi 6,78 vezes superior ao controle (desvio padrão = 0,43).

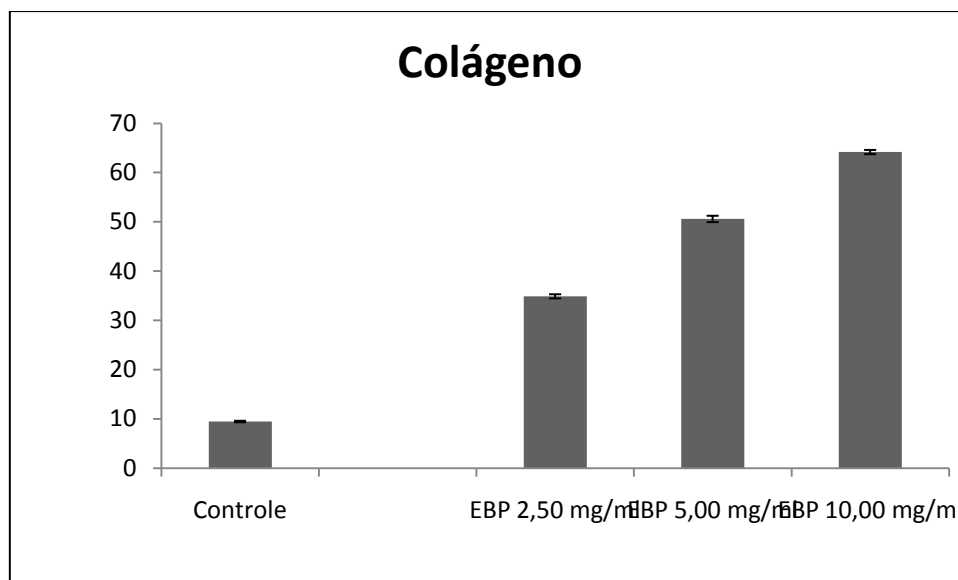


Figura 20 - **Efeito do tratamento com EHBP sobre a produção de colágeno em culturas de fibroblastos humanos** - Fibroblastos humanos foram incubados com EHBP em diferentes concentrações (2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml) e a produção de colágeno foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 48 horas de incubação. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes.

4.9. Elastina

A medida da quantidade de elastina foi feita através da utilização do kit de detecção Fastin (Biocolor, Belfast, N. Ireland) em culturas de fibroblastos incubados por um período de 48 horas em diferentes concentrações de EHBP (2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml). As culturas de fibroblastos apresentaram um aumento de 1,28 vezes (desvio padrão = 0,42) na síntese de elastina em relação ao controle quando tratadas com EHBP a 2,50 mg/ml, um aumento de elastina de 1,46 (desvio padrão = 0,64) quando tratadas com EHBP a 5,00 mg/ml e um aumento de 1,75 (desvio padrão = 0,43) quando tratadas com EHBP a 10,00 mg/ml. A Figura 21 ilustra o gráfico com os resultados do tratamento das culturas de fibroblastos com EHBP nas diferentes concentrações.

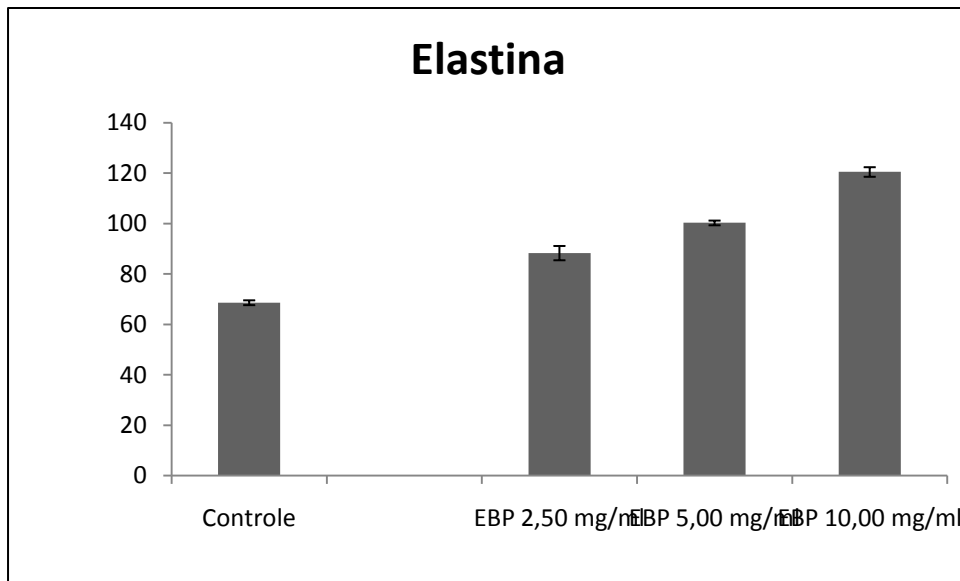


Figura 21 - **Efeito do tratamento com EHBP sobre a produção de elastina em cultura de fibroblastos humanos** - Fibroblastos humanos foram incubados com EHBP em diferentes concentrações (2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml) e a produção de elastina foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 48 horas de incubação. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes.

4.10. Glicosaminoglicanas

Para a quantificação de GAGs, foi utilizado o kit Blyscan (Biocolor, Belfast, N. Ireland) em culturas de fibroblastos incubados por um período de 48 horas em diferentes concentrações de EHBP. De acordo com os resultados apresentados na Figura 22, o EHBP não estimulou a produção de GAGs tanto quanto estimulou a produção de colágeno. O aumento da expressão em foi de 1,43 vezes (desvio padrão = 0,02) com o tratamento 2,50 mg/ml de EHBP em culturas de fibroblastos, 2,36 vezes (desvio padrão = 0,34) para o tratamento com EHBP a 5,00 mg/ml e, o aumento mais expressivo foi quando a cultura de queratinócitos foi tratada com EHBP a 10,00 mg/ml, com um aumento de 3,07 vezes (desvio padrão = 0,16) em relação ao controle.

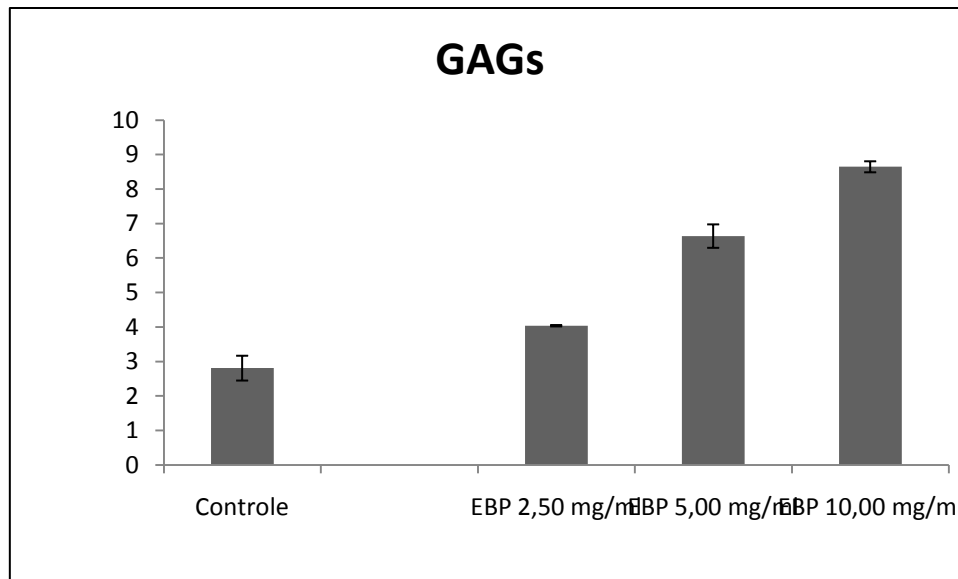


Figura 22 - **Efeito do tratamento de EHP sobre a produção de glicosaminoglicanas em cultura de fibroblastos humanos** - Fibroblastos humanos foram incubados com EHP em diferentes concentrações (2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml) e a produção de GAGs foi mensurada no sobrenadante da cultura celular após 48 horas de incubação. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes.

