

**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde**

DANIELA GURGEL DE FREITAS PIRES

Capacidade quimioprotetora da fração metanólica do extrato dos micélios do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da folha de *Bauhinia variegata* e do composto GQ-19 em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

Brasília – DF

Agosto/2023

DANIELA GURGEL DE FREITAS PIRES

Capacidade quimioprotetora da fração metanólica do extrato dos micélios do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da folha de *Bauhinia variegata* e do composto GQ-19 em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito parcial à obtenção de Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

Brasília – DF

Agosto/2023

DANIELA GURGEL DE FREITAS PIRES

Capacidade quimioprotetora da fração metanólica do extrato dos micélios do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da folha de *Bauhinia variegata* e do composto GQ-19 em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito parcial à obtenção de Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Carolina Martins Ribeiro
Universidade de Brasília

Dra. Cinthia Gabriel Meireles
Harvard Medical School

Dra. Laíza Magalhães de Araújo
Hemocentro de Brasília

Prof. Dra. Angélica Amorim Amato (suplente)
Universidade de Brasília

Brasília – DF
Agosto/2023

“Seja forte e corajoso”

Josué 1:9

À minha amada família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o dom da vida e ter me guiado para a área de pesquisa e, em especial, para o Laboratório de Farmacologia Molecular.

À minha orientadora profa. Dra. Maria de Fátima Borin pela orientação, dedicação e paciência desde o mestrado.

Ao meu marido, Leonardo, por todo amor, apoio e incentivo.

Ao meu filho, Diego, que sem saber me deu forças para concluir o Doutorado.

Aos meus amados pais, Jeferson e Livia, por todo amor, apoio, dedicação e suporte.

Às minhas irmãs, Deniza e Débora, por serem meu ombro amigo sempre que precisei nessa jornada.

Aos meus sobrinhos, Valentina, Eduardo, João Pedro e Augusto, que me deram forças nos momentos mais difíceis, ainda que não saibam.

Aos meus avós, Eduardo e Elza, por me incentivarem e ajudarem mostrando sempre o quanto se orgulham de mim.

A toda minha família e amigos que sempre me apoiaram.

Aos filhos da Fátima por sempre me ajudarem e me escutarem incansavelmente.

À Marielly pela paciência e disposição para me auxiliar, além da amizade oferecida.

A todos os professores, técnicos e alunos do Laboratório de Farmacologia Molecular pelo apoio durante a pesquisa.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF – Processos 00193-00000812/2021-31 e 0193.000977/2015), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC) e ao Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT - Rede Pró-Centro-Oeste de Pesquisa e Pós-Graduação – Processo 407851/2013-5) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro a este projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada.

RESUMO

FREITAS PIRES, Daniela Gurgel. **Capacidade quimioprotetora da fração metanólica do extrato dos micélios do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da folha de *Bauhinia variegata* e do composto GQ-19 em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.** Brasília, 2023. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2023.

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem como função primordial a proteção dos demais órgãos, sendo assim, é considerada um dos órgãos mais importantes do corpo humano. O envelhecimento da pele é um processo complexo e um dos problemas mais relevantes associados a este órgão, e pode ser induzido por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos ocorrem devido a mudanças fisiológicas genéticas e os extrínsecos devido a fatores ambientais. Dentre esses, a exposição à radiação UV se destaca por ser responsável por várias doenças da pele, como o câncer, além do envelhecimento, conhecido como fotoenvelhecimento. Um dos efeitos dos raios UV é a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar modificações no DNA, danos a lipídeos e proteínas, ativar o processo inflamatório e metaloproteinases de matriz (MMP), enzima responsável por degradar a matriz extracelular. O corpo humano tem um sistema antioxidante composto por enzimas, como superóxido dismutase e catalase, e substâncias não enzimáticas, como a vitamina C e a E, e, assim, reverte os efeitos das espécies reativas de oxigênio, mantendo o balanço redox nas células. Entretanto, o excesso de exposição à radiação UV causa um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes, fazendo com que os danos causados por aquelas possam ser propagados. Receptores nucleares estão envolvidos em mecanismos moleculares que controlam o processo de envelhecimento, dentre eles, os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) regulam a função e expressão de genes que modulam a atividade das MMPs e a expressão de colágeno para manter a homeostase da pele. O objetivo da pesquisa foi avaliar a capacidade de metabólitos do fungo endofítico extraído da folha de *Bauhinia variegata* e do composto sintético GQ-19 para prevenir o fotoenvelhecimento da pele, simulado pela exposição de fibroblastos dérmicos humanos à radiação UVA, verificando seu efeito pela quantificação da expressão dos genes de MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 e colágeno do tipo I por RT-qPCR, avaliação dos níveis de IL6 e IL-1 β , e atividade das enzimas antioxidantes. Os resultados obtidos

mostram que a fração metanólica do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. possui atividade antioxidante e o composto sintético GQ-19 tem atividade agonista frente ao PPAR γ , a junção de suas ações complementares diminui a expressão de TIMP-1 e MMP-3 após radiação UVA 5 J/cm².

Palavras-Chave: fungo endofítico; GQ-19; pele; antioxidante; envelhecimento; *Bauhinia variegata*.

ABSTRACT

FREITAS PIRES, Daniela Gurgel. **Chemoprotective capacity of methanolic fraction of the mycelia extract of endophytic fungus *Phomopsis* sp. isolated from *Bauhinia variegata* leaf and compound GQ-19 in cultured human dermal fibroblasts.** Brasília, 2023. Thesis (Doctorate in Pharmaceutical Sciences) – Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2023.

The skin is the largest organ of the human body and its primary function is to protect the other organs, therefore, it is considered one of the most important organs of the human body. Skin aging is a complex process and one of the most relevant problems associated with this organ, and it can be induced by intrinsic and extrinsic factors. Intrinsic factors occur due to genetic physiological changes and extrinsic due to environmental factors. Among these, exposure to UV radiation stands out for being responsible for several skin diseases, such as cancer, in addition to aging, known as photoaging. One of the effects of UV rays is the production of reactive oxygen species, which can cause changes in DNA, damage to lipids and proteins, activate the inflammatory process and matrix metalloproteinases (MMP), the enzyme responsible for degrading the extracellular matrix. The human body has an antioxidant system composed of enzymes, such as superoxide dismutase and catalase, and non-enzymatic substances, such as vitamin C and E, and thus reverses the effects of reactive oxygen species, maintaining the redox balance in cells. However, excessive exposure to UV radiation causes an imbalance between the production of reactive oxygen species and antioxidant defenses, causing the damage caused by the former to be propagated. Nuclear receptors are involved in molecular mechanisms that control the aging process, among them, peroxisomal proliferator-activated receptors (PPAR) regulate the function and expression of genes that modulate MMP activity and collagen expression to maintain skin homeostasis. The objective of the research was to evaluate the ability of metabolites of the endophytic fungus extracted from the leaf of *Bauhinia variegata* and the synthetic compound GQ-19 to prevent skin photoaging, simulated by exposure of human dermal fibroblasts to UVA radiation, verifying its effect by quantifying the expression of MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 and type I collagen genes by RT-qPCR, evaluation of IL6 and IL-1 β levels, and activity of antioxidant enzymes. The results show that methanolic fraction of extract of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. has antioxidant activity and the synthetic compound

GQ-19 has agonist activity against PPAR γ , their complementary actions decrease the expression of TIMP-1 and MMP-3 after UVA radiation 5 J/cm².

Keywords: endophytic fungus; GQ-19; skin; antioxidant; aging; *Bauhinia variegata*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas do GQ-19 (A) e da rosiglitazona (B).....	16
Figura 2. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com GQ-19.	30
Figura 3. Atividade da SOD nas células submetidas ao estresse oxidativo e tratadas com GQ-19.....	31
Figura 4. Atividade da catalase nas células submetidas ao estresse oxidativo e tratadas com GQ-19.....	32
Figura 5. Concentração de ROS nas células submetidas ao estresse oxidativo e tratadas com extrato ou GQ-19.....	33
Figura 6. Avaliação da atividade agonista do extrato e do GQ-19 frente aos receptores PPAR.....	34
Figura 7. Avaliação da inibição da collagenase pelo extrato ou GQ-19.	35
Figura 8. Viabilidade Celular de Fibroblastos Dérmicos pós diferentes dosagens de radiação UVA.....	36
Figura 9. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com GQ-19 ou extrato do fungo <i>Phomopsis sp.</i> junto com a radiação UVA.	37
Figura 10. Expressão de TIMP e Colágeno nas células submetidas ao estresse oxidativo por H ₂ O ₂ e tratadas com extrato ou GQ-19.....	38
Figura 11. Expressão de TIMP-1, Colágeno, MMP-1, MMP-2 e MMP-3 nas células submetidas a radiação com UVA.	40
Figura 12. Avaliação dos níveis de IL-6 e IL-1 β	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido Abiético
AP-1	Proteína Ativadora 1
APx	Ascorbato Peroxidase
AsA	Ascorbato
COX	Ciclo-oxigenase
CuZnSOD	Cobre-zinco Superóxido Dismutase
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECSOD	Superóxido Dismutase Extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
GERg3	Ginsenosídeo Rg3
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Dissulfeto de glutathione
H2DCF-DA	Diacetato de Fluorescência 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
IL	Interleucina
IR	Infravermelha
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógenos
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MnSOD	Superóxido de Manganês Dismutase
MTT	3-(4,5 dimetiltiliazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazólio
NBT	Nitro Azul de Tetrazólio
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
Nrf2	Fator Nuclear Eritroide 2
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais

PPAR α	Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais Isotipo Alfa
PPAR β/δ	Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais Isotipo Beta/Delta
PPAR γ	Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais Isotipo Gama
PPRE	Elemento Responsivo aos Proliferadores Peroxissomais
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT-qPCR	PCR de Transcrição Reversa em Tempo Real
RXR	Receptor do Ácido Retinoico X
SMMS	S-metilmetionina sulfônio
SOD	Superóxido Dismutase
TGF- β	Fator de Crescimento de Transformação Beta
TIMP	Inibidor de Fator de Metaloproteinase de Matriz
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UV	Ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta na faixa A do espectro (315 a 400 nm)
UVB	Radiação ultravioleta na faixa B do espectro (280 a 315 nm)
UVC	Radiação ultravioleta na faixa C do espectro (100 a 280 nm)
UVR	Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
Lista de figuras	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
SUMÁRIO	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Pele	1
1.2 Fotoenvelhecimento	3
1.3 Metaloproteinase de matriz (MMP)	8
1.4 Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais.....	12
1.5 GQ-19.....	15
1.6 Microrganismos Endofíticos	16
2. OBJETIVO.....	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Manutenção dos fungos, cultivo em cultura líquida submersa e produção do extrato bruto.	23
3.2. Fracionamento do extrato bruto	23
3.3. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com o GQ-19.....	23
3.4. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase	24
3.5. Avaliação da atividade da enzima catalase	24
3.6. Quantificação das ROS intracelulares.....	25
3.7. Avaliação da atividade agonista da fração metanólica do extrato do fungo endofítico e do GQ-19 às isoformas gama, alfa e beta/delta do PPAR.....	26
3.8. Avaliação da inibição da enzima collagenase pelo extrato do fungo endofítico e GQ-19.....	26
3.9. Exposição à radiação UVA	27
3.10. Extração de RNA	27
3.11. Tratamento do RNA extraído com a enzima desoxirribonuclease (DNase) I.	28

3.12. Quantificação da expressão dos genes de MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 e colágeno do tipo I por RT-qPCR.....	29
3.13. Avaliação dos níveis de IL-6 e IL-1 β	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com GQ-19.	30
4.2. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase.	30
4.3. Avaliação da atividade da enzima catalase.	31
4.4. Quantificação de ROS intracelulares.	32
4.5. Avaliação da atividade agonista do extrato e do GQ-19 aos receptores PPAR γ , PPAR α e PPAR β/δ	33
4.6. Avaliação da inibição da enzima collagenase pelo extrato do fungo endofítico e GQ-19.....	34
4.7. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos irradiados por UVA.....	35
4.8. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos irradiados com UVA e tratados com GQ-19 ou com extrato do fungo.....	36
4.9. Avaliação da expressão gênica nas células submetidas ao estresse oxidativo por H ₂ O ₂	37
4.10. Avaliação da expressão gênica nas células irradiadas por UVA.	38
4.11. Avaliação dos níveis de IL-6 e IL-1 β	41
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo em peso e extensão, representando cerca de 16% do peso corporal, e é um dos órgãos mais complexos, conhecido como um “cérebro por fora” (GENG *et al.*, 2021; NICHOLS; KATIYAR, 2011; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021; TOBIN, 2017). Ela é a primeira barreira de defesa dos organismos, visto que está em contato direto com o ambiente externo e é um universo biológico, pois incorpora todos os principais sistemas de suporte do corpo, como sangue, inervação e músculo (GENG *et al.*, 2021; TOBIN, 2017). Dessa forma, tem muitas funções, como cobrir os órgãos internos, manter a temperatura corporal, evitar a perda de água, sentir os estímulos externos, excretar metabólitos cutâneos e atuar como uma barreira física protetora contra os efeitos nocivos dos agentes ambientais e xenobióticos (GENG *et al.*, 2021; NICHOLS; KATIYAR, 2011; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021).

A pele é formada pela epiderme estratificada, derme e tecido subcutâneo. A epiderme é composta por queratinócitos (90-95% das células da pele), células de Langerhans (2%), melanócitos (3%) e células de Merkel (0,5%). A epiderme contém o estrato córneo, que mantém a hidratação ideal da pele, a camada hialina, a camada granular e a camada germinativa, que supre o estrato córneo em constante descamação (GENG *et al.*, 2021; LAVERS, 2017; LEE *et al.*, 2016).

A derme é composta de tecido conjuntivo e também contém apêndices, incluindo glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, vasos sanguíneos e nervos. A principal célula da derme é o fibroblasto, o qual sintetiza e secreta a matriz extracelular (MEC), que é essencial para as propriedades estruturais e mecânicas do órgão, bem como para suas funções. Dentre as principais proteínas que compõem a MEC estão o colágeno, o ácido hialurônico e a elastina. O colágeno é a proteína mais importante da MEC (GENG *et al.*, 2021; MCCABE *et al.*, 2020; PANICH *et al.*, 2016; TOBIN, 2017).

A MEC com todos seus componentes em quantidades ideais deixa a pele com um bom aspecto e permite que suas funções sejam cumpridas adequadamente (TAKASAO *et al.*, 2012). Entretanto, a proteção conferida pela pele pode ser comprometida pelo envelhecimento (PANICH *et al.*, 2016).

Embora todos os órgãos mudem ao longo do tempo como resultado do processo natural de envelhecimento, o envelhecimento cutâneo é uma das principais manifestações do

envelhecimento corporal. As alterações decorrentes desse processo são exacerbadas por uma série de fatores ambientais, incluindo a exposição à radiação ultravioleta (UV) (GENG *et al.*, 2021; MCCABE *et al.*, 2020; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021).

O envelhecimento cutâneo é um fenômeno biológico complexo multifatorial que envolve fatores genéticos e ambientais. Dessa forma, pode ser classificado em envelhecimento natural, também conhecido como envelhecimento intrínseco, que inclui fatores genéticos e do tempo, e envelhecimento extrínseco, que inclui fotodano, efeitos do tabagismo, da poluição do ar, da ocupação e do estilo de vida, os quais levam ao envelhecimento prematuro. Estudos histológicos revelaram que as principais alterações na pele envelhecida, tanto intrinsecamente quanto por fatores extrínsecos, estão localizadas na derme (GENG *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2016; MCCABE *et al.*, 2020; PANICH *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2020).

Evidências bioquímicas indicam que as características moleculares do envelhecimento intrínseco da pele são a fragmentação das fibras de colágeno e o declínio de sua síntese (MCCABE *et al.*, 2020). Alterações no colágeno desempenham um papel fundamental no processo de envelhecimento da pele. Os feixes de colágeno dérmico são bem organizados em adultos jovens, onde são dispostos para facilitar uma extensão que retorna ao estado de repouso por meio de fibras elásticas entrelaçadas (GENG *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2016; MCCABE *et al.*, 2020; PANICH *et al.*, 2016; TOBIN, 2017; ZHOU *et al.*, 2020). No entanto, na pele envelhecida, eles perdem sua configuração extensível, tornando-se fragmentados, desorganizados e menos solúveis. Como as fibras de colágeno são responsáveis por grande parte da resistência e resiliência da pele, sua degeneração faz com que a pele se torne frágil, se machuque com facilidade e diminua a elasticidade (GENG *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2016; MCCABE *et al.*, 2020; PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022; TOBIN, 2017; ZHOU *et al.*, 2020).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas que degradam a MEC dérmica e são reguladas positivamente durante o envelhecimento. Considerando que a síntese de colágeno diminui com o envelhecimento, o resultado é um desequilíbrio entre síntese e degradação (GENG *et al.*, 2021; TOBIN, 2017).

As alterações da MEC dérmica relacionadas à idade prejudicam as propriedades estruturais e mecânicas da pele e criam um microambiente tecidual que promove doenças de pele relacionadas à idade, como afinamento, aumento da fragilidade, suporte vascular prejudicado e má cicatrização de feridas. Além disso, o envelhecimento e a exposição ao sol são dois dos fatores de risco mais significativos para o desenvolvimento de cânceres de pele

(GENG *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2016; MCCABE *et al.*, 2020; PANICH *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2020).

1.2 Fotoenvelhecimento

O envelhecimento da pele associado à exposição aos raios UV é conhecido como fotoenvelhecimento, o qual é responsável por aproximadamente 80% do envelhecimento da pele. Embora a radiação UV tenha muitos efeitos benéficos, como capacidade de matar microrganismos, regular digestão, respiração, sistema imunológico e promover a síntese de vitamina D, a exposição prolongada aos raios UV causa danos aos olhos, pele e sistema imunológico, sendo considerada como o principal fator para o envelhecimento extrínseco da pele (CUI *et al.*, 2022; GENG *et al.*, 2021; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021; PANICH *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2020).

O fotoenvelhecimento da pele é um processo complexo. Nos últimos anos, os mecanismos subjacentes relacionados a este processo têm sido intensamente estudados (GENG *et al.*, 2021).

O fotoenvelhecimento se caracteriza macroscopicamente por rugas grosseiras, perda do tom da pele, hiperpigmentação, lentigos, aparência marrom-amarelada, pele áspera, ressecamento, palidez, flacidez, sulcos profundos, angiotelectasia e atrofia grave (GENG *et al.*, 2021; NICHOLS; KATYAR, 2011; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021; PANICH *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2020). Estudos histológicos mostram hiperplasia epidérmica, aumento das concentrações locais de glicosaminoglicanos e proteoglicanos, expressão aumentada de marcadores inflamatórios (mastócitos, eosinófilos, células mononucleares), dano e desordem das fibras de colágeno e um grande acúmulo de substâncias elásticas no tecido conjuntivo, além do desenvolvimento de vários tumores benignos ou malignos, como ceratose solar, queilite actínica, melanoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma basocelular (GENG *et al.*, 2021; NICHOLS; KATYAR, 2011; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021; PANICH *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2020).

A luz solar é composta principalmente por 53% de luz infravermelha, 44% de luz visível e 3% de luz ultravioleta (GENG *et al.*, 2021). De acordo com os diferentes comprimentos de onda, a luz UV é classificada em UV de onda longa (UVA, 315–400 nm), UV de onda média (UVB, 280–315 nm) e UV de onda curta (UVC, 200–280 nm). Destas, a radiação UVC é quase totalmente absorvida pela camada de ozônio, por isso, o fotoenvelhecimento é causado

principalmente pelos raios UVA e UVB (CUI *et al.*, 2022; GENG *et al.*, 2021; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021).

A radiação UVA tem uma forte capacidade de induzir a produção de radicais livres, peroxidação lipídica, e prejudica as fibras de colágeno e fibras elásticas no tecido dérmico (GENG *et al.*, 2021). Os raios UVA podem atingir a camada profunda da derme devido à sua maior capacidade de penetração na pele (GENG *et al.*, 2021). Por outro lado, os UVB levam principalmente a lesões na epiderme, causando eritema e queimaduras solares, e na derme superficial. Ambos, UVA e UVB causam alterações no DNA, podendo ser absorvidos por proteínas e DNA, levando a danos celulares e mutações, e até câncer de pele (CUI *et al.*, 2022; GENG *et al.*, 2021; JIN; PADRON; PFEIFER, 2022; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021).

Tanto os raios UVA quanto os UVB são capazes de induzir a produção de ROS, que incluem o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), oxigênio singleto ($^1O_2$), peróxidos lipídicos (LOOH) e seus radicais ($LOO^{\cdot}$). As ROS são quimicamente ativas e oxidam os ácidos graxos insaturados das moléculas fosfolipídicas celulares para o malondialdeído, prejudicando diretamente as macromoléculas funcionais e proteínas. Esses fatores induzem o envelhecimento da pele, fototoxicidade, inflamação, formação de tumores malignos e degradação das membranas celulares (GENG *et al.*, 2021; LEE, H. *et al.*, 2016).

Além disso, a radiação UV inibe ou ativa várias vias de sinalização na derme e na epiderme. Isso ocorre, pois a pele absorve energia eletromagnética através de cromóforos celulares e, em seguida, converte em energia química. Esses cromóforos energizados reagem e produzem ROS, e o excesso de ROS desencadeia uma cascata inflamatória, que leva à ativação de diversos fatores de transcrição nas células da pele, como proteína ativadora-1 (AP-1) e fator nuclear kappa B (NF- κ B). A AP-1 induz a regulação positiva de MMPs, como colagenase-1 (MMP-1), gelatinase A (MMP-2) e estromelisina-1 (MMP-3), que degradam proteínas da MEC, como colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicano e, indiretamente, inibem a síntese de colágeno na pele, levando a uma diminuição do conteúdo da MEC e promovendo a formação de uma estrutura irregular ou mesmo o colapso da pele (CUI *et al.*, 2022; GENG *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2016; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021).