5. Discussão

A hidratação do estrato córneo é importante para a aparência da pele e para que este estrato possa exercer a função de barreira. Fatores como a umidade externa, a capacidade do tecido de recuperar a água perdida durante a evaporação e a capacidade de retenção de água do tecido, são fundamentais para que a hidratação do tecido se mantenha adequada (Hara e cols., 2002). Pela característica de transporte de água e glicerol (substância umectante), a AQP3 é uma importante proteína dos queratinócitos epidermais, no transporte de água através das camadas da epiderme e conseqüentemente, na manutenção da hidratação do estrato córneo (Hara-Chikuma e Verkman, 2006). O EHBP como já foi dito, é capaz de estimular a expressão de AQP3 via receptores de ácido retinóico (Mukherjee e cols., 2006 e Bellemère e cols., 2008). Em nosso trabalho, as concentrações utilizadas de EHBP não se mostraram citotóxicas às culturas celulares conforme mostra o teste de XTT.

Li e colaboradores (2010) mostram em seu trabalho, através de PCR em tempo real, western-blot e imunohistoquímica, que a expressão e a quantidade de AQP3 diminuem de acordo com a idade, independentemente do sexo, diminuindo assim a hidratação da pele, fazendo com que ocorra xerose, rugas e diminuição da atividade enzimática em peles envelhecidas, mostrando um importante papel da AQP3 no envelhecimento da pele humana. Em nosso estudo, testamos a eficiência da espécie *Bidens pilosa*, que possui o ácido fitânico, de estrutura química semelhante ao ácido retinóico, substância capaz de controlar a proliferação e diferenciação dos queratinócitos (Bellemère e cols., 2008), na expressão de AQP3 e outros genes relacionados na hidratação da pele: aquaporina-9, aquaporina-10, fibronectina, involucrina e filagrina. Nossos resultados, em relação a AQP3, mostram que esta aquaporina tem uma expressão mais significativa com 6 horas de tratamento com o extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa*, e após 9 horas de tratamento, a expressão diminui significativamente (aproximadamente 3,34 vezes), semelhantemente ao que ocorre no trabalho de Bellemère e colaboradores (2008). Neste trabalho, os autores também se utilizaram da técnica de PCR em tempo real para mostrar que o pico de AQP3 através do tratamento de NHEK (*normal human epidermal keratinocyte*) com ácido retinóico é tempo dependente e que a expressão não aumenta indefinidamente. No trabalho deste autor, o nível de expressão de aquaporina-3 volta aos níveis basais

após 48 horas de tratamento. Além disso, o pico de expressão do gene da aquaporina-3 se dá, em nosso trabalho, quando a cultura de queratinócitos é tratada a uma concentração de extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* de 5,00 mg/ml, que é a concentração intermediária padronizada neste estudo, através do teste de XTT. Quando a cultura celular é tratada com EHBP em concentração de 10mg/ml, a expressão diminui drasticamente. Cao e colaboradores (2008) analisaram a indução de AQP3 através de análises de western-blot e mostrou que a expressão da aquaporina 3 é aumentada até certo ponto e, a partir daí decresce, quando submetidas ao tratamento com atRA, semelhantemente ao que ocorre com o tratamento com *Bidens pilosa*. No entanto, Bellemère e colaboradores (2008) não observaram a diminuição da expressão do gene em questão após o tratamento das culturas celulares em concentrações mais elevadas de atRA e, Cao e colaboradores (2008), não observaram decréscimo de expressão da AQP3 nos tempos por eles estabelecido.

Velazquez Pereda e colaboradores (2009) também analisaram a expressão de AQP3 através de PCR em tempo real através do tratamento de culturas celulares de queratinócitos com óleo de café e observaram um aumento significativo da expressão gênica desta aquaporina após o tratamento (sete vezes maior que o controle). No trabalho em questão também foi verificado o aumento de AQP3 em ensaio de imunohistoquímica em pele humana. Em outro trabalho, Velazquez Pereda e colaboradores (2010) analisaram a expressão da AQP3 através do tratamento das culturas de queratinócitos humanos com extrato hidroglicólico de *Piptadenia colubrina* (EHPC) (angico branco) e, assim como em nosso trabalho, observaram um pico de expressão do gene da AQP3 após 6 horas de tratamento com o extrato e, após 48 horas, a expressão volta aos níveis basais. Ainda verificaram que a expressão de AQP3 aumenta até certo ponto em relação à concentração do extrato usado no tratamento (10mg/ml) e a partir daí decresce.

A AQP3 é importante na regulação dos processos de proliferação e diferenciação dos queratinócitos epidermais. Este canal transporta o glicerol e, na presença deste glicerol, a fosfolipase D metaboliza a fosfatidilcolina em fosfatidilglicerol. A síntese de fosfatidilglicerol é facilitada em queratinócitos pelo fato de a AQP3 ser co-localizada com a fosfolipase D2. Este fosfatidilglicerol ativa a proteína quinase C (PKC) que modula a função dos queratinócitos, estimulando sua

diferenciação, enquanto inibe sua proliferação. A diferenciação é estimulada pelo aumento da síntese de DNA e síntese de marcadores de diferenciação, como aumento da expressão de involucrina e loricrina. Este ciclo modulador dos queratinócitos coincide com o ciclo de aumento de expressão da involucrina na ativação da proteína quinase C (PKC) (Figura 23). Portanto, a modulação da expressão da AQP3 é um processo complexo e de grande importância na regulação da proliferação e diferenciação dos queratinócitos (Boury-Jamot e cols. 2009).

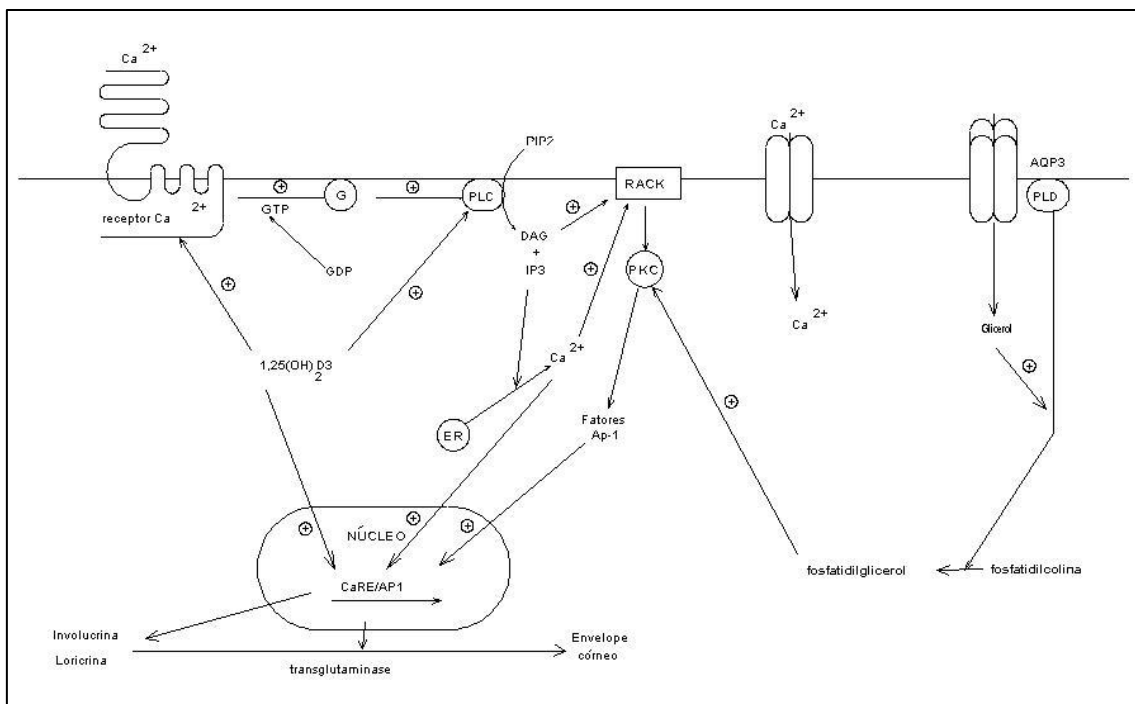


Figura 23 - **Esquema relacionado à diferenciação dos queratinócitos.** A facilitação do influxo de glicerol nos queratinócitos via AQP3 ativa a PKC, estimulando a diferenciação destas células. Por outro lado, o influxo de cálcio ativa a PLC e há formação de DAG e IP₃. Este último aumenta a concentração de cálcio intracelular ativando a PKC, onde há coincidência com o ciclo da AQP3, ocorrendo estimulação da região promotora (AP1) dos genes involucrina, loricrina, transglutaminases, pro-filagrina e queratina 1, responsáveis pela diferenciação dos queratinócitos.

Como citado anteriormente, o ácido retinóico se liga a receptores nucleares RAR γ aumentando a expressão de AQP3 (Mukherjee e cols., 2006 e Bellemère e cols. 2008). Semelhantemente, o ácido fitânico, composto presente na espécie *Bidens pilosa*, deve se ligar aos receptores RAR γ nucleares, da mesma forma que o CD437, um agonista do receptor de retinóides em conformação γ , descrito por Bellemère e colaboradores (2008) estimulando a expressão da aquaporina-3 de maneira dose e tempo-dependente.

O p53 é um gene supressor de tumor, considerado o “guardião do genoma” por estar envolvido na regulação da transcrição de genes relacionados à suspensão de ciclo celular (em G1 ou G2/M), quiescência, senescência (processo pelo qual a p53 freia o processo neoplásico), diferenciação e apoptose (mecanismo de supressão tumoral) (Lozano, 2009 e Levine e Oren, 2009), prevenindo o crescimento de uma progênie de células que possam desencadear o processo carcinogênico (Levine e Oren, 2009). É normalmente mantida em baixos níveis nas células, através de sua interação com a proteína MDM2, principal interação proteína-proteína da p53. Juntas, p53 e MDM2 formam uma alça de *feedback* negativo, onde a p53 induz a expressão de MDM2 e esta, promove a degradação de p53. Os níveis e a atividade da p53 aumentam rapidamente em resposta a um estímulo que é visto como incomum pela célula, como por exemplo, dano no DNA (estresse genotóxico) e ativação da cascata de sinais de crescimento (estresse oncogênico). A proteína p53 aparece mutada em aproximadamente 50% dos casos de câncer humanos (Levine e Oren, 2009).

Os mecanismos moleculares do funcionamento da proteína p53 mostram três formas pelas quais a p53 pode agir. Primeiramente, pode agir como fator de transcrição ao se ligar a uma região específica do DNA, controlando a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas a apoptose e ao controle da progressão do ciclo celular. Pode também agir também como repressor transcricional, através de mecanismos que podem não estar diretamente envolvidos com a ligação do p53 a uma sequência dentro do gene, onde a expressão de p53 pode alterar simultaneamente centenas de genes, exercendo mudanças no destino das células. Por fim, pode agir no núcleo ou no citoplasma das células de forma não bioquímica, interagindo, por exemplo, com membros da família Bcl2 no citoplasma (proteínas reguladoras de apoptose), contribuindo para que a membrana mitocondrial libere o citocromo C, pela alteração da permeabilidade da membrana (Levine e Oren, 2009).

A expressão anormal de p53 pode estar relacionada a vários tipos de câncer. Esta expressão é aumentada em *squamous cell* carcinoma, queratose actínica e carcinoma de células basais (Velazquez Pereda e cols. 2010 e Kanellou e cols. 2009). Hara-Chikuma e Verkman (2008b) alertaram quanto ao risco de desenvolvimento de tumores associado à expressão de AQP3. Enquanto camundongos selvagens para AQP3 foram expostos a substâncias capazes de sensibilização das células e promover a

formação de tumores apresentaram papilomas na pele, camundongos nulos para esta aquaporina se mostraram resistentes. Embora as vias metabólicas para a produção de ATP na pele ainda não estejam estabelecidas, foi proposto que a facilitação da entrada de glicerol nos queratinócitos faz com que a enzima glicerol quinase catalise a fosforilação do glicerol para a produção de glicerol-3-fosfato (G3P), intermediário metabólico de ATP. O alto nível de ATP intracelular pode ser importante quando ocorre hiperproliferação celular como em casos de psoríase, dermatite atópica, cicatrização de feridas e tumorigênese (Hara-Chikuma e Verkman, 2008b).

Apesar da precaução sugerida por Verkman (2008) na utilização de substâncias capazes de aumentar a expressão de AQP3 em cosméticos, a expressão de AQP3 tem sido aumentada por décadas por hidratantes que contêm sorbitol e manitol em sua fórmula, sem relação com o desenvolvimento de câncer. O tratamento com EHBP na concentração de 5,0 mg/ml das culturas de queratinócitos humanos, como dito anteriormente, promove um pico de expressão do gene que codifica a proteína AQP3 com 6 horas de tratamento voltando aos níveis basais após 12 horas. Porém nossos resultados mostram que não há alteração da expressão de p53 pela utilização do EHBP, quando queratinócitos humanos são expostos ao tratamento com o extrato em questão por 6 horas. Como formulações cosméticas expõem a pele continuamente a um determinado ativo, se o extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* for utilizado nestas formulações, mais estudos devem ser dirigidos em relação à exposição a longo prazo da pele ao extrato, para que haja segurança em relação a sua utilização.