As ROS também são produzidas ao longo da vida pelas células em diversos momentos, são a primeira linha de defesa e estão envolvidas em várias funções fisiológicas, incluindo a respiração celular (PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022). Sua formação também é promovida por outros fatores externos, como cigarro, poluição e álcool (PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022). Diante disso, para que a homeostase da pele seja mantida, ela possui

mecanismos que neutralizam as ROS, e que podem reparar os danos oxidativos (PANICH *et al.*, 2016). Existem duas frentes de ação conhecidas como via antioxidante e via de reparo por excisão de base (PANICH *et al.*, 2016).

A via antioxidante é composta por sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que trabalham em uma rede complexa para manter o nível ideal de ROS nas células por vários mecanismos. Esses mecanismos funcionam para neutralizar os oxidantes, inibir o dano oxidativo e regular os fatores de transcrição envolvidos nas reações redox e de eliminação. Portanto, a função antioxidante endógena é um sistema de defesa fundamental para preservar o equilíbrio redox, visto que as células da pele são continuamente expostas a fontes ambientais indutoras da produção de ROS (MOUKETTE *et al.*, 2015; NICHOLS; KATIYAR, 2011; PANICH *et al.*, 2016; RAUT *et al.*, 2012).

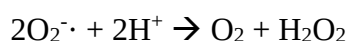
O sistema não enzimático é composto primordialmente (i) pela glutathiona (GSH), a qual é oxidada por espécies reativas de oxigênio, formando um dímero com outra GSH (GSSG); (ii) pelo ascorbato ou vitamina C, que atua removendo as espécies reativas, reparando a vitamina E oxidada, auxiliando na síntese de pró-colágeno e na reticulação do colágeno; (iii) pelo ubiquinol ou coenzima Q10, a qual elimina radicais intracelulares e extracelulares lipossolúveis, protegendo as mitocôndrias e as principais proteínas cutâneas, e inibe a expressão de algumas MMPs; e (iv) pelo α -tocoferol ou vitamina E, que está envolvido na estabilização da membrana, prevenindo a peroxidação lipídica e oxidação de ácidos graxos insaturados. Na pele, os níveis de vitamina E também diminuem com a idade, sugerindo que a deficiência em sua atividade antioxidante ocorre tanto no envelhecimento intrínseco quanto no extrínseco (KIM, 2016; MOUKETTE *et al.*, 2015; PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022; RAUT *et al.*, 2012).

Já o sistema enzimático é formado principalmente pela superóxido dismutase (SOD), que catalisa a quebra do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela catalase, que catalisa a reação de degradação do peróxido de hidrogênio, e pela glutathiona peroxidase (GPx), que reduz o peróxido de hidrogênio para interromper a cascata da peroxidação lipídica (KIM, 2016; MOUKETTE *et al.*, 2015; NICHOLS; KATIYAR, 2011; PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022; RAUT *et al.*, 2012).

Normalmente, 1 a 2% do oxigênio consumido pela célula é convertido em $O_2^{\cdot-}$ por vazamento de elétrons no complexo mitocondrial. O primeiro passo para proteção contra a oxidação no organismo é, portanto, eliminar o $O_2^{\cdot-}$, etapa realizada pela enzima SOD, presente no citoplasma e nas mitocôndrias, que converte o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual é menos tóxico do que outros radicais. No entanto o H_2O_2 também é uma ROS que pode causar danos às células da

derme, dessa forma, o próximo passo é a sua eliminação pela enzima catalase, encontrada no citoplasma e peroxissomas, ou GPx, presente no citoplasma e nas mitocôndrias (ANJUM *et al.*, 2016; IM *et al.*, 2016; KIM, 2016; MIAO; CLAIR, ST., 2009; MOUKETTE *et al.*, 2015; PANICH *et al.*, 2016; SÁRDY, 2009; ZHANG *et al.*, 2016).

Considerando o início da cadeia de produção de ROS, a SOD é considerada a principal enzima antioxidante que regula o estado redox do organismo, desmutando de forma extremamente rápida o radical $O_2^{\cdot -}$ da seguinte forma (MARKLUND; MARKLUND, 1974; PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2016):



Em mamíferos, a SOD é codificada por três genes distintos que dão origem a três isoformas de SOD diferentes que exercem funções similares e não sobrepostas. A cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD, codificada pelo gene *sod1*) localiza-se no citoplasma, núcleo e membrana mitocondrial, a manganês superóxido dismutase (MnSOD, codificada pelo gene *sod2*) localiza-se na mitocôndria, e a superóxido dismutase extracelular (ECSOD, codificada pelo gene *sod3*), que também se liga ao Cu/Zn, localiza-se principalmente no espaço extracelular (MIAO; CLAIR, ST., 2009; PAPACCIO *et al.*, 2022).

Estudos *in vivo* em camundongos evidenciaram que todas as três isoformas da SOD afetam o envelhecimento da pele. Em modelos animais, a deleção de MnSOD corresponde aos fenótipos com envelhecimento mais evidente, com epiderme mais fina, atrofia do tecido conjuntivo dérmico, complexidade reduzida da rede de fibras extracelulares e uma quantidade menor de tecido adiposo subcutâneo. Dessa forma, a regulação da SOD, tanto em nível de expressão como de atividade, desempenha um papel fundamental no equilíbrio redox da pele (MIAO; CLAIR, ST., 2009; PAPACCIO *et al.*, 2022; PÉREZ *et al.*, 2009).

Após a SOD converter o radical $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , esse será neutralizado por meio da transformação em H_2O através de quatro vias (ZHANG, Jing *et al.*, 2016):

- 1) catalase: converte H_2O_2 diretamente em O_2 (ANJUM *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016);
- 2) glutathione peroxidase: converte H_2O_2 em H_2O por GPx e glutathione reductase usando GSH como redutor (ZHANG, Jing *et al.*, 2016);
- 3) ciclo água-água: converte H_2O_2 em H_2O usando ascorbato (AsA) como um redutor catalisado pela ascorbato peroxidase (APx) (ZHANG, Jing *et al.*, 2016);
- 4) o ciclo ascorbato-glutathione: converte H_2O_2 em H_2O usando uma sequência de reduções, utilizando AsA e GSH (ANJUM *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

Dentre as quatro vias, a catalase é uma enzima antioxidante importante na defesa celular contra o estresse oxidativo, pois elimina altos níveis de H_2O_2 produzido pela SOD, produzindo H_2O e O_2 (IM *et al.*, 2016; KIM, 2016; MOUKETTE *et al.*, 2015; PÉREZ *et al.*, 2009).

Em células normais, os sistemas de defesa antioxidantes, incluindo SOD e catalase atuam para extinguir as ROS (CHEN *et al.*, 2015; KIM, 2016). Entretanto, a capacidade antioxidante endógena (enzimática e não enzimática) da pele diminui com a idade, e a pele envelhecida fica mais vulnerável a fatores externos, especialmente à radiação UV. Além disso, o efeito promelanogênico da radiação solar promove a formação de espécies reativas relacionadas à via biossintética da melanina na junção derme-epidérmica. Particularmente, em indivíduos de pele clara, a feomelanina é responsável pela geração de espécies reativas nos melanócitos mesmo na ausência de radiação UV (PAPACCIO *et al.*, 2022).

O excesso de exposição à radiação UV supera a capacidade antioxidante do organismo ou diminui a funcionalidade do sistema de reparo, quebrando o equilíbrio dinâmico entre oxidação e sistemas antioxidantes na pele e reduzindo sua capacidade de remover ROS. Diante disso, as ROS aumentam e se acumulam no corpo, causando a ativação anormal de vias de sinalização, como NF- κ B, afetando o potencial de membrana mitocondrial e induzindo ao dano ao DNA mitocondrial (mtDNA) e apoptose celular (DAS; KUMAR; RAO, 2015; GENG *et al.*, 2021; MIAO; CLAIR, ST., 2009; PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022). Além disso, as ROS também podem ativar a via MAPK/AP-1 e estimular a expressão de MMPs, promovendo a degradação do colágeno, ocorrendo, assim, danos a lipídeos, a proteínas e ao DNA, os quais podem ser passados às células-filha, resultando no fotoenvelhecimento da pele ou, até mesmo, no câncer. Portanto, embora em quantidades controladas as ROS ajudem o organismo, seu excesso e produção fora do controle podem comprometer os tecidos e predispor a vários estados de doença (CHATATIKUN; CHIABCHALARD, 2017; DAS; KUMAR; RAO, 2015; GAO *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2021; KIM, 2016; MIAO; CLAIR, ST., 2009; PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022).

As ROS podem ativar certos receptores de superfície celular, incluindo aqueles para fator de crescimento epidérmico (EGF), IL-1 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). O acúmulo de ROS desregula as vias de sinalização celular, altera a liberação de citocinas e leva à inflamação, ativando proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fatores de transcrição, como NF- κ B, fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), c-Jun-N-terminal quinase (JNK) e AP-1, o que leva à síntese de óxido nítrico sintetase e ciclo-oxigenase (COX). Essas enzimas inflamatórias causam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8 e

TNF- α , em células fibroblásticas dérmicas humanas normais (BOCHEVA *et al.*, 2022; GENG *et al.*, 2021; SÁRDY, 2009).

A exposição da pele aos raios UVB estimula respostas inflamatórias por meio da regulação positiva de fatores de transcrição, os níveis de AP-1 e NF- κ B são elevados dentro de horas após a exposição à baixa dose de UVB, aumentando a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. A IL-1 β pode ativar a via MAPK sob irradiação UV, aumentando a MMP-1 em fibroblastos da pele humana (BOCHEVA *et al.*, 2022; GENG *et al.*, 2021; IM *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022).

A regulação positiva de AP-1 suprime os receptores do fator de transformação do crescimento β (TGF- β), que bloqueia ainda mais a síntese de pró-colágeno (BOCHEVA *et al.*, 2022; GAO *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2021; SÁRDY, 2009). Além disso, o AP-1 ativado estimula a degradação do colágeno, pois aumenta diretamente a expressão de MMP 1, 3 e 9 em fibroblastos e queratinócitos, e, indiretamente, inibe a produção de pró-colágeno tipo I e III, bloqueando o receptor TGF- β , que é responsável pela produção de colágeno tipo I (BOCHEVA *et al.*, 2022; GAO *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2021; PAPACCIO *et al.*, 2022; SÁRDY, 2009). Além disso, o AP-1 desencadeia o principal ativador da resposta inflamatória, o NF- κ B. As vias do NF- κ B estão envolvidas na regulação da homeostase tecidual e do envelhecimento. A ativação de NF- κ B, desencadeada por ROS, conduz a uma elevação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e MMPs, diminui a síntese de TGF- β e colágeno tipo I, e induz a infiltração de células inflamatórias (principalmente neutrófilos), que leva à expressão e ativação de outras MMPs. Dessa forma, tanto o NF- κ B quanto o AP-1 contribuem para a formação de rugas e inflamação, e desempenham papéis cruciais no envelhecimento precoce da pele (BOCHEVA *et al.*, 2022; PAPACCIO *et al.*, 2022; SÁRDY, 2009).

1.3 Metaloproteinase de matriz (MMP)

Quando uma célula entra em um estado senescente, ela libera várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e proteinases, como MMPs. Esse processo induz a senescência das células-alvo e altera o microambiente de seus tecidos regionais. Em fibroblastos e melanócitos senescentes, a síntese de colágeno diminui e os níveis de MMP aumentam naturalmente na pele humana, e as principais moléculas envolvidas nesse processo são IL-6, IL-8, MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9. Essas alterações podem causar mudanças na pele, como enrugamento e perda de elasticidade (KIM, J. C.; PARK; KANG, 2022; PARK; SIM; KIM, 2017; SONG *et al.*, 2016).

As MMPs constituem uma família de enzimas endopeptidases presentes em todos os organismos, incluindo bactérias, que requerem íons metálicos, como Ca^{2+} ou Zn^{2+} , para sua atividade. No corpo humano, uma ampla variedade de MMPs pode ser expressa por todas as células. No entanto, fontes importantes de MMPs incluem fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células inflamatórias. Essas células liberam as MMPs em resposta a diversos estímulos, como estresse oxidativo, citocinas e radiação ultravioleta (GENG *et al.*, 2021; HAM *et al.*, 2013; SÁRDY, 2009). Elas têm uma estrutura semelhante e são geralmente compostas por cinco domínios estruturais, incluindo uma sequência hidrofóbica de peptídeo sinal, uma região pró-peptídica que mantém o zimogênio estável, uma região cataliticamente ativa contendo um sítio de ligação, uma região de dobradiça rica em prolina e uma região carboxi terminal relacionada com a especificidade do substrato às enzimas. Entre elas, a região cataliticamente ativa e a região pró-peptídica são altamente conservadas, enquanto os demais domínios têm suas próprias características (GENG *et al.*, 2021; SÁRDY, 2009). Dessa forma, as especificidades do substrato se sobrepõem amplamente entre membros de diferentes subgrupos e, sendo assim, uma MMP pode degradar vários componentes da MEC. Já foram isolados e identificados vinte e oito membros da família MMP humana, que são divididos em cinco subgrupos com base em sua estrutura, preferência de substrato e localização subcelular: 1) Colagenases, MMP-1, MMP-8 e MMP-13, degradam os principais tipos de colágeno fibrilares, colágenos tipo I, II, III, IV, VII, IX, X e XIV, além de gelatinas, agregana, proteína de ligação, entactina, tenascina, perlecana, fibronectina, osteonectina e laminina; 2) Gelatinases, MMP-2 e MMP-9, degradam colágeno tipo III, IV, V, VII, X e XI, gelatina, fibronectina, elastina, laminina, proteína de ligação, agregana, entactina e vitronectina; 3) Estromelisinases, MMP-3, MMP-10 e MMP-11, não podem quebrar o colágeno tipo I, podem quebrar, proteoglicanos, colágenos tipo III, IV, V, IX, X e XI e procolágeno, estromelina 1 (MMP-3), proteína de ligação da somatomedina, agregana, decorina, gelatinas, fibronectina, laminina, além de pró-MMP-1, pró-MMP-7, pró-MMP-8, pró-MMP-9 e pró-MMP-13; 4) Matrilisinases, MMP-7 e MMP-26, que degradam o colágeno tipo IV, mas não o colágeno tipo I, e também degradam fibronectina, gelatina, vitronectina, agregana, laminina, elastina, entactina, tenascina, decorina e proteína de ligação, além da pró-MMP-9; 5) MMPs do tipo membrana (MMP-14, MMP-15 e MMP-16): que podem degradar o colágeno tipo I, II e III, gelatina, agregana, fibronectina, laminina, tenascina, fibrina, entactinas, perlecana, além de pró-MMP-2 e pró-MMP-13 (GAO *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2021; HAM *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2017; JEON *et al.*, 2015; LAHMANN *et al.*, 2001; PARK; SIM; KIM, 2017; SÁRDY, 2009; SHIMODA, 2019).

Sabe-se que as MMPs têm vários papéis fundamentais na remodelação dinâmica da MEC, a sua função coordenada de degradação de componentes da MEC é transiente e crítica para processos biológicos normais, como angiogênese, reparação tecidual, bem como em vários aspectos da carcinogênese, e, dessa forma, sua atividade é cuidadosamente regulada (LAHMANN *et al.*, 2001; OH *et al.*, 2004; SÁRDY, 2009; SHIMODA, 2019). As MMPs são inicialmente sintetizadas como precursores inativos. Após a transcrição, sua ativação ocorre através da clivagem proteolítica do pró-peptídeo contendo cisteína, resultando no livre acesso de moléculas de água e substratos ao íon catalítico Zn^{2+} . A ativação pode ocorrer tanto dentro da vesícula secretora quanto extracelularmente (SÁRDY, 2009). O controle de sua atividade é, assim, regulado pela taxa na qual as pró-enzimas são convertidas em forma catalítica e por uma família de inibidores específicos, denominados inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Os TIMPs inibem diretamente a atividade proteolítica das MMPs e compreendem uma família de quatro inibidores de proteases: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP -4. Todos formam complexos fisiologicamente irreversíveis 1:1 com as MMPs (GAO *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2017; JEON *et al.*, 2015; LAHMANN *et al.*, 2001; OH *et al.*, 2004; PARK; SIM; KIM, 2017; SÁRDY, 2009).

Tanto no envelhecimento extrínseco quanto no intrínseco, foram demonstrados níveis elevados e aumento da atividade de MMPs cutâneas. Entretanto, no envelhecimento extrínseco, esse curso lento pode ser acelerado enzimaticamente de décadas a horas pelas MMPs, ao longo do tempo, a indução repetida de MMPs pela exposição à radiação solar é provavelmente responsável pelo aumento da fragmentação do colágeno encontrada na pele danificada pelo sol, além da perda de equilíbrio entre TIMP, que tem a expressão reduzida em fibroblastos senescentes, e MMPs, o que pode contribuir para o desenvolvimento de rugas, perda de elasticidade e dilatação de pequenos capilares da camada superficial da pele (BOCHEVA *et al.*, 2022; HAM *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2017; KAMMEYER; LUITEN, 2015; PARK; SIM; KIM, 2017; SÁRDY, 2009).

As MMPs são consideradas os principais reguladores do fotoenvelhecimento, visto que a destruição do colágeno mediada por MMP é a principal causa do dano ao tecido conjuntivo que ocorre no fotoenvelhecimento, e elas são super expressas em fibroblastos humanos expostos à radiação UV (BOCHEVA *et al.*, 2022; BRIGANTI *et al.*, 2014; CHIANG *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2022; GAO *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2021; HAM *et al.*, 2013; JEON *et al.*, 2015; NAM *et al.*, 2017; OH *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2011). UVA e UVB estimulam a síntese e ativação de MMPs, que desempenham um papel importante nas intensas alterações subjacentes ao fotodano da MEC dérmica no fotoenvelhecimento e na

fotocarcinogênese, podendo degradar quase todos os componentes da MECs, como colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicano (BOCHEVA *et al.*, 2022; BRIGANTI *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2022; SÁRDY, 2009; SONG *et al.*, 2016). UVA e UVB também induzem o aumento da síntese e secreção de IL-6, que aumenta os níveis de MMP-1 e MMP-3, as quais são responsáveis pela degradação do colágeno intersticial e dos proteoglicanos e, assim, contribuem para danos à derme (GAO *et al.*, 2018; NAM *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2016). Além disso, as ROS induzidas por UVB são vitais para a regulação do metabolismo do colágeno, e podem levar ao aumento da expressão de MMPs na pele humana através da ativação da via da MAPK/AP-1. AP-1 é um fator de transcrição nuclear composto por c-jun e c-fos, que se liga à região promotora dos genes das MMPs para induzir a transcrição gênica, estimulando a degradação do colágeno e desencadeando a ativação da resposta inflamatória através do NF- κ B. Isso conduz a uma elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e MMPs, e diminui a síntese de TGF- β e colágeno tipo I em fibroblastos dérmicos (BOCHEVA *et al.*, 2022; BRIGANTI *et al.*, 2014; CHIANG *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2022; GAO *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2021; HAM *et al.*, 2013; JEON *et al.*, 2015; NAM *et al.*, 2017; OH *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2011).

Entre as MMPs, a radiação UV aumenta significativamente a expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9, e o efeito combinado delas pode degradar a maioria das proteínas da derme (tanto colágenas quanto não colágenas). Assim, a indução de MMPs, com consequente desintegração estrutural da MEC da pele, pode ser o principal mecanismo mediador do fotoenvelhecimento cutâneo (GAO *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2021; SÁRDY, 2009).

Além da radiação UV, a luz infravermelha (IR) gera calor, o que aumenta significativamente a temperatura da pele humana, e a exposição ao calor é amplamente considerada como um importante estímulo extracelular (NAM *et al.*, 2017). O calor está envolvido em processos de envelhecimento prematuro da pele, que induzem o aumento na expressão de MMP-1 e MMP-3 e, ainda, tem sido investigado o efeito da exposição ao calor na expressão da IL-6, que também regula a expressão de MMP-1 e MMP-3 de forma autócrina (NAM *et al.*, 2017). Portanto, acredita-se que a radiação UVA e UVB, e o calor gerado pela IR, estimulem a expressão de MMP-1 e MMP-3 indiretamente por meio da indução da expressão de IL-6 (NAM *et al.*, 2017).

A MMP-1 tem um papel primário na maioria dos danos ao colágeno na pele fotoenvelhecida, ela inibe o pró-colágeno, degrada o colágeno tipo II e é a única enzima capaz, após ativação, de iniciar a clivagem da tripla hélice do colágeno das duas principais moléculas

formadoras de fibrilas da pele, os colágenos tipo I (85-90% do colágeno dérmico) e tipo III. Assim, a MMP-1 serve como um importante regulador no fotoenvelhecimento (BOCHEVA *et al.*, 2022; CHIANG *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2022; GENG *et al.*, 2021; NAM *et al.*, 2017; PARK; SIM; KIM, 2017; SÁRDY, 2009; SONG *et al.*, 2016).

A atividade da MMP-1 é controlada por inibidores endógenos, como o TIMP-1, que formam complexos covalentes 1:1 com as MMPs nos espaços extracelular ou pericelular. O equilíbrio na expressão de MMP-1 pela TIMP-1 é, portanto, importante para regular a degeneração da MEC (BOCHEVA *et al.*, 2022; NAM *et al.*, 2017; PARK; SIM; KIM, 2017; SONG *et al.*, 2016).

A MMP-2 é uma importante enzima da família das MMP, e tem vários papéis essenciais no processo de fotoenvelhecimento da pele. Acredita-se que a MMP-2 desempenhe um papel importante na degradação final dos colágenos fibrilares após sua clivagem inicial pela MMP-1, além de degradar o colágeno tipo IV, um componente chave da membrana basal. A MMP-2 é uma endopeptidase secretada e pode hidrolisar vários componentes da MEC (PARK, M. A.; SIM; KIM, 2017).

A MMP-3 degrada o colágeno tipo I, III, IV e V, somente após a iniciação pela MMP-1, proteoglicanos, fibronectina, elastina e ativa a pró-MMP-1 e outros membros da família das MMPs (CHIANG *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2022; GENG *et al.*, 2021; SÁRDY, 2009).