Não há na literatura trabalhos que explorem a aquaporina-9 e seu provável efeito em minimizar sinais de desidratação da pele. Nossos resultados mostram um aumento da expressão em 4,95 vezes da aquaporina-9 quando as culturas de queratinócitos humanos foram tratadas por 6 horas na concentração de 10,0mg/ml de EHBP. Acreditamos que a aquaporina em questão pode auxiliar a hidratação das camadas epidérmicas, e pode ter um papel importante principalmente no estrato granuloso, que fornece água ao estrato córneo, onde alguns autores acreditam que a aquaporina-3 esteja ausente (Boury-Jamot e cols., 2009).

A aquaporina 10 (AQP10) é uma aquaporina que foi descoberta em 2001 por Hatakeyama e colaboradores, e até então era descrita como característica do duodeno

e jejuno, no intestino delgado, sendo expressa na membrana apical do epitélio absorptivo. Em 2002, Ishibashi e colaboradores descreveram a AQP10 como uma aquagliceroporina e esta foi descrita como expressa na membrana dos queratinócitos em 2006 por Boury-Jamot e colaboradores, mas tem distribuição incerta em relação às camadas da epiderme. Acredita-se que a AQP10, assim como a AQP3, transporte água e glicerol nas camadas da epiderme, podendo ser responsável também pela manutenção da hidratação da epiderme, porém em uma menor proporção que a AQP3, que é mais expressa nas membranas plasmáticas dos queratinócitos que a AQP10 (Boury-Jamot e cols., 2006). Como a análise da expressão gênica não foi possível com os dois pares de primers citados na metodologia do presente trabalho, acreditamos que isto possa ser um indício da ausência de AQP10 em queratinócitos, uma vez que Velazquez Pereda e colaboradores (2009 e 2010) também não conseguiram resultados de expressão para este gene em culturas de queratinócitos tratadas com extrato oleoso de *Coffea arabica* e extrato de *Piptadenia colubrina*, o que contradiz Boury-Jamot e colaboradores (2006).

Das proteínas do envelope, a filagrina, apresentou expressão tardia em relação ao tratamento das culturas nas diferentes concentrações de EHBP (2,50; 5,00 e 10,00 mg/ml). A degradação da filagrina se dá muito rapidamente (meia vida de 6 horas) e, nas células do estrato córneo, é degradada em aminoácidos livres hidrofílicos e higroscópicos que vão se acumulando, como PCA e ácido urocânico, que juntos formam 50% dos FNHs (Velazquez Pereda e cols., 2010). A alta concentração destes aminoácidos livres é essencial para a retenção de água, contribuindo para a osmolaridade e flexibilidade da camada córnea e prevenção de perda excessiva de água pela pele, melhorando a hidratação do tecido (Candi e cols., 2005, Denecker e cols., 2008 e Velazquez Pereda e cols., 2010).

Além disso, a filagrina é uma proteína responsável pelo alinhamento dos filamentos intermediários de queratina em feixes estreitos, o que faz com que as células se tornem achatadas (Figura 2) e pela manutenção da textura da epiderme (Candi e cols., 2005 e Hoffjan e Stemmler, 2007). Velazquez Pereda e colaboradores (2010) observaram um aumento de 8,3 vezes da expressão do gene da filagrina após o tratamento com EHPC a 10 mg/ml com 6 horas de tratamento. No presente estudo,

devido à amplificação tardia no experimento de PCR em Tempo Real não foi possível o estudo da expressão do gene.

Outra proteína do envelope, a involucrina (INV) teve um aumento bastante significativo nas culturas de queratinócitos tratados com EHBP na concentração de 10,00 mg/ml (6,75 vezes em relação a culturas não tratadas). A importância do aumento da expressão do gene da involucrina se dá por se tratar de uma proteína envolvida na diferenciação de queratinócitos humanos, por ser precursora do envelope córneo (CE), sendo por isso reconhecida como um marcador de diferenciação celular, assim como a loricrina, outra proteína precursora do envelope córneo e encontrada em grande quantidade nos grânulos de querato-hialina (Bikle e cols., 2003 e Li e cols., 2000).

A INV é substrato para as transglutaminases que ligam moléculas desta proteína entre elas e a outros componentes do envelope córneo (Li e cols., 2000). Sua expressão é estimulada da seguinte maneira: quando há influxo aumento de cálcio intracelular, ocorre ativação da fosfolipase C (PLC), que hidrolisa o fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) formando diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3), dois importantes mensageiros. O IP_3 estimula a liberação de cálcio de estoques intracelulares (aumento dos níveis de cálcio intracelular livre - Cai). Com este aumento e, somado ao aumento de DAG, ocorre à ativação da proteína quinase C (PKC), estimulando a região promotora (AP-1) de genes como involucrina, transglutaminases, loricrina, profilagrina e queratina-1, importantes no processo de diferenciação celular (Bikle, e cols., 2003).

O aumento de Cai ainda estimula o influxo de cálcio, prolongando o sinal de transcrição gênica descrita e, a vitamina D, produzida pelos queratinócitos, aumenta a expressão de receptores de cálcio e PLC, reforçando ainda mais a resposta ao cálcio (Bikle, e cols., 2003). A PKC que é aqui ativada pelo aumento de Cai e DAG é também ativada pelo fosfatidilglicerol descrito na resposta da AQP3 e conseqüente aumento de glicerol e transformação de fosfatidilcolina em fosfatidilglicerol na diferenciação dos queratinócitos. É, portanto, neste ponto em que a diferenciação dos queratinócitos coincide em relação à expressão de AQP3, da involucrina (Figura 23). A involucrina também foi uma proteína estudada por Velazquez Pereda e colaboradores (2010) e, a

semelhança do que ocorre em nosso trabalho, a maior expressão do gene da involucrina se deu com 6 horas de tratamento das culturas de queratinócitos humanos com EHPC a 10mg/ml, com um aumento de 8,3 vezes.

Apesar de coincidência em nas vias de expressão de AQP3 e INV, a primeira tem um ponto de saturação em relação a expressão e a concentração utilizada do extrato, enquanto a INV não tem. A expressão de AQP3 aumenta da concentração de 2,50 para 5,00 mg/ml, de 1,68 para 4,36, porém diminui novamente quando a concentração de EHBP aumenta para 10,0 mg/ml reduzindo para 1,68. Em relação a involucrina, sua expressão se mostra praticamente inalterada nas concentrações de 2,50 e 5,00 mg/ml e, na concentração de 10,00 mg/ml, triplica, chegando a 6,75. O influxo de glicerol nas células via AQP3, interfere na expressão de involucrina, uma vez que o glicerol é necessário para que a fosfolipase D metaboliza a fosfatidilcolina em fosfatidilglicerol, ativando a PKC, que vai estimular a expressão da INV via região promotora AP-1. Porém, a expressão de INV não segue o mesmo padrão da AQP3 porque, além do aumento de INV pela AQP3, a INV possui uma segunda forma de estimulação de expressão, que é através da ativação da proteína G, que faz aumentar a quantidade intracelular de Ca^{2+} , estimulando a região promotora AP-1 da involucrina. Isto explica o porque do aumento da expressão da ser dose-dependente e a INV não seguir este padrão. As duas vias de ativação da INV, tanto pela AQP3 quanto pela proteína G, estão ilustradas na Figura 23 e o gráfico que correlaciona a expressão da AQP3 e da INV está representado na Figura 24.