A MMP-9 degrada ainda mais os fragmentos de colágeno produzidos pela MMP-1 e elastina (CHIANG *et al.*, 2012; GENG *et al.*, 2021; SÁRDY, 2009).

Um fator interessante é que a indução de MMP mostra-se fortemente dependente do tipo de pele, a irradiação de indivíduos com pele de pigmentação escura resulta em apenas modesta ou pouca indução de MMP (SÁRDY, 2009).

Outro fator relevante em relação à expressão das MMPs é que enquanto as TIMPs regulam sua atividade, a família de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) regula sua função e expressão via NF- κ B e AP-1, modulando, assim, o equilíbrio entre a atividade de MMP e a expressão de colágeno para manter a homeostase da pele (BRIGANTI *et al.*, 2014; JEON *et al.*, 2015).

1.4 Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) são membros da superfamília de receptores nucleares e são ativados por ligantes, requerendo a

heterodimerização com o receptor retinoide X (RXR) para permitir a ligação ao elemento de resposta do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPRE) e, assim, a atividade transcricional, ou seja, induzir a expressão ou repressão dos genes responsivos ao PPAR. Eles atuam controlando a função e a expressão de redes gênicas complexas, especialmente envolvidas no metabolismo da glicose, lipídeos e colesterol, na homeostase energética, na inflamação, na proliferação e diferenciação celular, na aterosclerose e na atividade antioxidante. Também são descritos efeitos não genômicos como modulação de outras proteínas. Dessa forma, são expressos em uma variedade de tecidos, como fígado, músculos, adipócitos e pele (BRIGANTI *et al.*, 2014; CHOI, 2020; CHONG *et al.*, 2009; DI-POÏ *et al.*, 2004; FLORI *et al.*, 2017; JEON *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2015; KONGER *et al.*, 2017; MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; SHIN *et al.*, 2016).

Três isoformas de PPAR já foram identificadas até o momento em mamíferos, PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . Essas compartilham alto grau de homologia estrutural, mas diferem em seus papéis funcionais, expressão tecidual e possuem seletividade e capacidade de resposta a ligantes específicos. Todas as isoformas são expressas na pele humana e seus ligantes demonstraram regular importantes funções celulares, como proliferação e diferenciação celular, respostas anti-inflamatórias, equilíbrio entre a atividade de MMP e a expressão de colágeno para manter a homeostase da pele (BRIGANTI *et al.*, 2014; CHOI, 2020; DI-POÏ *et al.*, 2004; FLORI *et al.*, 2017; JEON *et al.*, 2015; KIM, B.; CHOI; KIM, 2014; KONGER *et al.*, 2017; MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; SHIN *et al.*, 2016).

O PPAR β/δ modula múltiplas funções biológicas como atuação no desenvolvimento embrionário, tumorigênese do cólon, catabolismo de gordura e diferenciação de oligodendrócitos. Ele é expresso de forma abundante e ubíqua em uma variedade de linhagens celulares e, entre as três isoformas de PPAR identificadas, é a isoforma predominante na pele, tendo sido implicado em diversos aspectos de sua fisiologia e homeostase (DI-POÏ *et al.*, 2004; HAM *et al.*, 2013; JUNG *et al.*, 2015).

Em relação à atividade na pele, sabe-se que o PPAR β/δ exerce efeitos antitumorigênicos, regulando a diferenciação e proliferação na pele, e é um mediador chave dos aspectos epidérmicos e dérmicos do processo de cicatrização de feridas, através da indução de colágeno e fibronectina de forma dependente ou independente de TGF- β . Além disso, previne a degradação do colágeno tipo I e III, e a secreção de MMP-1 ao inibir a geração de ROS em fibroblastos da pele humana induzida por UVB, e regular positivamente TGF- β , induzindo a expressão de genes relacionados à regulação da MEC (DI-POÏ *et al.*, 2004; HAM *et al.*, 2013; JUNG *et al.*, 2015).

Embora o PPAR β/δ seja o isotipo predominante encontrado na pele, o PPAR α também é expresso na pele, assim como em vários tecidos como fígado, tecido adiposo marrom, coração e rim. Ele tem papel importante na oxidação de ácidos graxos, metabolismo de lipídios e lipoproteínas, síntese de ureia, respostas inflamatórias e estresse oxidativo da epiderme (DI-POÏ *et al.*, 2004; KIM, B.; CHOI; KIM, 2014; SHIN *et al.*, 2016).

A expressão de PPAR α é importante para a manutenção do balanço redox celular, visto que regula a expressão de SOD e a atividade da catalase. Além disso, inibe a expressão de MMPs, IL-6 e IL-8 via AP-1 e NF- κ B por seus efeitos anti-inflamatórios e antienvelhecimento (SHIN *et al.*, 2016).

O PPAR γ desempenha um amplo papel em vários tecidos e órgãos importantes, como rins, fígado, cérebro, sistema cardiovascular e pele, visto que sua ativação regula o metabolismo da glicose e lipídios em várias células. Na epiderme, o PPAR γ tem papel essencial no controle da diferenciação celular, pigmentação, síntese lipídica epidérmica, homeostase da barreira de permeabilidade e contenção da inflamação. O PPAR γ regula negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios por meio da antagonização dos fatores de transcrição inflamatórios NF- κ B e AP-1, e contenção dos danos causados pelo estresse oxidativo, restaurando a estrutura e a função das mitocôndrias que são estrutural e funcionalmente prejudicadas pelo estresse oxidativo excessivo. Além disso, já foi relatado que o PPAR γ regula diretamente a expressão da catalase *in vivo* (BRIGANTI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; CHOI, 2020; FLORI *et al.*, 2017; KONGER *et al.*, 2017; SHEN *et al.*, 2018).

O PPAR α e γ têm sido investigados em pesquisas sobre envelhecimento, uma vez que inibem a expressão de genes inflamatórios, como citocinas, MMPs e proteínas de fase aguda. Além disso, ambos modulam as vias sensíveis ao estresse oxidativo, a expressão de AP-1 e sinalização do NF- κ B (CHEN *et al.*, 2015; CHOI, 2020; KIM *et al.*, 2012).

Estratégias que podem efetivamente retardar e prevenir o fotoenvelhecimento da pele e outras doenças da pele devido aos efeitos deletérios da radiação UV são de importância clínica. Assim, preparações de produtos ou compostos naturais com a capacidade de estimular a síntese de colágeno, elevar os níveis das proteínas da MEC ou inibir as principais enzimas degradadoras de colágeno, ou seja, MMPs, podem representar uma estratégia para prevenir o fotodano iniciado por UV causado por uma cascata complexa de reações bioquímicas na pele (CHIANG *et al.*, 2012; GENG *et al.*, 2021; HAM *et al.*, 2013; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021; WEN *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2020).

Várias moléculas sintéticas ou semissintéticas têm sido usadas como agentes antifotoenvelhecimento, por exemplo, retinoides, α -hidroxiácidos, 5-fluorouracil

(MUKHERJEE *et al.*, 2006; POON; KANG; CHIEN, 2015; SCHEINBERG, 1994; ZHOU *et al.*, 2020). No entanto, essas moléculas têm uso limitado devido à sua instabilidade e potencial toxicidade, como eritema, descamação, prurido, sensação de queimação nos locais de aplicação, assim como risco de queimaduras graves quando da superexposição aos α -hidroxiácidos usados em *peelings*, e teratogenicidade/embriotoxicidade nos casos dos retinoides devido à exposição sistêmica (MUKHERJEE *et al.*, 2006; POON; KANG; CHIEN, 2015; SCHEINBERG, 1994).

Dessa forma, a busca por tratamentos menos tóxicos torna-se crescente. Considerando que a ativação dos PPARs produz efeitos anti-inflamatórios, antiaterogênicos e antioxidantes, já que todos os isotipos de PPARs (PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ) reduzem a inflamação, aceleram a diferenciação epidérmica, inibem a proliferação epidérmica e aumentam a função de barreira da pele, os agonistas de PPARs podem ser alvos moleculares importantes no tratamento do fotoenvelhecimento (CHEN *et al.*, 2015; JEON, H. *et al.*, 2016; MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

1.5 GQ-19

Devido ao papel significativo do PPAR γ em diversas doenças e sabendo que inibe a expressão gênica de genes pró-inflamatórios como NF- κ B e AP-1, MMPs e regula a expressão de catalase, contribuindo para a contenção dos danos causados à pele pelo estresse oxidativo, além de ser expresso em toda a pele e na maioria dos tipos de células da pele, a identificação de agonistas de PPAR γ para a prevenção ou controle do fotoenvelhecimento torna-se alvo potencial (BRIGANTI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; CHOI, 2020; FLORI *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2012; KONGER *et al.*, 2017; SHEN *et al.*, 2018; WU; GUO; WU, 2020).

Os ligantes sintéticos de PPAR γ conhecidos como glitazonas ou tiazolidinedionas são agonistas totais de PPAR γ bem conhecidos por sua excelente potência na regulação dos níveis de glicose no sangue e sensibilidade à insulina, sendo parte da classe de antidiabéticos orais (CHOI, 2020; WU; GUO; WU, 2020).

A ciglitazona foi o primeiro composto ativo da classe das tiazolidinadionas a ser sintetizado com o objetivo de atuar como agonista de PPAR γ , dados sobre este fármaco datam de 1982, e é um potente agonista de PPAR γ (MOURÃO *et al.*, 2005; MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; VIEIRA, 2004). Entretanto, apresentou efeito clínico fraco, o que levou a busca de novos derivados da classe (MOURÃO *et al.*, 2005; VIEIRA, 2004). Em 1997, a troglitazona foi lançada no mercado, mas teve de ser retirada dos EUA em março de 2000 devido a uma

insuficiência hepática idiossincrática. Dessa forma, surgiram novas tiazolidinadionas como a pioglitazona e rosiglitazona, todas potentes agonistas de PPAR γ e com efeitos protetores em doenças inflamatórias da pele, como dermatite atópica e psoríase (CHEN *et al.*, 2015; CHOI, 2020; MOURÃO *et al.*, 2005; MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; VIEIRA, 2004).

Entretanto, os efeitos adversos, como retenção hídrica, ganho de peso, hipertrofia cardíaca, perda óssea, hepatotoxicidade, têm limitado o uso clínico das tiazolidinadionas (COELHO *et al.*, 2016; WU; GUO; WU, 2020). Assim, a busca por medicamentos com função clínica semelhante, mas com menos efeitos colaterais, tornou-se uma nova linha de pesquisa (WU, L.; GUO; WU, 2020).

Na busca de agentes que possam ter ação agonista de PPAR γ e com menos efeitos tóxicos, foram sintetizados compostos candidatos a agonistas parciais do PPAR γ , com o intuito de reter a atividade de sensibilização à insulina dos agonistas totais, e não induzir ao ganho de peso, retenção de líquidos e perda óssea (COELHO *et al.*, 2016). Assim surgiu o GQ-19, um composto sintético derivado da tiazolidinadiona ou glitazona, sintetizado na Universidade Federal de Pernambuco, cuja fórmula molecular é 3-(4-metil-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (Figura 1) (PADILHA, 2017; VIEIRA, 2004).

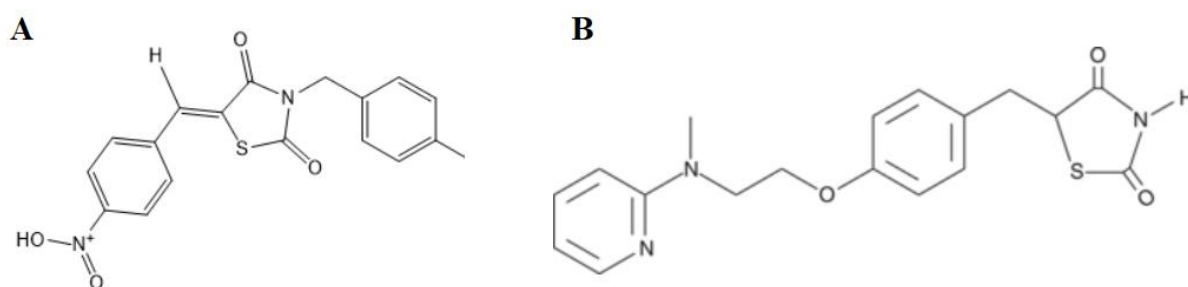


Figura 1. Estruturas químicas do GQ-19 (A) e da rosiglitazona (B).

Estruturas extraídas de PADILHA, 2017 e do site da Cayman Chemical (acesso por <https://www.caymanchem.com>).

1.6 Microrganismos Endofíticos

Durante séculos, as plantas serviram como fonte de compostos bioativos medicinais contra muitas formas de doenças e continuam a desempenhar um papel importante na atenção primária à saúde de cerca de 80% dos habitantes do mundo (AGRAWAL; PANDEY, 2009; DEMENI *et al.*, 2021). Entretanto, nos últimos anos, os microrganismos associados às plantas, além das próprias plantas, ofereceram produtos com alto potencial terapêutico (AGRAWAL; PANDEY, 2009; DEMENI *et al.*, 2021).

Mais recentemente, os cientistas começaram a compreender que as plantas podem ser reservatórios de uma infinidade de microrganismos (UZMA *et al.*, 2018). Em 1866, de Bary

introduziu o termo “endófito” (HRIDOY *et al.*, 2022; KUMAR *et al.*, 2014). Todos os microrganismos (bactérias e fungos) que habitam em uma associação simbiótica nos tecidos internos da planta, sem causar efeitos prejudiciais imediatos ou evidentes, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, podem ser considerados endófitos (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; HRIDOY *et al.*, 2022; HUANG, W. Y. *et al.*, 2007; LIU, X. *et al.*, 2021; TAN; ZOU, 2001; UZMA *et al.*, 2018). Seu papel é melhorar o acesso da planta aos nutrientes e produzir substâncias especiais, principalmente metabólitos secundários e enzimas que são responsáveis pela adaptação da planta ao estresse abiótico (alta temperatura e salinidade, seca, toxicidade de metais e efeitos nocivos da luz), bem como a fatores bióticos (herbívoros, insetos, nematoides e patógenos). A interação entre plantas e endófitos é regulada por genes de ambos os organismos e controlada por fatores ambientais (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; DEMENI *et al.*, 2021; HRIDOY *et al.*, 2022; LIU, X. *et al.*, 2021; UZMA *et al.*, 2018; WAQAS *et al.*, 2012). A sobrevivência e o desenvolvimento da planta são muitas vezes inseparáveis da participação de tais endófitos (LIU, X. *et al.*, 2021; TAN; ZOU, 2001).

A relação entre endófitos e suas plantas hospedeiras é de natureza mutualística, resultando em um benefício de sobrevivência para ambos os parceiros, os endófitos são alimentados por macro e micronutrientes mais elevados, como fósforo, enxofre, cálcio, magnésio e potássio, e protegidos pela planta hospedeira e, em troca, esses microrganismos produzem metabólitos secundários bioativos, potencializando o crescimento da planta hospedeira e protegendo-a de patógenos e herbívoros (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; FATIMA *et al.*, 2016; HRIDOY *et al.*, 2022; NATH; RAGHUNATHA; JOSHI, 2012; WAQAS *et al.*, 2012).

Ao longo do extenso processo de coevolução entre endófitos e as plantas hospedeiras, esses microrganismos se ajustaram aos seus microambientes únicos por meio de variações genéticas, inclusive incorporando certas sequências de DNA vegetal em seus próprios genomas. (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; DEMENI *et al.*, 2021; TAN; ZOU, 2001). Isso pode ter levado à capacidade de certos endófitos de produzir compostos biologicamente ativos semelhantes ou idênticos às suas plantas hospedeiras (LIU, X. *et al.*, 2021; LIU, Y. *et al.*, 2016; UZMA *et al.*, 2018). É razoável postular que as propriedades medicinais dessas plantas podem ser devidas aos endófitos que residem nelas, os metabólitos secundários isolados de endófitos têm um amplo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo atividades anticancerígenas, antivirais, antibacterianas, antifúngicas, inseticidas, antidiabéticas, imunossupressoras, bem como antioxidantes (DEMENI *et al.*, 2021; FATIMA *et al.*, 2016; HRIDOY *et al.*, 2022; HUANG, W. Y. *et al.*, 2007; LIU, X. *et al.*, 2021; LIU, Y. *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016; UZMA

et al., 2018). Diante disso, este grupo de microrganismos tem atraído grande atenção dos pesquisadores desde que o isolamento, cultura, purificação e caracterização destes microrganismos revelou a presença de centenas de importantes e diversas classes químicas de compostos como alcaloides, benzopirranonas, quinonas, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides, terpenoides, tetralonas, saponinas, xantonas, aminas, peptídeos e polifenóis (DEMENI *et al.*, 2021; FATIMA *et al.*, 2016; HRIDOY *et al.*, 2022; HUANG, W. Y. *et al.*, 2007; LIU, X. *et al.*, 2021; LIU, Y. *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016; UZMA *et al.*, 2018).

Endófitos bacterianos e fúngicos profundamente envolvidos na fisiologia e metabolismo das plantas hospedeiras podem ser encontrados em quase todas as espécies de plantas vasculares estudadas até o momento, principalmente nas folhas, caules e raízes. Aproximadamente um milhão de espécies endofíticas estão presentes no reino vegetal, a população endofítica de uma determinada espécie varia de várias a algumas centenas de cepas bacterianas e fúngicas, entre elas, pelo menos uma espécie apresentando especificidade de hospedeiro (CHAPLA *et al.*, 2014; CUI, J. L. *et al.*, 2015; DEMENI *et al.*, 2021; FATIMA *et al.*, 2016; LIU, X. *et al.*, 2021; TAN; ZOU, 2001).

Dos microrganismos endofíticos, os fungos foram os mais isolados, 51% dos compostos recém-descobertos com atividade farmacológica foram encontrados em fungos endofíticos, sendo fontes promissoras de produtos biologicamente ativos com atividades antioxidantes, imunossupressoras, antiproliferativas, anticancerígenas, antimaláricas, antimicóticas, anti-inflamatórias e antibacterianas (CUI, J. L. *et al.*, 2015; DEMENI *et al.*, 2021; LIU, X. *et al.*, 2021; NATH; RAGHUNATHA; JOSHI, 2012).

Eles também estão profundamente envolvidos na fisiologia e metabolismo das plantas, incluindo troca de genes, indução de sinal, compartilhamento de elementos com as plantas, promovendo seu crescimento, aumentando sua adaptabilidade e aumentando sua tolerância a estresses abióticos e bióticos (LIU, X. *et al.*, 2021; TAN; ZOU, 2001; WAQAS *et al.*, 2012; ZHANG, J. *et al.*, 2022).

Além disso, metabólitos secundários fúngicos podem estar envolvidos na regulação da expressão de genes de plantas, modulando a atividade e direção de vias metabólicas ramificadas e modificando metabólitos de plantas e sua produção. Com relação a este último, os endófitos fúngicos geralmente afetam a quantidade e a concentração de metabólitos acumulados nos tecidos das plantas. Em termos do nível de modificações metabólicas, os fungos endofíticos podem sintetizar ou decompor diretamente alguns metabólitos, ou seja, podem afetar a composição de metabólitos de plantas medicinais por meio de biotransformação. Os fungos endofíticos complementam a capacidade de biotransformação da planta hospedeira, ajudando

assim a resolver problemas na produção de compostos complexos e na decomposição de substâncias difíceis, como resíduos industriais e poluentes (LIU, X. *et al.*, 2021; TAN; ZOU, 2001; WAQAS *et al.*, 2012; ZHANG, J. *et al.*, 2022).

Os fungos endofíticos também podem aumentar a aptidão do hospedeiro e as habilidades competitivas, aumentando o sucesso da germinação e a taxa de crescimento por meio da evolução de vias bioquímicas para produzir hormônios de crescimento vegetal e citocininas, ou aumentar a absorção de elementos nutricionais pelo hospedeiro. As plantas infectadas por endófitos geralmente crescem mais rápido do que as não infectadas, assim como plantas hospedeiras sem associação com fungos endofíticos são devastadas pelas ondas de temperatura extrema, seca, salinidade e ataque de patógenos (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; LIU, X. *et al.*, 2021; TAN; ZOU, 2001; WAQAS *et al.*, 2012; ZHANG, J. *et al.*, 2022).

Várias transferências horizontais de genes ocorrem entre endófitos e suas plantas hospedeiras e lidam conjuntamente com estresses bióticos e abióticos, o que implica que existe preferência e seletividade entre plantas hospedeiras e seus parceiros fúngicos. A distribuição e a estrutura da comunidade de fungos endofíticos são influenciadas por fatores como antecedentes genéticos, idade e condições ambientais do hospedeiro, o que faz com que o perfil de endófitos possa ser mais diversificado em áreas tropicais (CUI, J. L. *et al.*, 2015; TAN; ZOU, 2001; ZHANG, J. *et al.*, 2022).

A maioria dos endófitos é transmitida horizontalmente para suas plantas hospedeiras por meio de esporos transportados pelo ar, entretanto, alguns endófitos também podem ser transmitidos verticalmente para as próximas gerações de plantas por meio de sementes. Uma vez dentro do tecido hospedeiro, eles assumem um estado quiescente (latente) durante toda a vida da planta hospedeira ou por um longo período de tempo, ou seja, até que as condições ambientais sejam favoráveis para o fungo ou o estado ontogenético do hospedeiro mude para a vantagem do fungo. Estudos mostraram que endófitos transmitidos verticalmente (sistêmicos), crescendo dentro de sementes, são mais propensos a serem mutualísticos, enquanto endófitos transmitidos horizontalmente (não sistêmicos), via esporos, tendem a ser mais antagonísticos ao hospedeiro (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011).