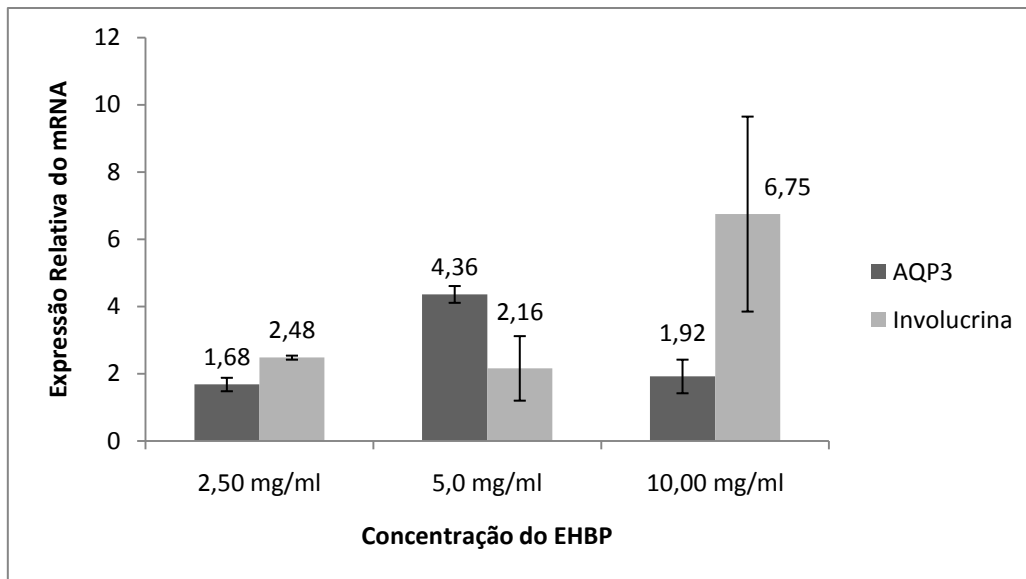


Figura 24 - Gráfico comparativo entre as análises de expressa gênica da aquaporina-3 e da involucrina. Apesar da expressão de AQP3 auxiliar o aumento da expressão de involucrina, a expressão da última não diminui do mesmo modo que a expressão de AQP3 porque a involucrina também tem sua expressão aumentada através da ativação da proteína G e aumento do cálcio intracelular.

A fibronectina apresentou um pico de expressão gênica no tratamento das culturas de queratinócitos com EHBP na concentração de 5,00 mg/ml, aumentando 7,20 vezes (desvio padrão de 0,37). Os valores de expressão nas concentrações de 2,50 mg/ml e 10,00 mg/ml foi respectivamente de 3,27 (desvio padrão de 1,14) e 0,72 (desvio padrão de 0,25). O aumento da expressão de fibronectina é de importância em relação à hidratação da pele, pois como já foi dito, a adesão entre os queratinócitos, e destes com a lâmina basal, e a interação com a derme, camada subjacente, são interações relacionadas à homeostase da epiderme e na manutenção do equilíbrio hídrico da pele (Haake e cols., 2001) e para tanto a fibronectina funciona como substrato que permite toda esta interação.

Em nosso trabalho, o tratamento com EHBP é capaz de aumentar a quantidade de colágeno tipo I e colágeno tipo IV em todas as concentrações utilizadas. Quando a concentração de EHBP é de 2,50 mg/ml, o aumento de colágeno é de 3,68 vezes. Com 5,00 mg/ml de EHBP, a quantidade de colágeno aumenta 5,34 vezes e, um aumento ainda maior de colágeno é induzido pelo EHBP a 10,00 mg/ml, aumentando 6,78 sua quantidade. Como dito anteriormente, o colágeno tipo I, o mais abundante tipo de colágeno encontrado na derme e encontra-se diminuído em peles envelhecidas, assim

como o colágeno tipo IV, que é o colágeno presente na junção dermo-epidérmica (Baumann, 2007).

Deficiência na rede de colágeno dérmico, principal componente estrutural da pele, é provavelmente uma das causas observadas em peles que envelhecem naturalmente ou pela exposição à radiação UV, levando a formação de rugas (Chung e cols., 2001 e Lee e cols., 2008). Esta deficiência é mais acentuada quando ocorre a exposição da pele a radiação UV porque ocorre o aumento da quantidade de MPPs, proteínas que, como anteriormente citadas, degradam as fibras de colágeno, acarretando na desestruturação da matriz de colágeno dérmica, podendo desencadear a formação de rugas (Lee e cols., 2008). Como dito anteriormente, o envelhecimento cutâneo é acompanhado por uma diminuição da quantidade de colágeno por volta dos 30-40 anos de idade. A partir dessa idade, a biosíntese de colágeno ocorre a níveis muito baixos (Uitto, 2008). A aplicação tópica de ácido all-trans-retinóico repõe parcialmente os níveis de colágeno I melhorando o enrugamento da pele fotoenvelhecida (Lee e cols., 2008).

Em relação à elastina, o EHBP é capaz de aumentar sua quantidade em sobrenadante de culturas de fibroblastos comerciais humanos. Quando o extrato é utilizado a uma concentração de 2,50 mg/ml, o aumento de elastina é de 1,28 vezes, quando utilizado a 5,00 mg/ml, o aumento é de 1,46 vezes e de 1,75 vezes quando o a concentração do extrato é de 10,00 mg/ml.

A utilização de uma substância capaz de aumentar a quantidade de elastina na derme é importante uma vez que a síntese de elastina é diminuída e sua degradação é aumentada em pele envelhecida (Rossetti e cols., 2010) e, a exposição à radiação UV faz com que as fibras elásticas sejam substituídas por um material distrófico elastótico além da degradação que ocorre normalmente das fibras elásticas (Lee e cols., 2008).

Lee e colaboradores (2008) mostraram que a desintegração das fibras elásticas se relaciona a gravidade das rugas na pele e que o tratamento com ácido retinóico é capaz de reparar a rede de fibras elásticas danificadas pelo envelhecimento, contribuindo com a diminuição das rugas na pele. Como a elastose solar é devido ao aumento da expressão do gene que codifica a elastina e diminuição do gene que

codifica a fibrilina-1 (principal componente da microfibrila que se associa a elastina na formação das fibras elásticas), o tratamento com ácido retinóico é importante porque além de aumentar a quantidade de elastina, aumenta também a quantidade de fibrilina-1 (Lee e cols., 2008). Além disso, o ácido retinóico diminui a quantidade da proteína MMP-12, prevenindo a degradação das fibras elásticas (Lee e cols., 2008).