As ROS são subprodutos gerados de reações biológicas, que podem causar dano oxidativo a biomoléculas e desempenhar papéis vitais na morte celular programada e na sinalização de resposta ao estresse em conjunto com a produção de antioxidantes (CUI, J. L. *et al.*, 2015; HUANG, W. Y. *et al.*, 2007). As plantas medicinais contêm uma grande variedade de moléculas sequestradoras de radicais livres, como compostos fenólicos (por exemplo, ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanas, lignina, estilbenos e taninos), compostos

nitrogenados (por exemplo, alcaloides e aminas), vitaminas, terpenoides e outros metabólitos endógenos. Dessa forma, fungos endofíticos isolados dessas plantas podem produzir antioxidantes que podem interromper a reação em cadeia de ROS. Embora muitos aspectos da biologia e interrelação de endófitos com seus respectivos hospedeiros tenham sido amplamente investigados, novos produtos bioativos específicos e endófitos devem ser explorados a partir dessas plantas hospedeiras relacionadas com longa história de uso medicinal popular, o que pode ser notavelmente útil para direcionar a busca por ingredientes farmacêuticos ativos (CUI, J. L. *et al.*, 2015; HUANG, W. Y. *et al.*, 2007; ZHANG, J. *et al.*, 2022).

Além disso, os consumidores estão conscientes e exigem produtos mais naturais, verdes e ecologicamente corretos (PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021). A crescente demanda por produtos naturais antifotoenvelhecimento levou a uma série de trabalhos de pesquisa e inovação em agentes antifotoenvelhecimento derivados da natureza, vários extratos de plantas tradicionais têm efeitos bem conhecidos para proteção e cuidado da pele (LEE *et al.*, 2016; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021).

As árvores do cerrado brasileiro são fontes bem conhecidas de metabólitos secundários bioativos (CHAPLA *et al.*, 2014).

O gênero *Bauhinia* pertence à família Fabaceae/Leguminosae e inclui aproximadamente 350 espécies de arbustos, lianas e pequenas árvores que são facilmente reconhecidas por suas folhas bilobadas e inervação palmada. Esse gênero é amplamente distribuído em países da Ásia, América do Sul e África, tendo partes de suas plantas frequentemente usadas na medicina tradicional para infecções, inflamações e diabetes (AGRAWAL; PANDEY, 2009; BASHANDY *et al.*, 2020; GUL *et al.*, 2021; GUPTA; SINGH; TRIPATHI, 2020; SAYAGO *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2019).

A *Bauhinia variegata* Linn. é uma árvore de folha caduca de tamanho médio, comestível, encontrada em todas as zonas tropicais, especialmente em países asiáticos, africanos e sul-americanos, também conhecida como Kanchanara, Kachanar, Kovidara, Raktakanchan e Pata de Vaca, devido ao aspecto volumoso e bilobado das folhas, característica distintiva desse gênero (AGRAWAL; PANDEY, 2009; GUL *et al.*, 2021; GUPTA; SINGH; TRIPATHI, 2020; SAYAGO *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2019).

Ela apresenta uso na medicina tradicional contra várias doenças como lepra, hemorroidas, asma, úlcera, problemas hepáticos, picada de cobra, cicatrização de feridas, obesidade, estomatite, dispepsia, flatulência, inflamação, infecção e também é usada como tônico, adstringente e laxante. Especificamente, suas folhas têm diversas atividades farmacológicas relatadas, incluindo antioxidante, antidiabética, anti-inflamatória,

anticancerígena e nefroprotetora (AGRAWAL; PANDEY, 2009; BASHANDY *et al.*, 2020; MISHRA *et al.*, 2013; SAYAGO *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2019).

Estudos fitoquímicos dos caules, flores, folhas e sementes desta espécie levaram ao isolamento de vários flavonoides e compostos de ácidos graxos como ácido linolênico, ácido oleico, ácido esteárico, palmítico e mirístico. A triagem fitoquímica de suas folhas revelou terpenoides, flavonoides, taninos, saponinas, açúcares redutores e esteroides (AGRAWAL; PANDEY, 2009; BASHANDY *et al.*, 2020).

Estudos biológicos de extratos de *Bauhinia variegata* confirmaram a redução dos radicais livres por seus polifenóis e flavonoides (GUPTA; SINGH; TRIPATHI, 2020).

O levantamento da literatura sugere que, embora as partes da planta *B. variegata* tenham muitos usos medicinais, poucos estudos foram realizados para validar a alegação terapêutica de maneira científica, o que a torna de grande interesse para busca de fungos endofíticos com atividade antioxidante (SHARMA *et al.*, 2019).

A busca por agentes antioxidantes, agentes químicos e biológicos para diminuir o dano induzido pela radiação UV está cada vez maior (AZEVEDO MARTINS *et al.*, 2020; BOSCH *et al.*, 2015), assim como há uma preferência recente dos consumidores por produtos naturais (PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021). Entretanto, a administração de um agente natural nem sempre é livre de efeitos tóxicos (ODIEKA, A. E. *et al.*, 2022; OULTRAM *et al.*, 2021; ZHANG, J. *et al.*, 2022).

Com base nessas informações, este trabalho objetivou explorar a atividade quimioprotetora do fungo endofítico *Phomopsis* sp. extraído de folhas de *Bauhinia variegata* (MESQUITA *et al.*, 2022), e também do GQ-19, composto sintético agonista de PPAR, em cultura de fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação UVA.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade quimioprotetora da fração metanólica do extrato metanólico dos micélios do fungo endofítico *Phomopsis sp.* e do composto sintético GQ-19 em fibroblastos dérmicos humanos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar quantitativamente a influência do extrato e do GQ-19 na concentração de ROS intracelular em fibroblastos induzidos ao estresse oxidativo;
- Avaliar a influência do GQ-19 na atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase na cultura de fibroblastos induzidos ou não ao estresse oxidativo;
- Avaliar a capacidade de inibição da enzima collagenase pelo extrato do fungo endofítico e pelo GQ-19;
- Avaliar quantitativamente a influência do extrato e do GQ-19 na expressão gênica de MMP-1, MMP-2, MMP-3 e TIMP-1 nos fibroblastos induzidos ou não ao estresse oxidativo;
- Avaliar a influência do extrato e do GQ-19 nos níveis de IL-6 e IL-1 β na cultura de fibroblastos induzidos ou não ao estresse oxidativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção dos fungos, cultivo em cultura líquida submersa e produção do extrato bruto.

O fungo endofítico *Phomopsis sp.* previamente isolado de folhas da planta *Bauhinia variegata* foi utilizado para a realização deste estudo. Este foi mantido por repiques periódicos, a cada 7 dias, em ágar Sabouraud-dextrose (Himedia), incubado a 28°C e, em seguida, armazenado a 4°C. Para a produção do extrato, após a incubação, a massa micelial e os esporos do fungo produzidos em 5 tubos de ensaio foram inoculados em um Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio pré-fermentativo descrito por Jackson *et al.*, 1993, e incubados por 48 h com agitação orbital de 150 rpm a 28°C. Passado este período, a cultura foi transferida para um Erlenmeyer de 2000 mL contendo 1000 mL de meio fermentativo descrito por Jackson *et al.*, 1993, e mantida nas mesmas condições anteriores por 72 h (FREITAS PIRES *et al.*, 2022; JACKSON *et al.*, 1993; MESQUITA *et al.*, 2022).

A produção do extrato bruto foi realizada segundo método descrito em Freitas Pires *et al.*, 2022.

3.2. Fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto produzido foi fracionado por partição líquido-líquido conforme descrito em Freitas Pires *et al.*, 2022., para obtenção da fração metanólica utilizada nos experimentos.

3.3. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com o GQ-19

A citotoxicidade do GQ-19 foi avaliada de acordo com o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) (Sigma-Aldrich) (MOSMANN, 1983). Para isso, 1×10^4 células foram inoculadas em cada poço de uma placa de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações do GQ-19, 10^{-3} mol/L, 10^{-4} mol/L, 10^{-5} mol/L, 10^{-6} mol/L e 10^{-7} mol/L. As placas foram incubadas por 48 h em atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 95% e temperatura de 37°C. Após esse período o meio com tratamento foi retirado e 100 µL de DMEM (Sigma Aldrich) e 10 µL de MTT na concentração de 5 mg/mL foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada por 4 h nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, foram colocados 100 µL de solução reveladora de MTT (HCl 0,04 M em isopropanol) em cada poço

e a placa ficou sob agitação orbital por 30 min. Em seguida foi realizada a leitura da densidade óptica do meio reacional em leitor de microplacas (Beckman DTX 800) no comprimento de onda de 570 nm.

3.4. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da SOD foi medida pelo método bioquímico da xantina/xantina oxidase que gera $O_2^{\cdot-}$, e a redução de nitroazul de tetrazólio (NBT) foi utilizada como um indicador da produção de $O_2^{\cdot-}$. A enzima SOD compete com o NBT pelo $O_2^{\cdot-}$ e a porcentagem de inibição da redução de NBT indica a quantidade de SOD presente (WEYDERT; CULLEN, 2010). Para esse método 3×10^5 fibroblastos dérmicos foram inoculados em cada poço de uma placa de 6 poços com meio de cultura DMEM e soluções do GQ-19 nas concentrações de 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L ou 10^{-5} mol/L. Estas células foram incubadas por 48 h a 37°C e 5% CO_2 . Em seguida foram tratadas por 1 h com H_2O_2 (Sigma-Aldrich) na concentração de 300 $\mu\text{mol/L}$ e, passado esse período, o tratamento foi removido, 2 mL de meio DMEM foram colocados e as células foram incubadas novamente por 48 h nas mesmas condições descritas anteriormente. O meio foi então retirado e 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,8, contendo 0,1 mmol/L de EDTA (Vetec/Sigma-Aldrich), foi adicionado para recolher as células, as quais foram submetidas a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 0°C para obtenção do lisado celular. O meio reacional foi preparado utilizando-se 850 μL de solução de NBT (Sigma-Aldrich) 60 $\mu\text{mol/L}$ e xantina (Sigma-Aldrich) 100 $\mu\text{mol/L}$, 100 μL de lisado celular e, imediatamente antes da leitura, 50 μL da enzima xantina oxidase (Sigma-Aldrich) (0,025 U/mL) foram adicionados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu 06786) no modo cinético, por 5 minutos, com registro a cada 15 s, no comprimento de onda de 560 nm. A quantificação de proteínas do lisado celular foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) para normalização dos resultados obtidos.

3.5. Avaliação da atividade da enzima catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada através do monitoramento por espectrofotometria no comprimento de onda de 240 nm da taxa de decomposição do H_2O_2 (AEBI, 1984). Para a realização desse ensaio 3×10^5 fibroblastos dérmicos foram inoculados em cada poço de uma placa de 6 poços com meio de cultura DMEM e soluções do GQ-19 nas concentrações de 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L ou 10^{-5} mol/L. Estas células foram incubadas por 48 h

a 37°C e 5% CO₂. Em seguida foram tratadas por 1 h com H₂O₂ na concentração de 300 µmol/L e passado esse período o tratamento foi removido, 2 mL de meio DMEM foram colocados em cada poço e as células incubadas novamente por 48 h nas mesmas condições citadas previamente. O meio foi retirado e 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0 foi adicionado para recolher as células, as quais foram submetidas a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 0°C para obtenção do lisado celular. O meio reacional foi então preparado utilizando-se 600 µL de solução de H₂O₂ 30 mmol/L e 1100 µL de tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0. Essas soluções foram submetidas à leitura da absorbância em espectrofotômetro, que foi realizada no modo cinético, por 135 s, com registro a cada 15 s, no comprimento de onda de 240 nm, nas quais, imediatamente antes da leitura 300 µL do lisado celular foram adicionados.

Quantificação de proteínas do lisado celular foi feita pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) para normalização dos resultados obtidos.

3.6. Quantificação das ROS intracelulares

A quantificação das ROS intracelulares foi realizada em fibroblastos dérmicos humanos, usando a reação da fluoresceína (Sigma-Aldrich) com as ROS como descrito por KATSUYAMA *et al.*, 2016.

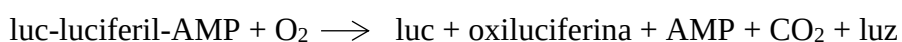
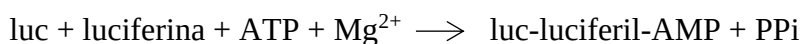
Para o ensaio, foram plaqueadas 10000 células por poço em uma placa de 96 poços, as células foram tratadas com extrato nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL ou com GQ-19 nas concentrações de 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L e 10⁻⁵ mol/L, e foram incubadas por 48 h a 37°C e 5% CO₂. Após 48 h os poços foram lavados com PBS e 100 µL da solução de fluoresceína 20 µmol/L foi adicionada em cada poço e incubada por 30 min nas mesmas condições anteriores. Em seguida, os poços foram lavados e H₂O₂ 300 µmol/L foi adicionado permanecendo por 1 h em contato com as células. Após esse período os poços foram lavados com PBS e a leitura foi realizada a 485 nm de excitação e 530 nm de emissão.

A quantificação de proteínas do lisado celular foi feita pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) para normalização dos resultados obtidos.

3.7. Avaliação da atividade agonista da fração metanólica do extrato do fungo endofítico e do GQ-19 às isoformas gama, alfa e beta/delta do PPAR

A avaliação da atividade agonista da fração metanólica do extrato e GQ-19 aos receptores PPAR γ , PPAR α e PPAR β/δ foi realizada em células HeLa, pelo ensaio da transfecção transiente, usando a lipofetamina[®] 2000 (Invitrogen) como método químico de transfecção gênica. Para o ensaio foram colocadas 30.000 células HeLa em cada poço, de uma placa de 48 poços, que foram incubadas por 24 h a 37°C e 5% CO₂. Após o período de incubação, os ácidos nucleicos foram preparados de forma a obter 300 ng de material seguindo a proporção de 1:4 (receptor nuclear: elemento responsivo), sendo que foram utilizados plasmídeos quiméricos com uma das diferentes isoformas de PPAR, PPAR γ , PPAR α ou PPAR β/δ e o plasmídeo repórter luciferase dirigido pelo elemento responsivo PPRE. As células foram tratadas com lipofetamina e os plasmídeos foram adicionados. O tratamento com o extrato do fungo ou com o GQ-19 em três diferentes concentrações 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ ou 100 $\mu\text{g/mL}$, e 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L ou 10^{-5} mol/L, respectivamente, foram colocados, assim como tratamento com rosiglitazona 10^{-5} mol/L (controle positivo do PPAR γ), bezafibrato 10^{-4} mol/L (controle positivo do PPAR α), L-165041 10^{-4} mol/L (controle positivo do PPAR β/δ), ou o veículo usado para o preparo das amostras (controle negativo) e as culturas foram incubadas nas mesmas condições especificadas anteriormente, por 22 h. Após esse período, o meio foi retirado e 100 μL de tampão de lise, Tris/Triton 100X 100 mmol/L pH 7,6 foram adicionados em cada poço. Em seguida, 10 μL do lisado celular foram transferidos para um microtubo e 20 μL de luciferina foram adicionados ao mesmo, para reação de oxidação da luciferase (abaixo), que foi mensurada em luminômetro (Promega, Glomax 20/20 Luminometer).

Reação de oxidação da luciferina (LIN; BARBOSA, 2002):



3.8. Avaliação da inibição da enzima collagenase pelo extrato do fungo endofítico e GQ-19

A avaliação da capacidade do extrato de inibir a atividade da collagenase foi realizada com o ensaio de digestão de gelatina como descrito por Chiang *et al.*, 2012. Nesse ensaio 10 μL do extrato do fungo ou do GQ-19 correspondente às concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, para o extrato, e 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L e 10^{-5} mol/L, para o GQ-19, foram incubados com 10 μL de collagenase bacteriana 1 (0,1 mg/mL) em 80 μL de tampão collagenase

por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, 40 µL dessa mistura foi inoculada em discos de papel de filtro colocados sobre gel de acrilamida e gelatina e incubadas por 24 h a 37°C. Após esse período, os discos foram retirados e o gel corado com *Coomassie Blue* por 1h. Em seguida, o corante foi removido e solução de ácido acético a 20% foi colocada até cobrir o gel para descorar.

A quantificação das bandas foi feita com o auxílio do programa ImageJ.

3.9. Exposição à radiação UVA

Para todos os ensaios as células foram tratadas por 48 horas com o extrato ou GQ-19; após o término do tratamento, este foi retirado e adicionado tampão fosfato salino (1M), pH 7,4 (PBS). A placa foi irradiada a uma dose de 5 J/cm² de radiação UVA e deixada incubando por 24 h horas com 5% de CO₂ a 37°C (DIDIER *et al.*, 2001; FLORI *et al.*, 2017; KIM, W. S. *et al.*, 2018; MOREIRA *et al.*, 2017; OH, J. H. *et al.*, 2021; PAL *et al.*, 2016; TERAZAWA *et al.*, 2021; WU, S. *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2018; ZHOU, B. R. *et al.*, 2012).

A determinação da dose de radiação e do tempo de incubação foi feita através da avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após exposição a diferentes doses de UVA e incubação por diferentes períodos de tempo.

3.10. Extração de RNA

A extração do RNA total das amostras de fibroblastos foi realizada utilizando o *TRIzol Plus RNA Purification Kit*® (Invitrogen), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após as 48 h de tratamento das placas incubadas com as soluções do extrato do fungo na concentração de 50 µg/mL ou do GQ-19 a 10⁻⁶ mol/L, 1 h de tratamento com peróxido de hidrogênio 300 µmol/L e 48 h das placas incubadas com DMEM ou exposição à radiação UVA 5 J/cm² e 24 h das placas incubadas com DMEM, o meio de cultura foi removido das placas, estas foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e transferidas para um banho de gelo. Foram adicionados 2 mL do reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) em cada placa, as células foram recolhidas com auxílio de um raspador de células (*scraper*) em um microtubo e mantidas por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12293 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf* e foram acrescentados 400 µL de clorofórmio, a mistura foi agitada em vórtex e foi mantida por 3 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram

centrifugadas a 12293 xg por 20 minutos a 4°C. Após este processo, a mistura foi separada em três fases, a fase fenólica (inferior), uma interface proteica e uma fase aquosa superior, onde se encontrava o RNA. A fase superior foi transferida para um microtubo, onde foram adicionados 500 µL de etanol 70% e agitadas em vórtex. Em seguida 700 µL da amostra foram transferidos para um tubo contendo a coluna de separação (*spin cartridge*), que foi centrifugado a 12293 xg por 1 minuto, o conteúdo que ficou na parte de baixo do tubo foi descartado. Em seguida, as colunas foram lavadas com tampão de lavagem I e II, centrifugadas a 12293 xg por 1 minuto em cada etapa, e o material eluído foi descartado.

Para eluição do RNA, as colunas contendo as amostras foram centrifugadas a 12293 xg por 1 minuto para secagem, o tubo coletor foi descartado e as colunas de separação (*spin cartridge*) foram colocadas nos tubos de recuperação. 30 µL de água RNase *free* foram aplicados em cada coluna de separação que, após 1 minuto, foram centrifugadas a 12293 xg por 2 minutos para eluição do RNA purificado.

O RNA extraído foi dissolvido em água tratada com inibidor de RNase, DEPC a 0,1%. A concentração e pureza do RNA total extraído foram avaliadas com auxílio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare Life Sciences). A quantificação foi realizada por medida das absorbâncias das amostras obtidas nos comprimentos de onda de 260 nm, específico para quantificação de ácidos ribonucleicos, e 280 nm, específico para quantificação de proteínas, e a contaminação das amostras por proteína foi avaliada através da razão das absorbâncias a 260 nm e 280 nm (A260/A280). As amostras foram consideradas apropriadas quando o valor obtido para a razão A260/A280 estava entre 1,7 e 2,2.

3.11. Tratamento do RNA extraído com a enzima desoxirribonuclease (DNase) I.

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

3.12. Quantificação da expressão dos genes de MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 e colágeno do tipo I por RT-qPCR

O ensaio de RT-qPCR foi realizado em um único passo com a utilização do kit *Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step*[®] (Applied Biosystems), com o objetivo de quantificar a expressão dos genes de TIMP-1, colágeno do tipo I, MMP-1, MMP-2 e MMP-3 nas amostras tratadas ou não com extrato do fungo endofítico ou com o GQ-19. As reações foram realizadas com volume final de reação de 10 µL, sendo 5,5 µL de uma mistura composta por *Power SYBR Green*[®], enzima transcriptase reversa (RT), *primers forward* e *reverse*, 5 pmol/µL, e 4,5 µL da amostra de RNA total, contendo 5 ng de amostra. Para que a reação de amplificação do DNA ocorresse, as condições utilizadas foram 30 minutos a 48°C para realização da reação de transcrição reversa, 10 minutos a 95°C para ativação da enzima DNA polimerase, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento do *primer* e extensão. A curva de *melting* foi construída através de ciclos de 15 segundos a 95°C para dissociação, 15 segundos a 60°C para anelamento e 15 segundos a 95°C para dissociação.

Os valores de Ct (*threshold cycle*), ciclo no qual o sinal de fluorescência ultrapassa a linha de base, foram utilizados no cálculo da quantificação relativa da expressão gênica.

A avaliação da expressão gênica de TIMP-1 e colágeno do tipo I foi realizada tanto com as células estressadas por H₂O₂ quanto por radiação UVA.

3.13. Avaliação dos níveis de IL-6 e IL-1β

Os níveis de IL-6 e IL-1β foram determinados a partir do sobrenadante da cultura de células após tratamento com extrato do fungo endofítico na concentração de 50 µg/mL ou GQ-19 na concentração de 10⁻⁶ mol/L por 48 h, incubadas a 37°C e 5% CO₂ e submetidas à irradiação UVA (5 J/cm²), seguida de 24 h das placas incubadas com DMEM. O ensaio ELISA, seguindo protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich), foi conduzido e a leitura realizada em leitor de microplacas (Beckman, DTX 800) no comprimento de onda de 450 nm.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com GQ-19.

O ensaio de MTT foi realizado para verificar o efeito do GQ-19 na viabilidade celular dos fibroblastos dérmicos humanos e para determinar as concentrações que poderiam ser utilizadas nos ensaios seguintes. Assim, as concentrações de GQ que causaram uma diminuição da viabilidade celular maior do que 30%, 10^{-4} mol/L e 10^{-3} mol/L, foram excluídas dos próximos ensaios. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2.

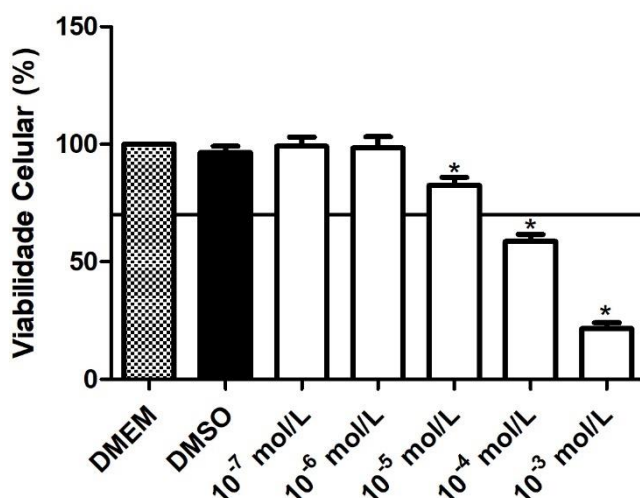


Figura 2. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com GQ-19.

Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro da média da porcentagem de células viáveis. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (* $p < 0,05$ vs DMEM).

4.2. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada para verificar se o GQ-19 tinha alguma ação sobre essa enzima do sistema antioxidante. Para fazer essa verificação foi realizada a medida da inibição da redução do NBT. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade da SOD das amostras tratadas com GQ-19 e expostas ao estresse oxidativo em relação ao controle, o qual não foi submetido ao estresse oxidativo e nem tratado com GQ-19. O tratamento com H_2O_2 reduziu a atividade da SOD a 6%, já o tratamento com o GQ-19 nas três concentrações testadas, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L e 10^{-5} mol/L, não conseguiu proteger os fibroblastos da instalação desse efeito do estresse oxidativo. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.

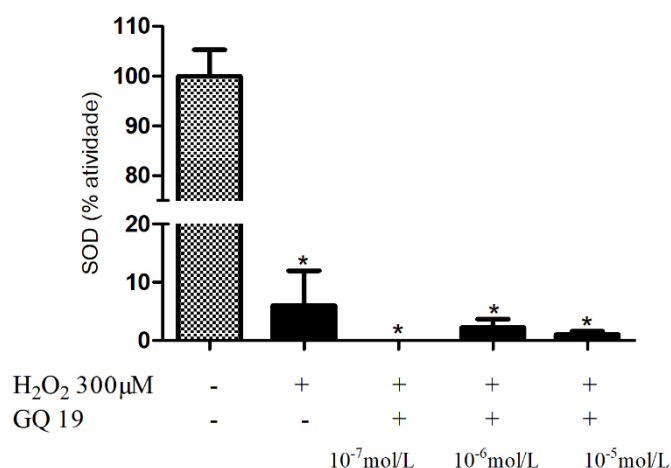


Figura 3. Atividade da SOD nas células submetidas ao estresse oxidativo e tratadas com GQ-19.

Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro da média da porcentagem de atividade da enzima SOD. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (* $p < 0,05$ vs DMEM).

4.3. Avaliação da atividade da enzima catalase.

A atividade da enzima catalase também foi avaliada para verificar se o composto GQ-19 tinha alguma ação sobre esta enzima do sistema enzimático antioxidante do organismo. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade da catalase, sendo a atividade de 100% atribuída ao controle, que assim como na SOD eram as células que não foram submetidas ao estresse oxidativo e também não foram tratadas com GQ-19.

O tratamento com H₂O₂ reduziu a atividade da catalase a $56,2 \pm 4,3\%$, já o tratamento com o GQ-19 nas três concentrações testadas, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L e 10^{-5} mol/L, não conseguiu proteger os fibroblastos da instalação desse estresse oxidativo. O gráfico da Figura 4 representa os resultados encontrados.

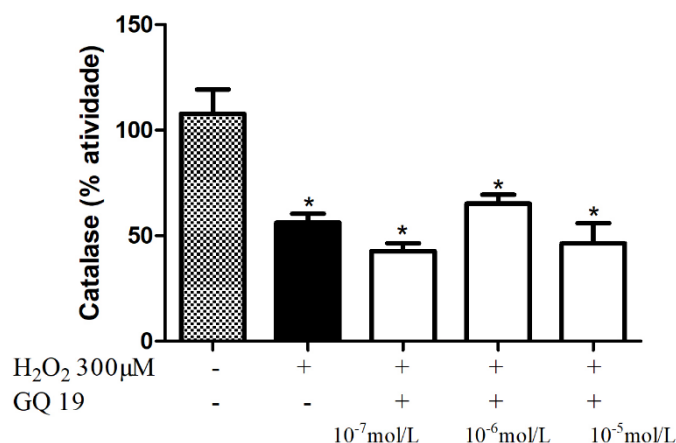


Figura 4. Atividade da catalase nas células submetidas ao estresse oxidativo e tratadas com GQ-19.

Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro da média da porcentagem de atividade da enzima catalase. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (* $p < 0,05$ vs DMEM).

4.4. Quantificação de ROS intracelulares.

A quantificação das ROS intracelulares foi determinada usando a reação da fluoresceína com as ROS que pode ser quantificada por fluorescência a 485 nm de excitação e 530 nm de emissão. Os resultados foram expressos como porcentagem de ROS, sendo a atividade de 100% atribuída ao tratamento com H₂O₂, ou seja, células induzidas ao estresse oxidativo.

O tratamento com o GQ-19 nas três concentrações testadas, 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L e 10⁻⁵ mol/L, não conseguiu reduzir a quantidade de ROS, mas o tratamento com o extrato do fungo endofítico nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL reduziu a concentração de ROS intracelular a 51,78 $\pm$ 5,48%; 55,4 $\pm$ 7,51% e 57,78 $\pm$ 7,92% respectivamente. Os gráficos da Figura 5 apresentam os resultados encontrados.

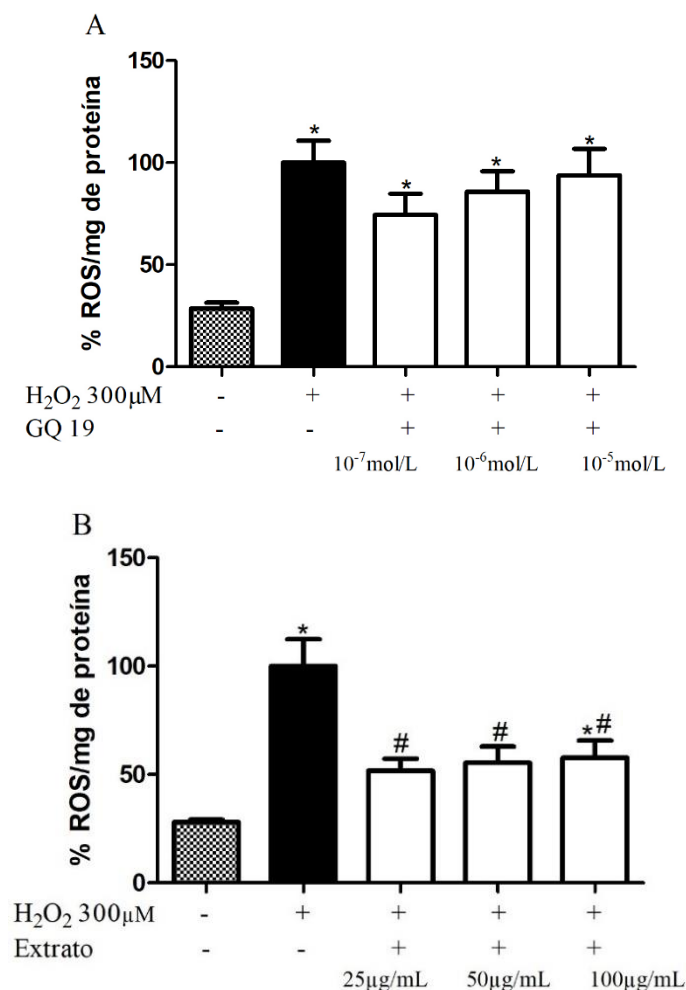


Figura 5. Concentração de ROS nas células submetidas ao estresse oxidativo e tratadas com extrato ou GQ-19. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro da média da porcentagem da concentração de ROS. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (* e #, $p < 0,5$; * vs DMEM, # vs H₂O₂). A – GQ-19; B – Extrato.

4.5. Avaliação da atividade agonista do extrato e do GQ-19 aos receptores PPAR γ , PPAR α e PPAR β/δ

A avaliação da atividade agonista do extrato e do GQ-19 frente às três isoformas de PPAR: PPAR γ , PPAR α e PPAR β/δ foi realizada em células HeLa com o objetivo de verificar se esses compostos apresentariam atividade agonista frente ao PPAR e assim ativariam a sinalização de diversas vias envolvidas no controle da homeostase da pele. Para isso foi realizado o ensaio de transfecção utilizando a rosiglitazona como controle positivo do PPAR γ , o bezafibrato como controle positivo do PPAR α e o L-165041 como controle positivo do PPAR β/δ . Os resultados, apresentados na Figura 6 mostram que o extrato não apresentou atividade agonista aos receptores PPAR, mas o GQ-19 apresentou atividade agonista parcial com taxa de ativação de 2,68 do receptor PPAR γ .

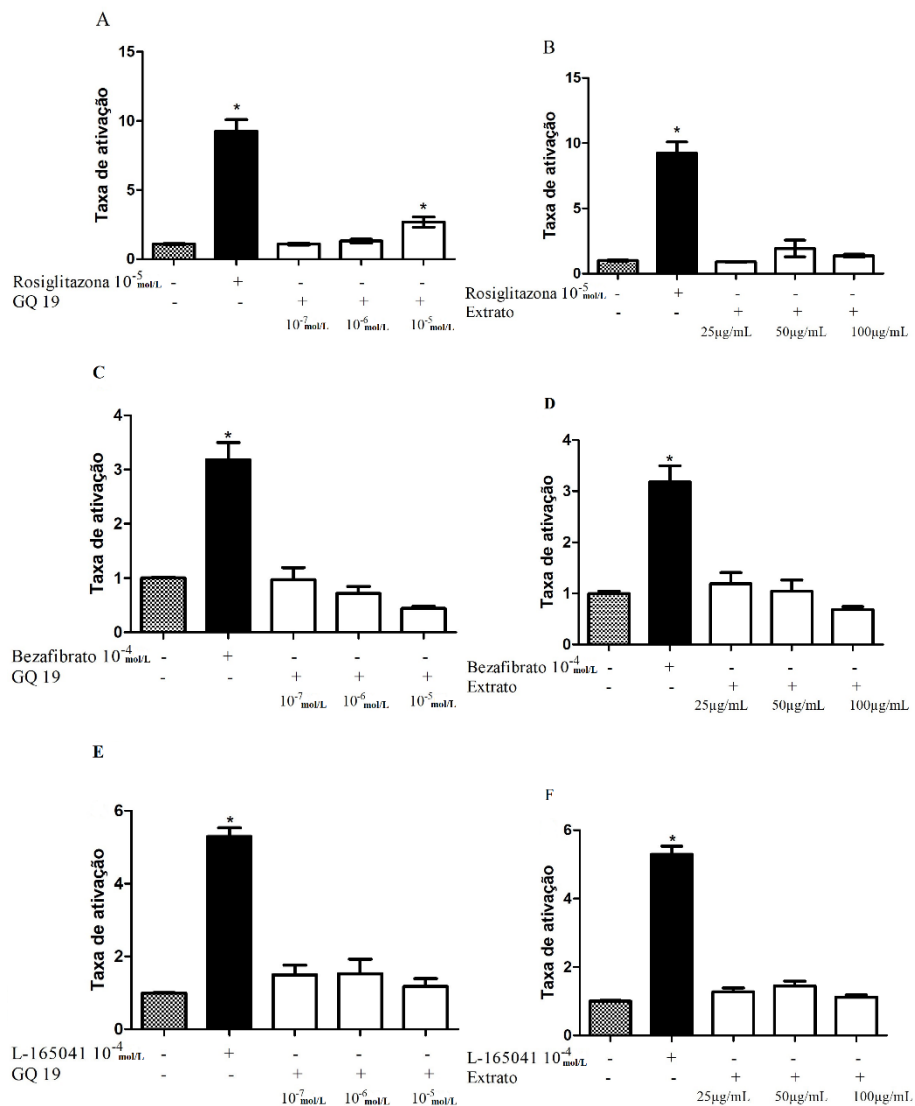


Figura 6. Avaliação da atividade agonista do extrato e do GQ-19 frente aos receptores PPAR.

Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro da média da taxa de ativação do PPAR. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (*, $p < 0,05$ vs controle negativo). A PPAR γ – GQ-19; B PPAR γ – Extrato; C PPAR α – GQ-19; D PPAR α – Extrato; E PPAR β/δ – GQ-19; F PPAR β/δ – Extrato.

4.6. Avaliação da inibição da enzima collagenase pelo extrato do fungo endofítico e GQ-19.

A avaliação da inibição da enzima collagenase foi determinada de acordo com o método de Katsuyama *et al.*, 2016, que se baseia na capacidade da enzima em degradar a gelatina. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade da collagenase, sendo a atividade de 100% atribuída ao controle, ou seja, sem extrato ou GQ-19. O tratamento com GQ-19 na concentração de 10⁻⁷ mol/L aumentou a atividade da collagenase a 177,33 $\pm$ 25,99%, no entanto

as concentrações de 10^{-6} mol/L e 10^{-5} mol/L reduziram a atividade da collagenase a $38,67 \pm 8,29\%$ e $27,50 \pm 7,50\%$, respectivamente. Já o extrato do fungo endofítico conseguiu reduzir a atividade da collagenase apenas na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, reduzindo a atividade da collagenase a $14,33 \pm 19,29\%$. As imagens e gráficos da Figura 7 representam os resultados encontrados.

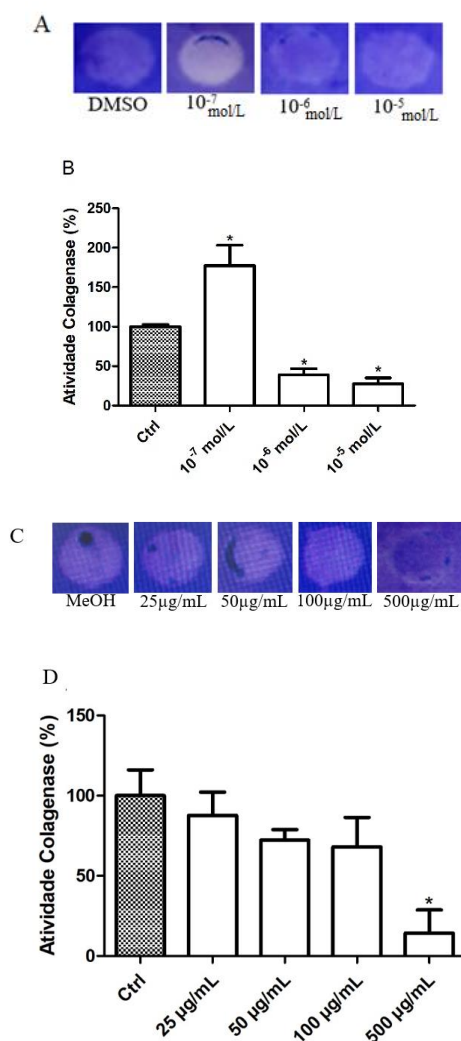


Figura 7. Avaliação da inibição da collagenase pelo extrato ou GQ-19.

Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro da média da atividade da collagenase. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (*, $p < 0,05$ vs Ctrl). A e B – GQ-19; C e D – extrato.

4.7. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos irradiados por UVA.

A avaliação da viabilidade celular dos fibroblastos irradiados por UVA foi realizada através do ensaio de MTT para verificar o comportamento das diferentes doses de UVA frente aos fibroblastos dérmicos humanos e para determinar dosagem que poderia ser utilizada e o

tempo pós irradiação para seguir com as análises. Após 1 h de irradiação, observou-se uma redução para 83% da viabilidade celular na dose de 10 J/cm², 91% com 7 J/cm² e um aumento para 105% com 5 J/cm², com 24 h pós irradiação maiores alterações da viabilidade celular foram observadas, com a dose de 10 J/cm² reduzindo a viabilidade celular para 50%, 7 J/cm² 98% e 5 J/cm² 93%, no entanto após 48 h da irradiação a viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos 10 J/cm² chegou a 79%, enquanto com 7 J/cm² se manteve a 96% e 5 J/cm² 107% como pode ser observado no gráfico da Figura 8.

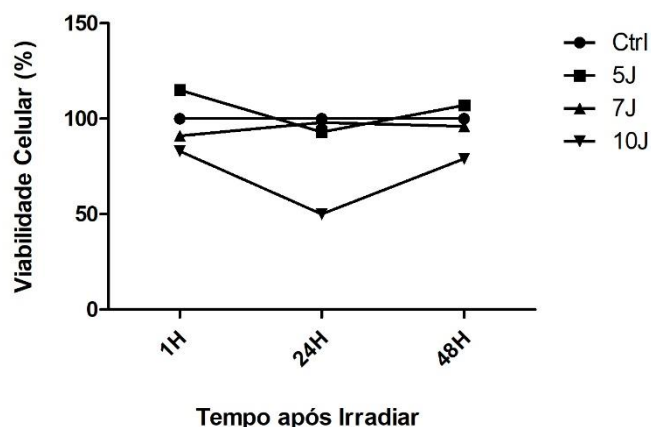


Figura 8. Viabilidade Celular de Fibroblastos Dérmicos pós diferentes dosagens de radiação UVA.

4.8. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos irradiados com UVA e tratados com GQ-19 ou com extrato do fungo.

O ensaio de MTT foi realizado para verificar o efeito do GQ-19 e do extrato do fungo na viabilidade celular dos fibroblastos dérmicos humanos irradiados com 5 J/cm² de UVA, e para determinar as concentrações que poderiam ser utilizadas nos ensaios seguintes. Assim, como a concentração de GQ-19 de 10⁻⁶ mol/L e do extrato de 50 µg/mL mantiveram a viabilidade celular em 78%, essas foram as concentrações selecionadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 9.

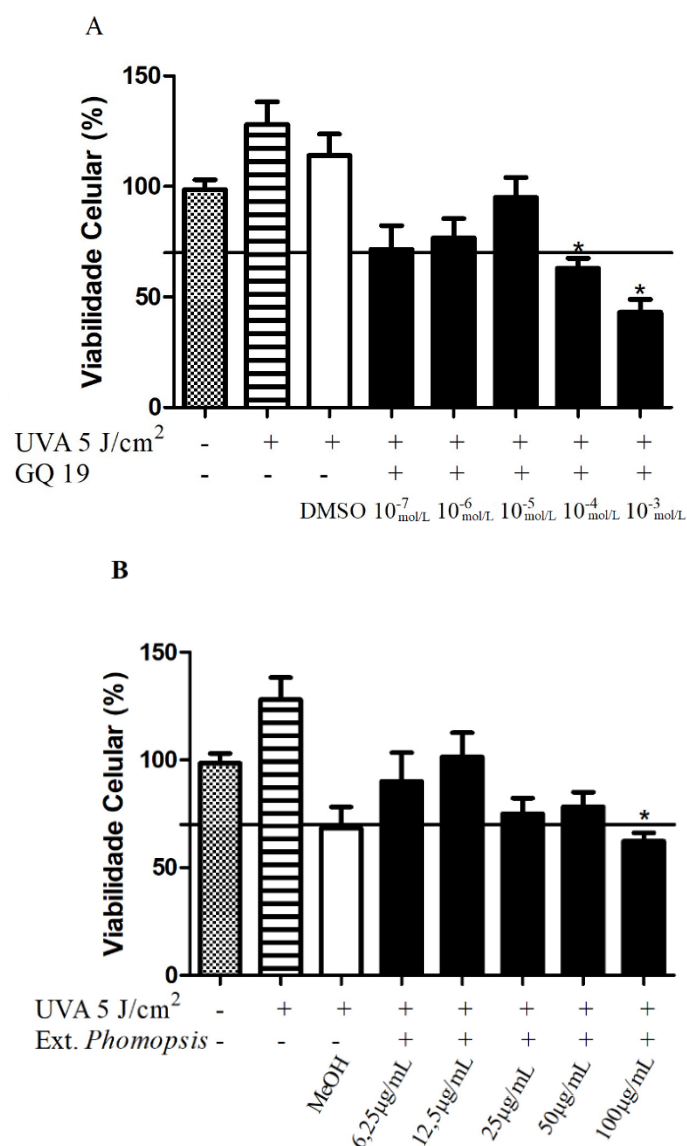


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos tratados com GQ-19 ou extrato do fungo *Phomopsis* sp. junto com a radiação UVA.

Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro da média da porcentagem de células viáveis. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (* $p < 0,05$ vs DMEM). A – GQ-19; B – extrato.

4.9. Avaliação da expressão gênica nas células submetidas ao estresse oxidativo por H₂O₂.

A quantificação da expressão gênica do TIMP-1 e do colágeno do tipo I foi realizada através da extração de RNA de fibroblastos dérmicos humanos expostos ao estresse oxidativo e tratados com extrato do fungo endofítico ou GQ-19 comparando com aqueles que não tinham sido submetidos ao estresse oxidativo e com aqueles fibroblastos que foram submetidos ao estresse oxidativo com H₂O₂ 300 μ mol/L por 1 h. Após submissão ao estresse oxidativo a expressão relativa do RNA mensageiro do gene do colágeno do tipo I diminuiu em $81,89 \pm 0,92\%$ e houve aumento de $131,37 \pm 8,36\%$ na expressão do mesmo gene quando tratado com

GQ-19 em comparação ao controle não submetido ao tratamento com H₂O₂ 300 µmol/L, no entanto na expressão do gene de TIMP-1 não foi observada nenhuma alteração em nenhum dos tratamentos como pode ser observado nos gráficos da Figura 10.