As GAGs são componentes higroscópicos da matriz extracelular que são capazes de se ligar a até 1000 vezes seu próprio peso a água, como exposto anteriormente. Acredita-se que a suavidade tátil pelo ácido retinóico, bem estabelecida em peles fotoenvelhecidas, é mediada pela presença de GAGs nas camadas mais superficiais da pele (Kafi e cols., 2007).

Em nosso trabalho, foi observado um aumento também da quantidade de GAGs em sobrenadante de cultura de fibroblastos incubados por 48 horas com o EHBP. Todas as concentrações de EHBP induziram um aumento da quantidade de GAGs, embora o aumento mais significativo tenha se dado pelo EHBP na concentração de 10 mg/ml, triplicando a quantidade de GAGs (aumento de 3,07 vezes). Nos tratamentos com o EHBP nas concentrações de 2,50 e 5,00 mg/ml, o aumento foi de 1,43 e 2,36, respectivamente.

Assim como em nosso trabalho, Kafi e colaboradores (2007), observaram também pela reação de coloração Blyscan, em biopsia de pele da região superior interna do braço de pessoas com mais de 80 anos de idade, um aumento de GAGs pelo tratamento com o retinol, que se oxida a ácido retinóico logo depois que penetra na pele e possui uma menor capacidade de causar irritação. Porém neste trabalho o tratamento com retinol se deu durante 6 meses, e neste período houve um aumento de 40% de GAGs em relação a região do braço que recebeu apenas o veículo, sem o retinol.

6. Conclusões Finais

O presente estudo mostra que o extrato hidroglicólico de *Bidens pilosa* é capaz de aumentar a expressão de AQP3 em até 4,36 vezes, com EHBP na concentração de 5,00 mg/ml, AQP9 em até 4,95 vezes, com EHBP na concentração de 10,00 mg/ml, involucrina em até 6,75 vezes, na concentração de 10,00 mg/ml de EHBP e fibronectina em até 7,2 vezes, com EHBP na concentração de 5,00 mg/ml, o que *in vivo* pode vir a melhorar a distribuição de água e glicerol nas camadas da epiderme para assegurar a manutenção das propriedades de barreira exercidas por este tecido e não alterou a expressão de p53, o que mostra que o EHBP, a curto prazo, não apresenta capacidade de desenvolvimento de tumor.

Em relação às proteínas dérmicas, o EHBP aumenta a quantidade de colágeno, elastina e GAGs em sobrenadante de culturas de fibroblastos. *In vivo*, pode ser que o EHBP melhore a integridade estrutural da pele, a elasticidade, a resiliência e a hidratação da pele.

A espécie *Bidens pilosa* se mostra promissora em relação a sua utilização em formulações cosméticas, por melhorar *in vitro* aspectos epidérmicos e dérmicos relacionados à aparência da pele. Porém, se a espécie *Bidens pilosa* vier a se tornar um componente de formulações cosméticas, estudos de segurança *in vivo* e *in vitro* devem ser efetuados para que sua utilização seja segura.

Referências Bibliográficas

1. Abajo, C., Boffill, M.A., Campos, J., Méndez, M.A., González, Y., Mitjans, M., Vinardelli, M.P. 2004. In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa*. J. Ethnopharmacol 92,319-323.
2. Antia, M., Baneyx, G., Kubow, K.E., Vogel, V., 2008. Fibronectin in aging extracellular matrix fibrils is progressively unfolded by cells and elicits an enhanced rigidity response. Faraday Discuss 139, 229-420
3. Baumann, L., 2007. Skin aging and its treatment. Journal of pathology 211, 241-251
4. Bellemère, G., Von Stetten, O., Oddos, T., 2008. Retinoic Acid Increases Aquaporin 3 Expression in Normal Human Skin. Journal of Investigative Dermatology 128, 542-548
5. Bernstein, E.F., Uitto, J., 1996. The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. Clin Dermatol 14, 143-151
6. Bikle, D.D., Tu, C.L., Xie, Z., Oda, Y., 2003. Vitamin D regulated keratinocyte Differentiation: Role of Coactivators. Journal of Cellular Biochemistry 88, 290-295
7. Bikle D.D., 2010. Vitamin D and the Skin. J Bone Miner Metab 28, 117–130
8. Boury-Jamot, M., Sougrat, R., Tailhardat, M., Le Varlet, B., Bonté, F., Dumas, M., Verbavatz, J.-M., 2006. Expression and function on aquaporins in human skin: Is aquaporina-3 just a glycerol transporter? Biochimica et Biophysica Acta 1758, 1034-1042

9. Boury-Jamot, M., Daraspe, J., Bonté, F., Perrier, E., Schnebert, S., Dumas, M., Verbavatz, J-M, 2009. Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. *Handb Exp Pharmacol* 190, 205-217
10. Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S., Ponc, M., 2003. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res.* 42(1), 1-36
11. Brandner, J.M., 2007. Pores in the epidermis: aquaporins and tight junctions. *International Journal of Cosmetic Science* 29, 413-422
12. Brohem, C. A., Da Silva Cardeal, L. B., Tiago, M., Soengas, M. S., De Moraes Barros, S. B. and Maria-Engler, S. S., 2010. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell & Melanoma Research*, no. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x
13. Brysk, M.M., Santschi, C., Bell, T., Rajaraman, S., 1993. Predesquamin inhibits desquamation. *Experimental cell research* 209, 301-306
14. Brysk, M.,M., Bell, T., Tyring, S.K., Rajaraman S., 1994. Cytokines modulate terminal differentiation and the expression of predesquamin in cultured keratinocytes. *Experimental cell research* 211, 49-52
15. Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6(4), 328-340
16. Cao, C., Wan, S., Jiang, Q., Amaral, A., Lu, S., Hu, G., Bi, Z., Kouttab, N., Chu, W., Wan, Y., 2008. All-Trans Retinoic Acid attenuates ultraviolet radiation-induced down-regulation of aquaporina-3 and water permeability in human keratinocytes. *Journal of cellular physiology* 215, 506-516

17. Chang, M-H, Wang, G-J, Kuo, Y-H, Lee, C-K, 2000. The low polar constituents from *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff. *Journal of the Chinese Chemical Society* 47, 1131-1136
18. Chung, J.H., Seo, J.Y., Choi, H.R., Lee, M.K., Youn, C.S., Rhie, G., Cho, K.H., Kim, K.H., Park, K.C., Eun, H.C., 2001. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117(5), 1218-1224
19. Costa, de J.C., Diniz, A., Mantovani, M.S., Jordão, B.Q., 2008. *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 86-93
20. Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W., 2008. Caspase-14 reveals its secrets. *The Journal of Cell Biology* 180(3), 451-458
21. Eckert, R.L., Crish, J.F., Robinson, N.A., 1997. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev.* 77, 397-424
22. Fisher G.J., Kang S., James Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., Voorhees, J.J., 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 138, 1462-1470
23. Fisher, G.J., Varan, J., Voorhees, J.J., 2008. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol* 144(5), 666-672
24. Fluhr, J.W., Darlenski, R., Surber, C., 2008. Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and function. *Journal of dermatology* 159, 23-34