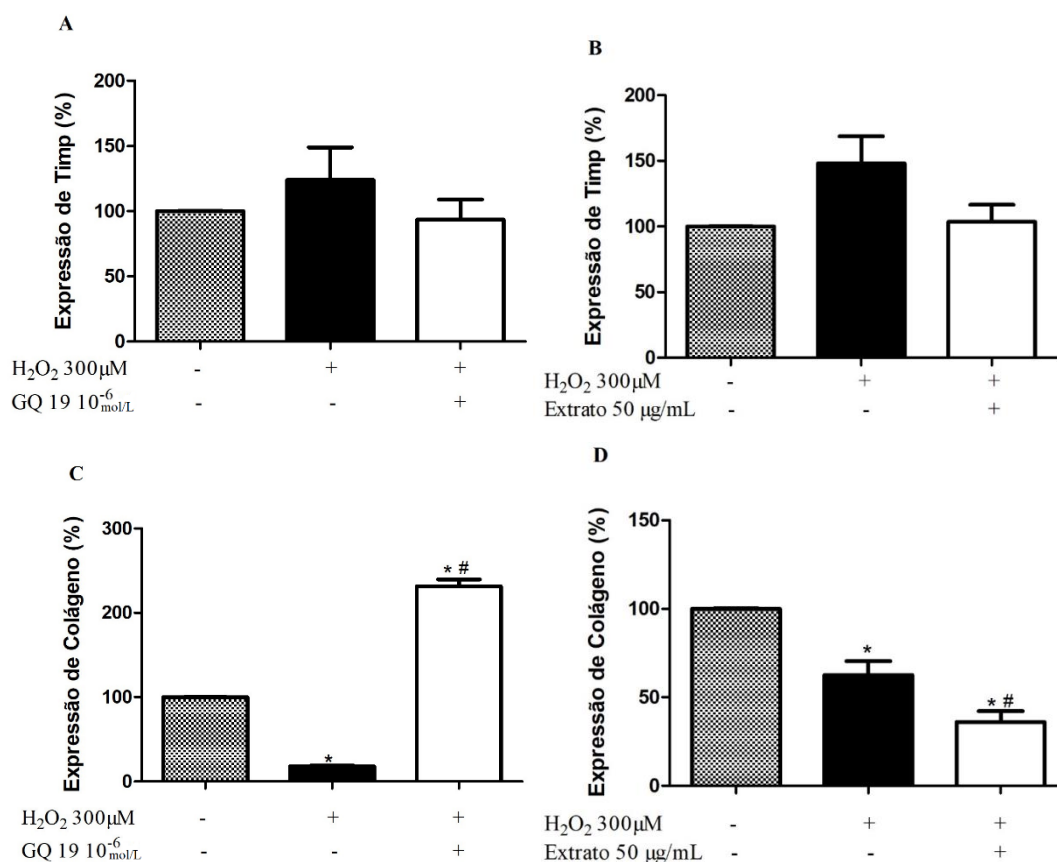


Figura 10. Expressão de TIMP e Colágeno nas células submetidas ao estresse oxidativo por H₂O₂ e tratadas com extrato ou GQ-19.

Os resultados apresentados representam a média ± erro da média da expressão de TIMP-1 e colágeno tipo I. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (* e #, $p < 0,05$; * vs DMEM; # vs H₂O₂). A e C – GQ-19; B e D – Extrato.

4.10. Avaliação da expressão gênica nas células irradiadas por UVA.

A quantificação da expressão gênica de TIMP-1, colágeno do tipo I, MMP-1, MMP-2 e MMP-3 foi realizada através da extração de RNA de fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação UVA e tratados com extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. 50 µg/mL, GQ-19 10⁻⁶ mol/L, rosiglitazona 10⁻⁵ mol/L ou antagonista do PPAR γ (T0070907) comparando com aqueles que não tinham sido submetidos ao estresse oxidativo e com aqueles fibroblastos que foram apenas submetidos ao estresse oxidativo. Após exposição à radiação UVA a expressão relativa do RNA mensageiro dos genes do TIMP-1 e MMP-3 aumentou em 115,80 ± 31,32% e 276,10 ± 3,22% (Figuras 11A, 11B, 11E e 11F), respectivamente, enquanto o tratamento com GQ-19 mais o extrato do fungo *Phomopsis* sp. manteve a expressão de MMP-3 igual a das

células sem nenhum tratamento, mesmo após irradiação com UVA (Figuras 11E e 11F). Em relação ao gene do colágeno tipo I, observou-se uma diminuição de $90,44 \pm 5,40\%$ em sua expressão pós irradiação com UVA como pode ser observado nos gráficos da Figura 11C e 11D.

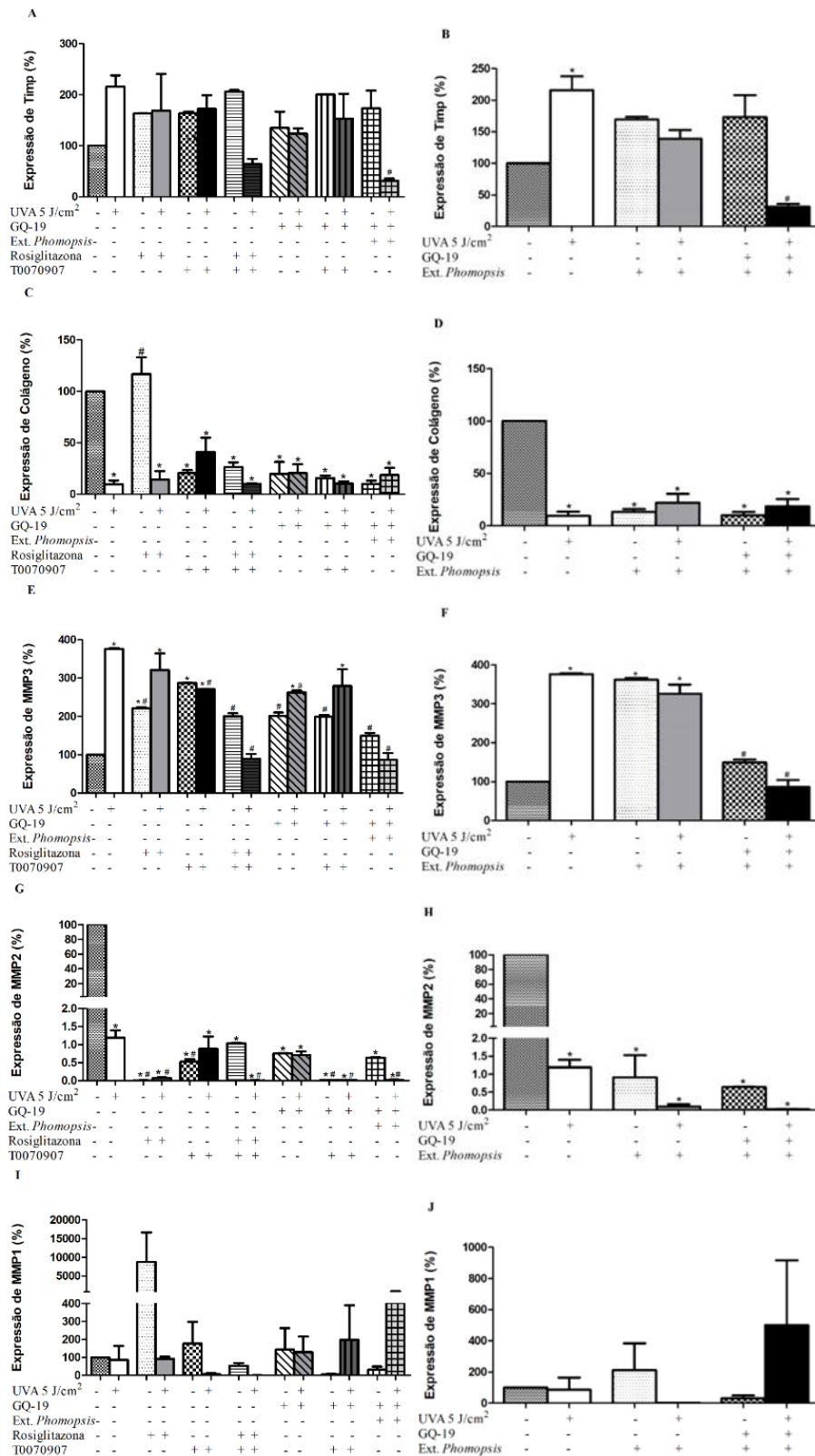


Figura 11. Expressão de TIMP-1, Colágeno, MMP-1, MMP-2 e MMP-3 nas células submetidas a radiação com UVA. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro da média da expressão de TIMP-1, colágeno tipo I, MMP-1, MMP-2 e MMP-3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (* e #, $p < 0,05$; * vs DMEM; # vs UVA). A, C, E, G e I – GQ-19; B, D, F, H e J – Extrato.

4.11. Avaliação dos níveis de IL-6 e IL-1 β .

A quantificação dos níveis de IL-6 e IL-1 β foi determinada a partir do sobrenadante da cultura de células após tratamento com extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. 50 μ g/mL, GQ-19 10⁻⁶ mol/L, rosiglitazona 10⁻⁵ mol/L ou antagonista do PPAR γ (T0070907) e submetidas à irradiação UVA 5 J/cm². Após submissão a radiação UVA o nível de IL-6 aumentou em 1790,94 $\pm$ 6,27%, e o de IL-1 β em 503,33 $\pm$ 80,14%. Além disso, os tratamentos praticamente zeraram os níveis de IL-1 β como pode ser observado no gráfico da Figura 12.

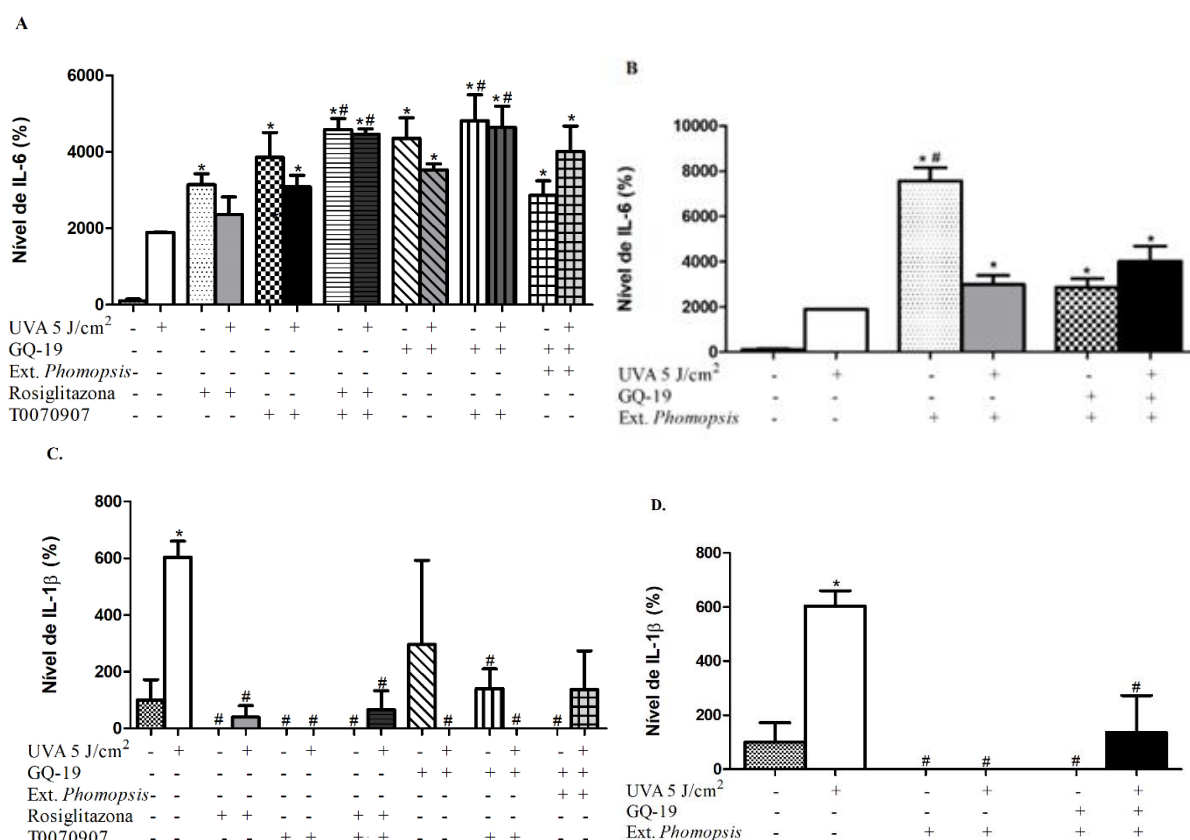


Figura 12. Avaliação dos níveis de IL-6 e IL-1 β .

Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro do nível de IL-6 e IL-1 β . Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (* e #, $p < 0,05$; * vs DMEM; # vs UVA). A e C – GQ-19; B e D – extrato.

5. DISCUSSÃO

Todos os órgãos, todos os seres vivos, todos os níveis de organização biológica, mudam ao longo do tempo como resultado do processo natural de envelhecimento. Isso acontece devido ao acúmulo de diversas alterações deletérias produzidas em todas as células e tecidos com o tempo, diminuindo as capacidades funcionais máximas e a homeostase, aumentando a probabilidade de sofrer processos degenerativos, prejudicando progressivamente a função, e podendo eventualmente causar a morte (BABIZHAYEV; YEGOROV, 2015; MCCABE *et al.*, 2020; PAMPLONA, 2008).

O envelhecimento da pele é um processo complexo que envolve tanto fatores intrínsecos como fatores extrínsecos; os primeiros estão relacionados a um processo natural e genético, enquanto os segundos estão relacionados a fatores ambientais e sociais, como má alimentação, tabagismo, alcoolismo e, principalmente, a exposição à radiação UV, conhecida como fotoenvelhecimento, a qual é responsável por aproximadamente 80% do envelhecimento facial (CHIANG *et al.*, 2012; HWANG *et al.*, 2014; JUNG, H. *et al.*, 2016; KIM, H. K., 2016; LEE *et al.*, 2016; MCCABE *et al.*, 2020; MORA HUERTAS *et al.*, 2016; NICHOLS; KATIYAR, 2011; PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022).

Os mecanismos do fotoenvelhecimento da pele incluem aceleração da redução de telômeros, deleção do DNA mitocondrial, supressão da resposta do sistema imunológico, ativação de citocinas da superfície celular e dos receptores do fator de crescimento, alterando as vias de sinalização, expressão e atividade de diversas enzimas como a expressão anormal de MMPs, aumento do estresse oxidativo, levando, entre outros problemas, a danos oxidativos nas proteínas (CUI, B. *et al.*, 2022; ZHENG, Y *et al.*, 2017; ZHENG, Yue *et al.*, 2018).

A busca de mecanismos imunomoduladores, anti-inflamatórios, antioxidantes, de reparo do DNA e de bloqueio da incidência de fótons de UV constituem estratégias fotoprotetoras (BOSCH *et al.*, 2015; PANGESTUTI; SHIN; KIM, 2021; SCAPAGNINI *et al.*, 2014).

Neste estudo, foram analisados a fração metanólica do extrato bruto metanólico do micélio do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado das folhas da *Bauhinia variegata*, o qual apresenta atividade antioxidante e um composto sintético, derivado da tiazolidina, assim como a rosiglitazona, GQ-19, agonista do PPAR γ (FREITAS PIRES *et al.*, 2022; VIEIRA, 2004).

A proteína estrutural mais abundante no tecido conjuntivo da pele é o colágeno tipo I, que é sintetizado principalmente por fibroblastos, um dos principais tipos de células da derme, e é responsável por conferir à pele sua resistência mecânica e resiliência (CHIANG *et al.*, 2012;

GENG *et al.*, 2021; PANICH *et al.*, 2016; TAKASAO *et al.*, 2012). No envelhecimento da pele, os fibroblastos e os melanócitos são as células senescentes mais observadas, ou seja, o número dessas células senescentes aumenta de maneira dependente da idade (KIM, J. C.; PARK; KANG, 2022). A manutenção da textura da pele, depende em grande parte das atividades dos fibroblastos dérmicos, e o colágeno tipo I desempenham um papel crucial na manutenção da resistência à tração e elasticidade da pele (TAKASAO *et al.*, 2012). Devido a isso, essas células foram escolhidas para a avaliação dos efeitos da fração do extrato e do GQ-19, servindo como modelo de estudo dos possíveis efeitos na pele.

Inicialmente uma análise de citotoxicidade foi conduzida para verificar a dosagem de GQ-19 que poderia ser utilizada no tratamento dos fibroblastos sem ser tóxica para os mesmos (Figura 2); este mesmo ensaio não foi realizado para o extrato devido ao fato de já ter sido realizado previamente (FREITAS PIRES *et al.*, 2022). Para fazer essa avaliação, foi realizado o ensaio de MTT, no qual a viabilidade celular é medida através da atividade de desidrogenases mitocondriais, que são capazes de reduzir o MTT, amarelo, a formazan, roxo. Essa redução está diretamente relacionada com a atividade das desidrogenases mitocondriais e, portanto, diretamente proporcional à atividade mitocondrial e viabilidade celular.

O efeito exercido pelo tratamento com o GQ-19 sobre a viabilidade celular dos fibroblastos demonstrou que as concentrações de 10^{-3} mol/L e 10^{-4} mol/L foram tóxicas para as células, visto que reduziram a viabilidade celular em mais de 30% (Figura 2). Portanto, para não ocorrer interferência nos ensaios subsequentes essas concentrações não foram utilizadas.

O mesmo ensaio foi realizado para determinar a dose de radiação UVA necessários para os experimentos. Após definir esses parâmetros, a viabilidade celular foi avaliada utilizando a radiação UVA em combinação com os tratamentos. Os resultados mostraram que, após 24 horas, todas as doses de UVA tiveram algum efeito nas células (Figura 8). Portanto, esse período foi escolhido para realizar as análises após a exposição dos fibroblastos. A dose de 10 J/cm^2 reduziu a viabilidade celular para 50% após 24 horas de irradiação, sendo excluída dos experimentos futuros. No entanto, as doses de 7 J/cm^2 e 5 J/cm^2 preservaram a viabilidade celular em 98% e 93%, respectivamente. Assim, a dose de 5 J/cm^2 foi selecionada para continuar os ensaios.

Em relação ao GQ-19, os fibroblastos tratados com a concentração de 10^{-6} mol/L mostraram uma viabilidade celular de 78,25% após a irradiação com UVA (Figura 9), sendo escolhida como a concentração para todos os tratamentos posteriores.

A respeito da fração metanólica do fungo endofítico *Phomopsis* sp. foi eleita a concentração de 50 µg/mL como a mais viável, pois apresentou uma taxa de viabilidade de

78,33% mesmo após a exposição à radiação UVA, enquanto a concentração de 100 µg/mL mostrou-se tóxica para as células, como demonstrado na Figura 9.

Visto que um dos principais mecanismos que levam às alterações da pele após exposição à radiação UV é a produção de ROS, a busca por terapias que aumentam a capacidade do nosso sistema antioxidante torna-se relevante, pois é um sistema de defesa fundamental para preservar o equilíbrio redox exigido para a regulação da homeostase da epiderme e para evitar danos da pele induzidos pelas ROS. Uma importante enzima antioxidante é a SOD que converte $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual é degradado em água pela catalase e GPx (BRIGANTI *et al.*, 2014; CUI, B. *et al.*, 2022; HWANG *et al.*, 2014; KIM, H. K., 2016; PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022).

A enzima SOD é considerada a principal antioxidante do nosso corpo, pois é a primeira a entrar em ação para combater as ROS, transformando o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e sendo a única capaz de eliminar o ânion radical superóxido por completo. A importância dessa enzima é tão evidente que um estudo realizado por Perez *et al.* em 2009 comprovou que a ausência do gene da SOD (*sod1*) em camundongos resultou em uma redução significativa na expectativa de vida desses animais. Além disso, a oxidação do DNA no fígado dos camundongos sem SOD era de quatro a cinco vezes maior, evidenciando os danos causados pela falta dessa enzima. Outros problemas de saúde também foram observados, como perda de audição, degeneração macular, catarata precoce, hipertrofia vascular, atrofia muscular e uma alta incidência de carcinoma hepatocelular. Esses resultados reforçam a importância da enzima SOD no processo de envelhecimento e deixam claro que sua ausência tem efeitos negativos em todo o organismo (PAPACCIO *et al.*, 2022; PÉREZ *et al.*, 2009).

Neste trabalho a atividade da enzima SOD foi avaliada pelo método bioquímico da xantina/xantina oxidase, que gera $O_2^{\cdot-}$ e reduz o NBT, utilizado como um indicador da produção de $O_2^{\cdot-}$. A enzima SOD compete com o NBT pelo $O_2^{\cdot-}$ e a porcentagem de inibição da redução de NBT indica a quantidade de SOD presente no meio reacional (WEYDERT; CULLEN, 2010). Para este ensaio as células foram submetidas ao tratamento com H_2O_2 300 µM, o qual simula o estresse oxidativo sofrido pelos fibroblastos ao serem expostos aos raios UV.

Pelos resultados obtidos observa-se que o tratamento com H_2O_2 foi capaz de instalar um estresse oxidativo nos fibroblastos dérmicos humanos reduzindo a atividade da SOD a 6% (Figura 3), mas o tratamento com o GQ-19 nas concentrações de 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L e 10^{-5} mol/L não foram capazes de proteger as células desse estresse oxidativo, ao contrário do que foi observado quando as células foram submetidas ao mesmo estresse oxidativo, mas tratadas previamente com a fração metanólica do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. Este conseguiu aumentar a atividade da SOD de forma dose dependente. Em comparação à atividade

da enzima nas células que não sofreram estresse oxidativo, o extrato promoveu um aumento de $49,62\% \pm 7,87\%$, $56,64\% \pm 12,27\%$ e $240,46\% \pm 26,11\%$, nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente (FREITAS PIRES *et al.*, 2022).

A catalase, assim como a SOD, é uma enzima antioxidante importante na defesa celular contra o estresse oxidativo, pois decompõe o H₂O₂ produzido pela SOD em H₂O e O₂. A excessiva exposição à radiação UV diminui a atividade da catalase, levando ao consequente acúmulo de ROS e ao fotoenvelhecimento (CHEN *et al.*, 2015; FLORI *et al.*, 2017; IM *et al.*, 2016; KIM, H. K., 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022; PÉREZ *et al.*, 2009). Pérez *et al.*, 2009 em seu estudo também mostrou que, ao inserir um grande fragmento genômico de DNA humano contendo o gene da catalase em camundongos, estes se tornavam mais resistentes à toxicidade do H₂O₂ (PÉREZ *et al.*, 2009).

Nesta pesquisa a atividade da catalase foi avaliada através do monitoramento por espectrofotometria da taxa de decomposição do H₂O₂ no comprimento de onda de 240 nm (AEBI, 1984), após tratamento das células por 48 h com as soluções do GQ-19 nas concentrações de 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L e 10⁻⁵ mol/L, seguido de tratamento com H₂O₂.

Neste ensaio também foi demonstrado a instalação do estresse oxidativo após o tratamento com H₂O₂ 300 µmol/L, pois observou-se a redução da atividade da catalase a 56,2% (Figura 4). O tratamento prévio com o GQ-19 não foi capaz de proteger as células da instalação do estresse oxidativo. O mesmo não foi observado no tratamento com a fração metanólica do extrato do fungo endofítico, que, nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, conseguiu aumentar a atividade da catalase para $148,41\% \pm 2,39\%$ e $140,71\% \pm 8,28\%$, respectivamente, sendo um aumento de atividade superior ao da atividade de catalase dos fibroblastos que não foram submetidos estresse oxidativo (FREITAS, 2016; FREITAS PIRES *et al.*, 2022).

A exposição prolongada ao sol pode causar danos ao DNA das células devido à produção excessiva de ROS induzida pela radiação UVA e UVB. Embora a pele possua mecanismos naturais de defesa para lidar com essas ROS, a exposição crônica e intensa ao sol pode sobrecarregar esse sistema, resultando em estresse oxidativo. Esse estresse oxidativo pode levar a alterações químicas prejudiciais no DNA, proteínas e lipídios, além de estimular a produção de MMPs e fatores inflamatórios, o que pode levar à apoptose dos fibroblastos, células responsáveis pela produção de colágeno (BOCHEVA *et al.*, 2022; CHATATIKUN; CHIABCHALARD, 2017; GAO *et al.*, 2018; HWANG *et al.*, 2017; KIM, H. K., 2016; MIAO; CLAIR, ST., 2009; PANICH *et al.*, 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022; WU, S. *et al.*, 2018).

Os antioxidantes podem regular a transferência de elétrons ou a fuga de espécies radicalares da cadeia de transporte de elétrons e, assim, evitar danos oxidativos e relacionados

às funções mitocondriais. Assim, os compostos antioxidantes ajudam a inibir a geração ROS, podendo efetivamente reduzir o envelhecimento cutâneo induzido por UV quando são aplicados como produtos de cuidados da pele, reduzindo o risco de formação de rugas e protegendo a pele do processo de envelhecimento (GAO *et al.*, 2018; HWANG *et al.*, 2017; PAPACCIO *et al.*, 2022).

Um dos critérios importantes para um determinado agente atuar como um bom fotoprotetor é ser capaz de neutralizar as ROS (DAS; KUMAR; RAO, 2015; PANICH *et al.*, 2016). Para avaliar na célula o estado oxidativo induzido por UV, determina-se o nível de ROS e as enzimas de defesa antioxidante, como SOD e catalase (KIM, H. K., 2016; PAPACCIO *et al.*, 2022).

Neste trabalho para quantificar as ROS intracelulares foi utilizado o método da fluoresceína, pelo qual o diacetato de fluorescência 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA), não fluorescente, é convertido em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) pelas ROS intracelulares.

Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com a fração metanólica do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL foi capaz de proteger parcialmente os fibroblastos dérmicos humanos do estresse oxidativo, apresentando uma provável atividade antioxidante, visto que reduziram a concentração de ROS de 100,00% a 51,78%, 55,40% e 57,78%, respectivamente (Figura 5). O mesmo não foi observado para o tratamento com GQ-19, sugerindo que esse não apresenta atividade antioxidante (Figura 5).

Ao compararmos os resultados obtidos com os encontrados na literatura para o hidrocarboneto aromático mirceno, um monoterpene amplamente conhecido por suas propriedades medicinais, como atividades analgésicas, anti-inflamatórias, antibióticas, antibacterianas, antitumorais, antimutagênicas e, principalmente, por sua potente atividade antioxidante, podemos afirmar que o extrato testado neste estudo apresenta um grande potencial em relação à sua atividade antioxidante. Os resultados mostram que o tratamento com mirceno a uma concentração de 1 e 10 µmol/L resultou em uma redução de 26,2% e 45,7%, respectivamente, nos níveis de ROS em comparação com as células de controle irradiadas por UVB (HWANG *et al.*, 2017). Já o extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. mostrou uma redução de 51,78%, 55,40% e 57,78% para as concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. Outra descoberta relevante na literatura é o uso do extrato etanólico da madeira de *P. santalinus* L. no tratamento do diabetes mellitus, o qual apresenta atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e gastroprotetoras, além de propriedades

curativas para feridas. Em um estudo realizado por Gao *et al.*, 2017, verificou-se que esse extrato foi capaz de reduzir em 41,71% a concentração de ROS em fibroblastos irradiados com UVB, na concentração de 10 µg/mL. Essa redução também foi obtida para o extrato de *Phomopsis* sp. em estudo neste trabalho. Além disso, quando comparado com a quercetina, um flavonoide conhecido por suas propriedades antioxidantes, também foram observados resultados promissores, visto que a quercetina reduziu em 47,17% a concentração de ROS em fibroblastos dérmicos humanos irradiados com UVB, na concentração de 10 µmol/L (GAO *et al.*, 2018).

Esses resultados são extremamente promissores e indicam que a fração metanólica do extrato do fungo endofítico obtido das folhas de *Bauhinia variegata* pode ser uma alternativa eficaz e potente no combate aos radicais livres e no aumento da atividade antioxidante em células da pele.

Os PPARs são fatores de transcrição que desempenham papel importante nas doenças inflamatórias relacionadas à idade e à exposição à radiação UV, incluindo a proliferação e diferenciação celular, além de regulação de respostas anti-inflamatórias, atividade antioxidante e melhora a função da barreira da pele. PPARs existem em três isoformas, PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , e todas são expressas na pele (CHOI, 2020; CHONG *et al.*, 2009; DI-POĚ *et al.*, 2004; FLORI *et al.*, 2017; JEON, H. *et al.*, 2016; JEON, Y. *et al.*, 2015; KIM, B.; CHOI; KIM, 2014; KIM, J. K. *et al.*, 2012; KONGER *et al.*, 2017; MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; SHIN *et al.*, 2016). Dentre essas isoformas, PPAR α e PPAR γ regulam as MMPs através do NF- κ B e da AP-1, por interação negativa com esses fatores de transcrição que controlam a expressão de MMP, além de controlarem a expressão das enzimas catalase e SOD, o que os tornam potenciais alvos terapêuticos para o fotoenvelhecimento (BRIGANTI *et al.*, 2014; CHOI, 2020; CHONG *et al.*, 2009; DI-POĚ *et al.*, 2004; JEON, Y. *et al.*, 2015; KIM, B.; CHOI; KIM, 2014; SHIN *et al.*, 2016). O PPAR β/δ é o isotipo predominante nos queratinócitos e nos fibroblastos dérmicos e atua como um mediador do processo de cicatrização de feridas, aumentando a expressão de proteínas da matriz extracelular, como colágenos, através do TGF- β , um regulador da homeostase da MEC e um alvo molecular do PPAR β/δ , além de reduzir a geração de ROS após exposição aos UVR e, conseqüentemente, diminuir a secreção de MMP-1 (CHONG *et al.*, 2009; DI-POĚ *et al.*, 2004; HAM *et al.*, 2013; JUNG, Y. R. *et al.*, 2015; SHIN *et al.*, 2016). Estas observações sugerem que a inibição mediada por PPAR β/δ da secreção de MMP-1 evita alguns efeitos do fotoenvelhecimento e mantém a integridade da pele, inibindo a degradação da matriz extracelular (CHONG *et al.*, 2009; DAS; KUMAR; RAO, 2015; DI-POĚ *et al.*, 2004;

HAM *et al.*, 2013; JEON, Y. *et al.*, 2015; JUNG, Y. R. *et al.*, 2015; KIM, B.; CHOI; KIM, 2014; SHIN *et al.*, 2016).

Neste estudo foi avaliada a atividade agonista da fração metanólica do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. e do GQ-19 aos receptores PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . Os resultados sugerem que o GQ-19, na concentração de 10^{-5} mol/L, ativa o receptor PPAR γ atuando como um agonista parcial desse (Figura 6), mas não tem atividade frente às outras isoformas de PPAR (Figura 6). Por sua vez, o extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. não ativou nenhuma isoforma de PPAR (Figura 6), o que sugere que a ativação de SOD e catalase promovida por esse extrato, observada em trabalho prévio (FREITAS PIRES *et al.*, 2022) não ocorreu via PPAR.

De acordo com um estudo anteriormente publicado, o ácido abiético (AA), um composto encontrado em espécies de coníferas como o pinheiro, age como um ativador parcial de PPAR α e PPAR γ , e tem a capacidade de inibir a sobre-expressão de MMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação UV (CHOI, 2020; JEON, Y. *et al.*, 2015). O AA apresenta uma taxa de ativação de PPAR γ próxima a 2 na concentração de 200 μ mol/L (JEON, Y. *et al.*, 2015) e o GQ-19 na concentração de 10^{-6} mol/L apresentou uma taxa de ativação de 2,76. Também já foi mostrado na literatura que a fração de cloreto de metileno encontrada na fruta de *Kochia scoparia*, uma planta da família *Amaranthaceae*, utilizada na medicina tradicional para tratar uma série de doenças, incluindo problemas de pele e doenças inflamatórias e alérgicas, também age como um ativador parcial dos receptores PPAR α e PPAR γ , e é capaz de reduzir a superexpressão de MMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação UV (JEON, H. *et al.*, 2016). Da mesma forma, a fração de cloreto de metileno da semente seca de *Rosa multiflora*, rosa nativa do Leste Asiático, mostrou atividade agonista parcial duplo de PPAR α e PPAR γ e foi capaz de inibir a superexpressão de MMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação UV. Em ambos os trabalhos, as frações dos extratos apresentaram taxa de ativação do PPAR γ de aproximadamente 3 vezes (JEON, H. *et al.*, 2016). Comparado a esses resultados, a taxa de ativação que o GQ-19 apresentou para o PPAR γ sugeriu que este composto também pudesse atuar evitando a superexpressão de MMP-1 em fibroblastos dérmicos humanos expostas à radiação UV.

As MMPs são um grupo de mais de vinte enzimas, com destaque para a MMP-1, também chamada de colagenase tipo I, que possui a habilidade única de degradar o colágeno fibrilar tipo I intacto. Além disso, temos a MMP-2, conhecida como colagenase de tipo IV, que é capaz de quebrar colágenos desnaturados e também os presentes na membrana basal (BOCHEVA *et al.*, 2022; CHIANG *et al.*, 2012; KIM, H. K., 2016; XUAN *et al.*, 2018).

O colágeno é o principal componente da MEC dérmica e as ROS em excesso aumentam a expressão de collagenase (BOCHEVA *et al.*, 2022; CHATATIKUN; CHIABCHALARD, 2017). Em particular, a MMP-1, induzida por UVB ou ROS, inicia a degradação de TGF- β , elastina e colágeno tipos I, II e III, especialmente pró-colágeno tipo I. Estas cascatas também induzem a inflamação e apoptose das células, acelerando ainda mais o processo de envelhecimento da pele (BOCHEVA *et al.*, 2022; CHIANG *et al.*, 2012; SUBEDI *et al.*, 2017). Portanto, a degradação excessiva de colágeno e da MEC por MMPs induzidas por UV é uma característica da pele foto-danificada, e a MMP é usada como um dos principais marcadores de fotoenvelhecimento induzido por UV, bem como a inflamação da pele (BOCHEVA *et al.*, 2022; CHIANG *et al.*, 2012; CHOI, 2020; KIM, H. K., 2016; OH, J. H. *et al.*, 2021).

A inibição da collagenase tem sido proposta, dessa forma, como uma forma de prevenir o envelhecimento da pele, que pode levar à instalação de doenças inflamatórias e até do câncer de pele. Neste trabalho foi avaliada a capacidade de inibição da collagenase pelo extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. e pelo GQ-19. O resultado deste ensaio sugere que tanto o extrato do fungo endofítico como o GQ-19 foram capazes de inibir a atividade da collagenase. O extrato, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de inibir em 85,67% e o GQ-19, nas concentrações de 10^{-6} mol/L e 10^{-5} mol/L inibiu em 61,33% e 72,5%, respectivamente, a atividade da enzima (Figura 7).

O extrato das folhas da *Michelia alba*, que apresenta atividade protetora em fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação ultravioleta, através da atenuação da expressão de MMP-1, MMP-3 e MMP-9, promovendo recuperação da síntese de colágeno (CHIANG *et al.*, 2012), na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de inibir a atividade da collagenase em 100%. O extrato das folhas de *Terminalia catappa* L. (Combretaceae), que tem efeitos antioxidantes por eliminação de radicais superóxido, atividade anti-HIV, efeitos hepatoprotetores e anti-inflamatórios e diminuição da expressão proteica de MMP-2 e MMP-9 em células de câncer de pulmão, foi capaz de inibir a atividade da collagenase em 100% também na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (WEN *et al.*, 2011). Dessa forma, pode-se considerar que o extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. extraído das folhas de *Bauhinia variegata* apresenta uma relevante capacidade de inibir a atividade da collagenase visto que na metade da concentração dos extratos citados inibiu em 85,67% a atividade da collagenase. O mesmo pode ser observado para o GQ-19, que também apresentou uma alta capacidade de inibir a atividade da collagenase (Figura 7).

A atividade das MMPs é meteticulosamente controlada pela regulação da taxa de conversão das pró-enzimas em sua forma catalítica por uma família de inibidores específicos, chamados TIMPs. Esses TIMPs têm o poder de inibir diretamente a atividade proteolítica das

MMPs, formando complexos covalentes numa proporção de 1:1. O equilíbrio na expressão de MMP-1 pela TIMP-1 é fundamental para garantir um controle eficiente da degeneração da MEC (CHOI, 2020; PARK; SIM; KIM, 2017).

A exposição à radiação UVB também afeta a expressão de TIMPs e a regulação positiva da TIMP-1 pode reduzir a colagenólise e a elastólise que ocorrem durante o fotoenvelhecimento da pele. Além disso, o TIMP-1 regula a proliferação, a apoptose, a diferenciação, a migração e a angiogênese através de diferentes vias de sinalização em fibroblastos dérmicos (CHOI, 2020; HUANG, C. Y. *et al.*, 2017; PARK, Y. *et al.*, 2015).

No presente estudo foram quantificadas a expressão gênica de TIMP-1 e COL-1 pelo ensaio de RT-qPCR após tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com o extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. na concentração de 50 µg/mL ou GQ-19 na concentração de 10^{-6} mol/L e indução do estresse oxidativo com H₂O₂ 300 µmol/L ou pela exposição das células a radiação UVA na dose de 5 J/cm².

O impacto do tratamento com H₂O₂ 300 µmol/L na expressão de colágeno foi uma redução significativa de 81,89%. Já a exposição à radiação UVA (5 J/cm²) resultou em uma redução ainda maior, de 90,44% (Figura 10 e Figura 11). Isso indica que tanto o tratamento com H₂O₂ 300 µmol/L quanto irradiação com UVA foram métodos eficazes na indução do estresse oxidativo nas células, e eficazes em simular parte dos danos causados pelo envelhecimento. No entanto, quando as células foram tratadas previamente com GQ-19 na concentração de 10^{-6} mol/L e, em seguida, expostas a H₂O₂ 300 µmol/L, houve um aumento de 131,37% na expressão de colágeno em comparação com os fibroblastos não expostos ao estresse oxidativo (Figura 10). Isso sugere que o tratamento com GQ-19 não apenas protege as células contra a degradação do colágeno, mas também estimula a sua síntese. Esse efeito protetor à degradação do colágeno está em concordância com o resultado observado no ensaio de ativação do PPAR γ , visto que, ao ativar PPAR γ o composto pode diminuir a expressão de MMP e, consequentemente, a degradação do colágeno. Esses resultados sugerem a eficácia do tratamento com GQ-19 na proteção e estímulo da síntese de colágeno. Isso pode ter implicações importantes no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o envelhecimento e danos causados pelo sol à pele.

Ao tratarmos os fibroblastos com GQ-19 na concentração de 10^{-6} mol/L, tanto isoladamente quanto em conjunto com radiação UVA, não observamos resultados positivos. No entanto, quando as células entraram em contato com GQ-19 e uma concentração de H₂O₂ 300 µmol/L, a expressão gênica de colágeno do tipo I foi aprimorada significativamente. Isso

sugere que o tratamento das células com GQ-19 tem um efeito positivo em reverter alguns danos causados pelo estresse oxidativo induzido por H₂O₂ (Figura 10 e Figura 11).

O tratamento dos fibroblastos com a rosiglitazona 10⁻⁵ mol/L (controle positivo do PPAR γ) apresentou uma tendência de aumentou na expressão do colágeno tipo I, tanto em comparação com as células não submetidas à radiação UVA, quanto no caso em que os fibroblastos foram tratados com a rosiglitazona e expostos ao UVA em comparação com os que foram apenas submetidos a radiação UVA (Figura 11). Já o tratamento com o antagonista de PPAR γ seguido do tratamento com a rosiglitazona 10⁻⁵ mol/L, impediu essa resposta, visto que utilizando ambos os tratamentos e expondo a radiação UVA, a resposta se manteve a mesma do que quando as células foram apenas expostas à radiação UVA (Figura 11). Esses dados destacam a importância das estratégias de ativação do PPAR γ na prevenção e tratamento de doenças relacionadas à degradação do colágeno.

Um estudo conduzido com derivados de S-metilmetionina sulfônio (SMMS), composto que confere cicatrização de feridas e efeitos fotoprotetores na pele, mostrou que esses compostos recuperam a expressão do mRNA do colágeno tipo I que havia sido regulado negativamente pela irradiação UVB (KIM, W. S. *et al.*, 2018). Também foi encontrado na literatura que *Panax ginseng* (ginseng vermelho) contém ginsenosídeo Rg3, um dos principais ginsenosídeos, que tem atividade antioxidante, antitumoral, antimelanogênese, crescimento do cabelo e efeitos antienvhecimento na pele humana (NAM *et al.*, 2017). O extrato de ginseng vermelho, contendo altas concentrações de ginsenosídeo Rg3 (GERg3), na concentração de 1 ppm foi capaz de aumentar a expressão de colágeno do tipo I após exposição à radiação UVB, entretanto, o UVA foi associado a uma diminuição na recuperação do pró-colágeno tipo I com o tratamento com GERg3 (NAM *et al.*, 2017). Observa-se que os estudos encontrados que avaliam a expressão de colágeno do tipo I são com exposição à radiação UVB, sendo encontrado, em relação à radiação UVA, apenas dados do pró-colágeno tipo I, que não foi tão efetivo quanto os tratamentos associados à radiação UVB.

De fato, acredita-se que a radiação UVA desempenhe um papel crucial no envelhecimento da pele, uma vez que representa mais de 80% da radiação UV total que recebemos diariamente. Além disso, o UVA é capaz de penetrar de 5 a 10 vezes mais profundamente na derme reticular do que a radiação UVB. Como resultado, a radiação UVA causa danos significativos à MEC da pele em comparação com a UVB (BOCHEVA *et al.*, 2022). Esse efeito da radiação UVA baseia-se no aumento da transcrição de MMPs, com destaque para a enzima colagenolítica MMP-1 em fibroblastos dérmicos. Esse aumento provoca uma degradação significativa do colágeno e, ao mesmo tempo, inibe a formação de pró-

colágeno. (BOCHEVA *et al.*, 2022). Dessa forma, pode ser que a proteção à degradação do colágeno promovida pela radiação UVB seja mais evidente para tratamentos feitos com agonistas de PPAR γ e, por isso, nossos resultados não se apresentaram tão promissores.

Em relação à expressão de TIMP-1, observou-se que a expressão de TIMP-1 foi aumentada tanto pela indução de estresse oxidativo com H₂O₂ 300 μ mol/L quanto pela irradiação com UVA (5 J/cm²), em 48,01% e 115,80%, respectivamente (Figura 10 e Figura 11). No entanto, ao tratar os fibroblastos com rosiglitazona 10⁻⁵ mol/L e o antagonista de PPAR γ antes da exposição à radiação UVA seguido da irradiação com UVA, foi possível observar a redução da expressão de TIMP-1 em 151,56% em comparação com as células apenas expostas à irradiação. Além disso, o tratamento com extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. em combinação com GQ-19, seguido da exposição ao UVA, resultou em uma diminuição de 184,36% na expressão de TIMP-1.

A exposição da pele ao sol desencadeia uma série de reações nas células, uma delas é a regulação positiva dos TIMPs (SÁRDY, 2009). Em um estudo realizado por Lahmann *et al.* em 2001, foi demonstrado que o TIMP-1 inibe a atividade proteolítica da MMP-1, ligando-se a ela quando está ativa. Além disso, o TIMP-1 regula a atividade de várias outras MMPs, exceto a MMP-1 de membrana e a MMP-2. Os pesquisadores observaram que o pico de indução de mRNA do TIMP-1 ocorre após 24 horas (LAHMANN *et al.*, 2001), o que justifica o aumento observado em nosso estudo após indução de estresse oxidativo nas células ou exposição à radiação UVA.