25. Haake, A., Scott, G.A., Holbrook, K.A., 2001. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. In: Freinkel RK, Woodley DT, eds. *The biology of the skin*. The Parthenon Publishing Group, New York, 19-45
26. Hara, M., Ma, T., Verkman, A.S., 2002. Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3 deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity and barrier recovery. *J Biol Chem* 277, 46616-46621
27. Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S., 2005. Aquaporins and skin function. *Biol. Cell* 97, 497-486
28. Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S., 2006. Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1386-1392
29. Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S., 2007. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J. Mol. Med.* 86, 221-231
30. Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S., 2008a. Roles of Aquaporin-3 in the epidermis. *The society for investigative dermatology*
31. Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S., 2008b. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. *Molecular and Cellular Biology* 28, 326-332
32. Hatakeyama, S., Yoshida, Y., Tani, T., Koyama, Y., Nihei, K., Ohshiro, K., Kamiie, J-I., Yaoita E., Suda, T., Hatakeyama, K., Yamamoto, T., 2001. Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biophys Res Commun* 287(4), 814-819

33. Hoffjan, S., Stemmler, S., 2007. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *British journal of dermatology* 157, 441-449
34. Ishibashi, K., Kuwahar, M., Kageyama, Y., Tohsaka, A., Marumo, F., Sasaki, S., 1997. Cloning and Functional Expression of a Second New Aquaporin Abundantly Expressed in Testis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237, 714–718
35. Ishibashi, K., Morinaga, T., Kuwahara, M., Sasaki, S., Imai, M., 2002. Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as a aquaglyceroporin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1576, 335-340
36. Jurzak, M., Latocha, M., Gojniczek, K., Kapral, M., Garnarczyk, k., Pierzchała E., 2008. Influence of retinoids on skin fibroblasts metabolism *in vitro*. *Acta Pol Pharm* 65, 85-91
37. Kafi, R., Kwak, H.S.R., Schumacher, W.E., Cho, S., Hanft, V.N., Hamilton, T.A., King, A.L., Neal, J.D., Varani, J., Fisher, G.J., Vooshees, J.J., Kang, S., 2007. Improvement of naturally aged skin with vitamin A (Retinol). *Arch Dermatol* 143(5), 606-612
38. Kalinin, A., Marekov, L.N., Steinert, P.M., 2001. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *Journal of Cell Science* 114, 3069-3070
39. Kang, W., Jang, J., 2009. Protein engineering, expression, and activity of a novel fusion protein possessin keratinocyte growth factor 2 and fibronectin. *Acta Biochim Biophys Sin* 41, 16-20

40. Kanellou, P., Zaravinos, A., Zioga, M., Spandidos, D.A., 2009. Deregulation of the tumour suppressor genes p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and p53 in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 160(6), 1215-21
41. Kielty, C.M., Sherratt, M.J., Shuttleworth, C.A., 2002. Elastic Fibres. *Journal of Cell Science* 115, 2817-2828
42. Knepper, M.A., 1994. The aquaporin family of molecular water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6255-6258
43. Koch, P.J., de Viragh, P.A., Scharer, E., Bundman, D., Longley, M.A., Bickenbach, J., Kawachi, Y., Suga, Y., Zhou, Z., Huber, M., Hohl, D., Kartasova, T., Jarnik, M., Steven, A.C., Roop, D.R., 2000. Lessons from loricrina-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *The Journal of Cell Biology* 151(2), 389-400
44. Kuechle, M.K., Presland, R.B., Lewis, S.P., Fleckman, P., Dale, B.A., 2000. Inducible expression of filaggrin increases keratinocyte susceptibility to apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 7, 566-573
45. Kwiecinski, M.R., Felipe, K.B., Schoenfelder, T., Wiese, L.P.L., Rossi, M.H., Gonçalez E., Felicio, J.D., Filho, D.W., Pedrosa, R.C., 2008. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *J of Ethnopharmacology* 117, 69-75
46. Kwon, A.H., Qiu, Z., Hirao, Y., 2007. Topical application of plasma fibronectin in full-thickness skin wound healing in rats. *Exp Biol Med* 232(7), 935-41

47. Lee, J.Y., Kim, Y.K., Seo, J.Y., Choi, C.W., Hwang, J.S., Lee, B.G., Chang, I.S., Chung, J.H., 2008. Loss of elastic fibers causes skin wrinkles in sun-damaged human skin. *Journal of Dermatological Science* 50, 99-107
48. Levine, A.J., Oren, M., 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9 (10), 749-758
49. Li, E.R., Owens, D.M., Djan, P., Watt, F.M., 2000. Expression of involucrin in normal, hyperproliferative and neoplastic mouse keratinocytes. *Exp Dermatol* 9, 431-438
50. Li, J., Tang, H., Hu, X., Chen, M., Xie, H., 2010. Aquaporin-3 gene and protein expression in sun-protected human skin decreases with skin ageing. *Australasian Journal of Dermatology* 51, 106-112
51. Lorenzi, H. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e xóticas cultivadas / Harri Lorenzi, Francisco José de Abreu Matos. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. Pág 144*
52. Lozano, G., 2009. Mouse models of p53 functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001115
53. McGrath, J.A., Uitto, J., 2007. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trens in molecular medicine* 14, 20-27
54. McKeown-Longo, P.J., Mosher, D.F., 1983. Binding of plasma fibronectina to cell layers of human skin fibroblasts. *J Cell Biol* 97, 466-472
55. Mukherjee, S., Date, A., Patravale, V., Korting, H.C., Roeder, A., Weindl, G., 2006. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clinical Interventions in Aging* 1(4), 327-348

56. Obara, M., Sakuma, T., Fugikawa, K., 2010. The third type III module of human fibronectin mediates cell adhesion and migration. *Journal Biochem* 147(3), 327-335
57. Papadopoulos, M.C., Saadoun, S., Verkman, A.S., 2008. Aquaporins and cell migration. *Eur J Physiol* 456, 693-700
58. Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2000-2007
59. Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatol.* 17, 1063-1072
60. Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J.S., Morison, W.L., Sauder, D.N., 2006. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 55, 1-19
61. Rojek, A.M., Skowronski, M.T., Füchtbauer, E.M., Füchtbauer, A.C., Fenton, R.A., Agre, P., Frøkiaer, J., Nielsen, S., 2007. Defective glycerol metabolism in aquaporina 9 (AQP9) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(9), 3609-14
62. Rossetti, D., Kielmanowicz, M.G., Vigodman, S., Hu, Y.P., Chen, N., Nkengne, A., Oddos, T., Fischer, D., Seiberg, M., Lin, C.B., 2010. A novel anti-ageing mechanism for retinol: induction of dermal elastin synthesis and elastin fibre formation. *International Journal of Cosmetic Science* , 1-10
63. Sampaio, S.A.R., Rivitti, E.A. *Pele Normal In: Dermatologia.* Porto Alegre: Artmed, 2007. P. 20-23
64. Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., McLean, W.H.I., 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of Cell Science* 122, 1285-1294

65. Sevilla, L.M., Nachat, R., Groot, K.R., Klement, J.F., Uitto, J., Djian, P., Määttä, A., Watt, F.M., 2007. Mice deficient in involucrina, envoplakin, and periplakin have a defective epidermal barrier. *The Journal of Cell Biology* 179(7), 1599-1612
66. Sugiyama, Y., Ota, Y., Hara, M., Inoue, S., 2001. Osmotic Stress up-regulated aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1522, 82-88
67. Sundararajan, P., Dey, A., Smith, A., Doss, A.G., Rajappan, M., Natarajan, S., 2006. Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant. *African Health Sciences* 6, 27-30
68. Tagami, H., 2008. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *International Journal of Cosmetic Science* 30, 413-434
69. Uitto, J., 2008. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *Journal of Drugs in Dermatology* 7(2), S12–S16
70. Velazquez Pereda, Mdel C, Dieamant, G de C, Eberlin, S., Nogueira, C., Colombi, D., Di Stasi, L.C, de Souza Queiroz, M.L., 2009. Effect of green *Coffea arabica L.* seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in *in vitro* and *ex vivo* human skin models. *Journal of Cosmetic Dermatology* 8, 56-62
71. Velazquez Pereda, Mdel C, Dieamant, G de C, Eberlin, S., Werka, R.M., Colombi, D., de Souza Queiroz, M.L., Di Stasi, L.C, 2010. Expression of differential genes involved in the maintenance of water balance in human skin by *Piptadenia colubrina* extract. *Journal of Cosmetic Dermatology* 9, 35-43

72. Verani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligiel, S.E.G., Kang, S., Fisher, G.J., Voorhees, J.J., 2006. Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin: Roles of Age-Dependent Alteration in Fibroblast Function and Defective Mechanical Stimulation. *American Journal of Pathology* 168, 1861-1868
73. Verkman, A.S., 2008. A cautionary note on cosmetics containing ingredients that increased aquaporina-3 expression. *Exp Dermatol* 17(10), 871-872
74. Yang, H-L, Chen, S-C, Chang, N-W, Chang, J-M, Lee, M-L, Tsai, P-C, Fu, H-H, Kao, W-W, Chiang, H-C, Wang, H-H, Hseu, Y-C, 2006. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology* 44, 1513–1521
75. Yen, A., Bell, T., Brysk, H., Rajaraman, S., Brysk, M.M., 1994. Predesquamin extends maturation of cultured keratinocytes. *Experimental cell research* 213, 305-307
76. Zheng, X., Bollag, W.B., 2003. Aquaporin 3 Colocates with Phospholipase D2 in Calveolin-Rich Membrane Microdomains and Is Downregulated upon Keratinocyte Differentiation. *J Investigative Dermatology* 121, 1487-1495
77. Wang, Y., Schulten, K., Tajkhorshid, E., 2005. What makes an aquaporina a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure* 13, 1107-1118
78. www.abihpec.org.br – acesso em 03.05.2010

8. Anexo

8.1. Relação dos Primers

	Direção			Produto Amplificado	Localização no Cromossomo	Eficiência	Número Acesso	Desenho do Primer					
AQP3	B - F	5'-CCCATCGTGTCCCACTC-3'	entre os exons 4 e 5	60pb	9p13	1,90	NM_004925	Bedford e cols., 2003					
	B - R	5'-GATCATCAGCTGGTACA-3'		54 pb		x			Primer Express				
	A - f	5'-CACTTGGATATGATCAATGGCT-3'	entre os exons 5 e 6	46 pb		1,92		NM_020980	Primer Express				
	A - r	5'-AAGGGAGGCTGTCCTATGAAGT-3'		78 pb		1,95			Primer Express				
AQP9	f	5'-CGTATCTATCTCTGGCGAACG-3'	entre os exons 4 e 5	15q	x	NM_080429	Primer Express						
	r	5'-GTGGCCACCACCTGATCTG-3'											
	D - f	5'-TCGAGACCTGATCCAGAC-3'	entre os exons 5 e 6					1q21.3	x	NM_080429	Primer Express		
	D - r	5'-CAGAAAGTTGTTCCAGCTCT-3'											
AQP10	D - f	5'-GCCACGCTCTTCCACTAC-3'	entre os exons 5 e 6	64 pb	x	NM_080429	Primer Express						
	D - r	5'-CAGCCATTACCAGCACTGAA-3'											
	P - f	5'-GGGTCAGCTCCCATTTACATC-3'	entre os exons 3 e 4					101 pb	x	NM_080429	Primer Express		
	P - r	5'-TGTATAGTTCTGTAGGGCATCATGGTAGA-3'											
FBR	f	5'-TCCATTGAACCTTGATCTGG-3'	Isoformas 1, 3, 5 e 6	186 pb	2,07	NT_005403	Primer Express						
	r	5'-CCACCTCCATATCCACCAT-3'											
	B - f	5'-AACTTTGATCCACCAGCAG-3'						2q34	106pb	x	NT_005403	Primer Express	
	B - r	5'-TTGCAACCAAGTTCCATGA-3'											
INV	f	5'-GGACTGCCTGAGCAAGAATGTG-3'	exon 2	121 pb	1,93	NM_005547	Chen e cols., 2006						
	r	5'-TAAGCTGCTCTGGGTTT-3'						exon 2					1,96
	B - f	5'-GTGGGGGAGAGGGGAATTA-3'	exon 3				82 pb		2,01	NM_002016	Primer Express		
	B - r	5'-CTCACCTGAGGTTGGATTG-3'						exon 3				89 pb	
FLG	f	5'-GTTACAATCCAATCCTGTTGTTTC-3'	exon 3	1q21	1,93	NM_005547					Chen e cols., 2006		
	r	5'-CGTTGCATAATACCTGGATGATC-3'						exon 3					1,96
	3UTR - f	5'-AGGAGCCAAAATATAAAAACAGTTCTG-3'	exon 3				1q21.3		2,01	NM_002016	Primer Express		
	3UTR - r	5'-CAATAGAAAGGATAATAGAGAAAGATGTGCTA-3'						exon 3				x	
p53	f	5'-CTCACTCCAGCCACCTGAA-3'	entre os exons 11 e 12	223 pb	2,06	NM_001126112					Primer Express		
	r	5'-AAATGGAAGTCTGGGTGCT-3'						exon 12					214 pb
	B - f	5'-TGAGACTGGTCTCGCTTTG-3'	exon 12				17p13.1		2,06	NM_001126112	Primer Express		
	B - r	5'-GAGCCCAGGAGTTTGAGACC-3'						exon 12				x	

	Direção			Produto Amplificado	Localização no Cromossomo	Eficiência	Número Acesso	Desenho do Primer
GADPH	f	5'-GAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC-3'	entre os exons 8 e 9	126 pb	12p13	2,09	NM_002046	Primer Express
	r	5'-GCCAAATTCGTTGTCATACCCAGGAAATG-3'						
HPRT	f	5'-TCATTATGCTGAGGATT-3'	entre os exons 2 e 3	101 pb	Xq26.1	1,93	NM_000194	Primer Express
	r	5'-GGCCTCCCATCTCCTTCA-3'						