Os resultados mostram que é possível regular a expressão de TIMP-1 por meio do tratamento com extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. e GQ-19. Essas descobertas são importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem controlar a expressão de TIMP-1 em condições de estresse oxidativo e exposição à radiação UVA.

Neste estudo além de quantificar a expressão gênica de TIMP-1 e COL-1, também foi quantificada a expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-3 pelo ensaio de RT-qPCR após tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com o extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. na concentração de 50 μ g/mL ou GQ-19 na concentração de 10⁻⁶ mol/L e exposição das células à radiação UVA (5 J/cm²).

A exposição à radiação UVA resultou em um aumento de 276,10% na expressão de MMP-3. No entanto, não se observou o mesmo efeito para as MMP-1 e MMP-2, sendo que a primeira se manteve constante e a segunda registrou uma redução significativa de 98,81% (Figura 11). Quando analisamos os diferentes tratamentos utilizados, nota-se que todos eles apresentaram uma tendência de reduzir a expressão da MMP-3 em comparação com os

fibroblastos apenas irradiados. Entretanto, merece destaque um tratamento em particular, que consistiu na combinação da fração metanólica do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. com o composto GQ-19. Esse tratamento mostrou uma redução significativa de 289,47% na expressão da MMP-3 quando comparado aos fibroblastos apenas irradiados com UVA (5 J/cm²) (Figura 11).

No estudo realizado por Xuan *et al.* em 2018, foi demonstrado que o extrato de galho de *S. commixta*, utilizado para tratar doenças como asma, tosse e outros distúrbios brônquicos, apresentou resultados significativos na inibição da expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-3 induzida por UVB, em concentrações de 12,5 a 50 µg/mL. Além disso, observou-se uma regulação negativa na geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (XUAN *et al.*, 2018). Outra pesquisa revelou que a exposição à UVA (8 J/cm²) aumentou consideravelmente a expressão de MMP-1, MMP-3 e MMP-9, em comparação com o grupo não irradiado. Esse mesmo estudo, observou que após irradiar as células com UVA na dose de 8 J/cm² e em seguida tratar com santamarina a 10 µmol/L, uma lactona sesquiterpênica isolada de *Artemisia scoparia*, houve a inibição de forma dose-dependente da expressão de mRNA de MMP-1, MMP-3 e MMP-9 (OH, J. H. *et al.*, 2021). Um estudo com extrato produzido a partir do *pellet* de *Arthrospira platensis*, uma alga azul-verde comestível (cianobactérias) que possui numerosas propriedades biológicas, como antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana e hepatoprotetora, *in vitro* e *in vivo*, mostrou que o mesmo é capaz de proteger fibroblastos dérmicos humanos da superexpressão de MMP-1 e MMP-3 após a exposição à radiação UVB, mas não é capaz de impedir a diminuição da expressão de colágeno do tipo I e III após a exposição à radiação UVB (LEE, J.-J. *et al.*, 2017).

Dessa forma, pode-se considerar que a combinação do tratamento do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. extraído das folhas de *Bauhinia variegata* com GQ-19 revelou uma notável capacidade de reduzir a expressão de MMP-3, com uma diminuição de 289,47% em sua expressão. No entanto, não foi observado o mesmo efeito nas demais MMPs.

Em um estudo anterior realizado por Lahmann *et al.* em peles expostas à radiação solar simulada, foi constatado que a expressão de MMP-1 era mais significativa em fumantes, enquanto os não fumantes apresentavam valores muito baixos. Além disso, foi observado que a expressão máxima de MMP-1 ocorreu após 16 horas de exposição à radiação. Esses resultados sugerem que a análise da expressão de MMP-1 após 24 horas de radiação UVA pode ter influenciado nos resultados encontrados. Uma possibilidade futura é avaliar o efeito do GQ-19 e do extrato de *Phomopsis* sp. em fibroblastos extraídos da pele de fumantes, como feito por Lahmann *et al.*, para avaliar os compostos em células com diferentes padrões de expressão.

A ativação de NF- κ B desencadeada por ROS conduz a uma elevação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e MMPs, e acredita-se que a irradiação UVA e UVB, e o calor gerado pela IR, estimulem a expressão de MMP-1 e MMP-3 indiretamente por meio da indução da expressão de IL-6 de forma autócrina (BOCHEVA *et al.*, 2022; NAM *et al.*, 2017).

No presente estudo foram determinados os níveis de IL-6 e IL-1 β pelo ensaio de ELISA após o tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com o extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. na concentração de 50 μ g/mL ou GQ-19 na concentração de 10^{-6} mol/L e exposição das células à radiação UVA na dose de UVA 5 J/cm².

A exposição à irradiação resultou em um aumento de 1.790,94% nos níveis de IL-6 em comparação com as células que não foram expostas à radiação UVA (5 J/cm²), entretanto, todos os tratamentos testados também aumentaram os níveis de IL-6 (Figura 12). Em relação a IL-1 β , a exposição à irradiação resultou em um aumento de 503,33% e todos os tratamentos suprimiram os níveis de IL-1 β (Figura 12). Diante disso, a submissão das células à radiação UVA na dose de 5 J/cm² foi efetiva em aumentar os níveis de IL-6 e IL-1 β , em relação aos dados encontrados na literatura. Entretanto, os resultados não permitiram concluir se os efeitos positivos dos tratamentos com GQ-19 e fração metanólica do extrato de *Phomopsis* sp. ocorreram via expressão de IL-6 e IL-1 β . Estudos complementares devem ser feitos a fim de verificar qual via prevalece na contribuição da redução da expressão de MMP-3 após o tratamento com a fração metanólica do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. e GQ-19.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

- O composto sintético GQ-19 nas concentrações 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L e 10^{-5} mol/L não foi citotóxico para a cultura de fibroblastos humanos mesmo em conjunto com a radiação UVA na dose de 5 J/cm².
- A fração metanólica do extrato bruto metanólico do micélio do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado das folhas da *Bauhinia variegata* nas concentrações 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL em conjunto com a radiação UVA na dose de 5 J/cm² não foi citotóxica para a cultura de fibroblastos humanos.
- A fração metanólica do extrato bruto metanólico do micélio do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado das folhas da *Bauhinia variegata* possui atividade antioxidante.
- O composto sintético GQ-19 não induz o aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase nas células.
- O composto sintético GQ-19 na concentração de 10^{-5} mol/L apresentou ação agonista parcial ao receptor PPAR γ .
- A fração metanólica do extrato bruto metanólico do micélio do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado das folhas da *Bauhinia variegata*, nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, não mostrou ação agonista aos receptores PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ .
- O composto sintético GQ-19 nas concentrações de 10^{-6} mol/L e 10^{-5} mol/L reduziu a atividade da collagenase *in vitro*.
- A fração metanólica do extrato bruto metanólico do micélio do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado das folhas da *Bauhinia variegata* na concentração de 500 µg/mL reduziu a atividade da collagenase *in vitro*.
- A exposição dos fibroblastos dérmicos humanos à radiação UVA na dose de 5 J/cm² aumentou a expressão de TIMP-1 e MMP-3, e reduziu a expressão de colágeno do tipo I e MMP-2.
- O tratamento com o composto sintético GQ-19 na concentração de 10^{-6} mol/L em células induzidas ao estresse oxidativo com H₂O₂ a 300 µM aumentou a expressão de colágeno do tipo I na cultura de fibroblastos.
- O tratamento dos fibroblastos com o composto sintético GQ-19 na concentração de 10^{-6} mol/L em associação com a fração metanólica do extrato bruto metanólico do micélio do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado das folhas da *Bauhinia variegata* na concentração de

50 µg/mL seguido da exposição das células à radiação UVA (5 J/cm²) diminuiu a expressão de TIMP-1 e MMP-3.

- A exposição dos fibroblastos à radiação UVA na dose de 5 J/cm² aumentou os níveis de IL-6 e IL-1β.

Em resumo, os resultados deste trabalho sugerem que a fração metanólica do extrato bruto metanólico do micélio do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado das folhas da *Bauhinia variegata* possui atividade antioxidante e não tem atividade agonista frente aos PPARs, em contrapartida, o composto sintético GQ-19 não possui atividade antioxidante e tem atividade agonista frente ao PPARγ. Além disso, ambos reduzem a atividade da collagenase *in vitro*. A junção de suas ações complementares resultou na diminuição da expressão de MMP-3. Isso abre portas para novas pesquisas e aplicações na área da saúde, onde a busca por substâncias naturais e sintéticas com propriedades terapêuticas é de extrema importância.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AEBI, H. **Oxygen Radicals in Biological Systems**. *Methods in Enzymology*, [s.l.], v. 105, nº 1947, p. 121–126, 1984. ISBN: 9780121820053, ISSN: 00766879, DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.

AGRAWAL, R.; PANDEY, S. **Evaluation of Anticarcinogenic and Antimutagenic Potential of *Bauhinia variegata* Extract in Swiss Albino Mice**. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, [s.l.], v. 10, nº 5, p. 913–916, 2009. ISSN: 2476762X.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. **Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v. 90, nº 6, p. 1829–1845, 2011. ISSN: 01757598, DOI: 10.1007/s00253-011-3270-y.

ANJUM, N. A. et al. **Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants**. *Environmental Science and Pollution Research*, [s.l.], v. 23, nº 19, p. 19002–19029, 2016. ISSN: 16147499, DOI: 10.1007/s11356-016-7309-6.

AZEVEDO MARTINS, T. E. et al. **Contribution of Topical Antioxidants to Maintain Healthy Skin—A Review**. *Scientia Pharmaceutica*, [s.l.], v. 88, nº 2, p. 27, 2020. ISSN: 2218-0532, DOI: 10.3390/scipharm88020027.

BABIZHAYEV, M. A.; YEGOROV, Y. E. **Tissue formation and tissue engineering through host cell recruitment or a potential injectable cell-based biocomposite with replicative potential: Molecular mechanisms controlling cellular senescence and the involvement of controlled transient telomerase**. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, [s.l.], v. 103, nº 12, p. 3993–4023, 2015. ISSN: 15524965, DOI: 10.1002/jbm.a.35515.

BASHANDY, S. A. E. et al. ***Allium porrum* and *Bauhinia variegata* Mitigate Acute Liver Failure and Nephrotoxicity Induced by Thioacetamide in Male Rats**. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, [s.l.], v. 35, nº 2, p. 147–157, 2020. ISBN: 1229101808035, ISSN: 09740422, DOI: 10.1007/s12291-018-0803-5.

BOCHEVA, G. et al. **Protective Role of Melatonin and Its Metabolites in Skin Aging**. *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 23, nº 3, p. 1–23, 2022. ISSN: 14220067, DOI: 10.3390/ijms23031238.

BOSCH, R. et al. **Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals**. *Antioxidants*, [s.l.], v. 4, nº 2, p. 248–268, 2015. ISSN: 20763921, DOI: 10.3390/antiox4020248.

BRIGANTI, S. et al. **Modulation of PPAR γ provides new insights in a stress induced premature senescence model**. *PLoS ONE*, [s.l.], v. 9, nº 8, 2014. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0104045.

CHAPLA, V. M. et al. **Bioactive secondary metabolites from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus from *Senna spectabilis***. *Molecules*, [s.l.], v. 19, nº 5, p. 6597–6608, 2014. ISSN: 14203049, DOI: 10.3390/molecules19056597.

CHATATIKUN, M.; CHIABCHALARD, A. **Thai plants with high antioxidant levels, free radical scavenging activity, anti-tyrosinase and anti-collagenase activity.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, [s.l.], v. 17, n° 1, p. 1–9, 2017. ISBN: 1290601719947, ISSN: 14726882, DOI: 10.1186/s12906-017-1994-7.

CHEN, L. *et al.* **Rosiglitazone ameliorates senescence-like phenotypes in a cellular photoaging model.** *Journal of Dermatological Science*, [s.l.], v. 77, n° 3, p. 173–181, 2015. ISSN: 1873569X, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2015.01.007.

CHIANG, H. M. *et al.* ***Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts.** *Food and Chemical Toxicology*, [s.l.], v. 50, n° 12, p. 4260–4269, 2012. ISSN: 02786915, DOI: 10.1016/j.fct.2012.08.018.

CHOI, Y. J. **Shedding light on the effects of calorie restriction and its mimetics on skin biology.** *Nutrients*, [s.l.], v. 12, n° 5, 2020. ISSN: 20726643, DOI: 10.3390/nu12051529.

CHONG, H. C. *et al.* **Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPAR β / δ is essential for skin homeostasis and wound healing.** *Journal of Cell Biology*, [s.l.], v. 184, n° 6, p. 817–831, 2009. ISSN: 00219525, DOI: 10.1083/jcb.200809028.

COELHO, M. S. *et al.* **GQ-16, a TZD-derived partial PPAR γ agonist, induces the expression of thermogenesis-related genes in brown fat and visceral white fat and decreases visceral adiposity in obese and hyperglycemic mice.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 11, n° 5, p. 1–20, 2016. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0154310.

CUI, B. *et al.* **Resveratrol Treats UVB-Induced Photoaging by Anti-MMP Expression, through Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiapoptotic Properties, and Treats Photoaging by Upregulating VEGF-B Expression.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [s.l.], v. 2022, 2022. ISSN: 19420994, DOI: 10.1155/2022/6037303.

CUI, J. L. *et al.* **Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from alpine plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis*.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 10, n° 3, p. 1–16, 2015. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0118204.

DAS, S.; KUMAR, R.; RAO, B. S. S. **Radio-modifying potential of *Saraca indica* against ionizing radiation: an in vitro study using Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells.** *Cell Biology International*, [s.l.], v. 39, n° 9, p. 1061–1072, 2015. ISSN: 10656995, DOI: 10.1002/cbin.10480.

DEMENI, P. C. E. *et al.* **Endophytic Fungi from *Alstonia boonei* de Wild and *Greenwayodendron suaveolens* (Engl. And Diels) Verdc. subsp. *Suaveolens* Possess Inhibitory Activity against Pneumonia Causing Bacteria.** *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, [s.l.], v. 2021, 2021. ISSN: 17414288, DOI: 10.1155/2021/9966323.

DI-POI, N. *et al.* **Functions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in skin homeostasis.** *Lipids*, [s.l.], v. 39, n° 11, p. 1093–1099, 2004. ISSN: 00244201, DOI: 10.1007/s11745-004-1335-y.

DIDIER, C. *et al.* **Induction of thioredoxin by ultraviolet-A radiation prevents oxidative-**

mediated cell death in human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, [s.l.], v. 31, n° 5, p. 585–598, 2001. ISSN: 08915849, DOI: 10.1016/S0891-5849(01)00617-7.

FATIMA, N. *et al.* **Biological evaluation of endophytic fungus *Chaetomium* sp. NF15 of *Justicia adhatoda* L.: A potential candidate for drug discovery.** *Jundishapur Journal of Microbiology*, [s.l.], v. 9, n° 6, 2016. ISSN: 20084161, DOI: 10.5812/jjm.29978.

FLORI, E. *et al.* **The activation of PPAR γ by 2,4,6-Octatrienoic acid protects human keratinocytes from UVR-induced damages.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, n° 1, p. 1–15, 2017. ISBN: 4159801709578, ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/s41598-017-09578-3.

FREITAS PIRES, D. G. *et al.* **Antioxidant activity of mycelia methanolic extracts of endophytic fungi BvFV and BvFIX isolated from leaves of *Bauhinia variegata*.** *Frontiers in Fungal Biology*, [s.l.], v. 3, n° December, p. 1–14, 2022. DOI: 10.3389/ffunb.2022.1048734.

GAO, W. *et al.* ***Pterocarpus santalinus* L. Regulated Ultraviolet B Irradiation-induced Procollagen Reduction and Matrix Metalloproteinases Expression Through Activation of TGF- β /Smad and Inhibition of the MAPK/AP-1 Pathway in Normal Human Dermal Fibroblasts.** *Photochemistry and Photobiology*, [s.l.], v. 94, n° 1, p. 139–149, 2018. ISSN: 17511097, DOI: 10.1111/php.12835.

GENG, R. *et al.* **Boosting the photoaged skin: The potential role of dietary components.** *Nutrients*, [s.l.], v. 13, n° 5, p. 1–27, 2021. ISSN: 20726643, DOI: 10.3390/nu13051691.

GUL, H. *et al.* **Quantification of biochemical compounds in *Bauhinia Variegata* Linn flower extract and its hepatoprotective effect.** *Saudi Journal of Biological Sciences*, [s.l.], v. 28, n° 1, p. 247–254, 2021. ISSN: 1319562X, DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.09.056.

GUPTA, P. S.; SINGH, S. K.; TRIPATHI, A. K. **Pharmacopuncture of *Bauhinia variegata* nanoemulsion formulation against diabetic peripheral neuropathic pain.** *Journal of Pharmacopuncture*, [s.l.], v. 23, n° 1, p. 30–36, 2020. ISSN: 22346856, DOI: 10.3831/KPI.2020.23.005.

HAM, S. A. *et al.* **PPAR δ inhibits UVB-induced secretion of MMP-1 through MKP-7-mediated suppression of JNK signaling.** *Journal of Investigative Dermatology*, [s.l.], v. 133, n° 11, p. 2593–2600, 2013. ISSN: 15231747, DOI: 10.1038/jid.2013.202.

HRIDOY, M. *et al.* **Putative Anticancer Compounds from Plant-Derived Endophytic Fungi: A Review.** *Molecules*, [s.l.], v. 27, n° 1, 2022. ISSN: 14203049, DOI: 10.3390/molecules27010296.

HUANG, C. Y. *et al.* **Compounds isolated from *Eriobotrya deflexa* leaves protect against ultraviolet radiation B-induced photoaging in human fibroblasts.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, [s.l.], v. 175, n° September, p. 244–253, 2017. ISSN: 18732682, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.08.042.

HUANG, W. Y. *et al.* **A potential antioxidant resource: Endophytic fungi from medicinal plants.** *Economic Botany*, [s.l.], v. 61, n° 1, p. 14–30, 2007. ISSN: 00130001, DOI: 10.1663/0013-0001(2007)61[14:APAREF]2.0.CO;2.

HWANG, E. *et al.* **Enzyme-modified *Panax ginseng* inhibits UVB-induced skin aging through the regulation of procollagen type i and MMP-1 expression.** *Food and Function*, [s.l.], v. 5, n° 2, p. 265–274, 2014. ISSN: 20426496, DOI: 10.1039/c3fo60418g.

HWANG, E. *et al.* **Myrcene, an Aromatic Volatile Compound, Ameliorates Human Skin Extrinsic Aging via Regulation of MMPs Production.** *American Journal of Chinese Medicine*, [s.l.], v. 45, n° 5, p. 1113–1124, 2017. ISSN: 0192415X, DOI: 10.1142/S0192415X17500604.

IM, A. R. *et al.* **Protective effect of fermented *Cyclopia intermedia* against UVB-induced damage in HaCaT human keratinocytes.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, [s.l.], v. 16, n° 1, p. 1–10, 2016. ISSN: 14726882, DOI: 10.1186/s12906-016-1218-6.

JACKSON, M. *et al.* **Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. I. Production, taxonomy of the producing organism and biological activity.** *The Journal of Antibiotics*, [s.l.], v. 46, n° 1, p. 34–38, 1993. ISSN: 0021-8820, DOI: 10.7164/antibiotics.46.34.

JEON, H. *et al.* **A Mixture of Extracts of *Kochia scoparia* and *Rosa multiflora* with PPAR α/γ Dual Agonistic Effects Prevents Photoaging in Hairless Mice.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 17, n° 11, p. 1919, 2016. ISSN: 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms17111919.

JEON, Y. *et al.* **Abietic acid inhibits UVB-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblast cells through PPAR α/γ dual activation.** *Experimental Dermatology*, [s.l.], v. 24, n° 2, p. 140–145, 2015. ISSN: 16000625, DOI: 10.1111/exd.12616.

JIN, S. G.; PADRON, F.; PFEIFER, G. P. **UVA Radiation, DNA Damage, and Melanoma.** *ACS Omega*, [s.l.], v. 7, n° 37, p. 32936–32948, 2022. ISSN: 24701343, DOI: 10.1021/acsomega.2c04424.

JUNG, H. *et al.* **The methoxyflavonoid isosakuranetin suppresses UV-B-induced matrix metalloproteinase-1 expression and collagen degradation relevant for skin photoaging.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 17, n° 9, p. 1–9, 2016. ISSN: 14220067, DOI: 10.3390/ijms17091449.

JUNG, Y. R. *et al.* **Upregulation of Collagen Expression via PPAR β/δ Activation in Aged Skin by Magnesium Lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza*.** *Journal of Natural Products*, [s.l.], v. 78, n° 8, p. 2110–2115, 2015. ISSN: 15206025, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00348.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. **Oxidation events and skin aging.** *Ageing Research Reviews*, [s.l.], v. 21, p. 16–29, 2015. ISSN: 18729649, DOI: 10.1016/j.arr.2015.01.001.

KATSUYAMA, Y. *et al.* **3-O-Laurylglycerol ascorbate activates the intracellular antioxidant system through the contribution of PPAR- γ and Nrf2.** *Journal of Dermatological Science*, [s.l.], v. 82, n° 3, p. 189–196, 2016. ISSN: 1873569X, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.03.002.

KIM, B.; CHOI, Y. E.; KIM, H. S. ***Eruca sativa* and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improveskin barrier function by activation of peroxisome proliferator-**

activated receptor (PPAR)- α and suppression of inflammatory cytokines. *Phytotherapy Research*, [s.l.], v. 28, n° 9, p. 1359–1366, 2014. ISSN: 10991573, DOI: 10.1002/ptr.5138.

KIM, H. K. Garlic supplementation ameliorates UV-Induced photoaging in hairless mice by regulating antioxidative activity and MMPs expression. *Molecules*, [s.l.], v. 21, n° 1, 2016. ISSN: 14203049, DOI: 10.3390/molecules21010070.

KIM, J. C.; PARK, T. J.; KANG, H. Y. Skin-Aging Pigmentation: Who Is the Real Enemy? *Cells*, [s.l.], v. 11, n° 16, 2022. ISSN: 20734409, DOI: 10.3390/cells11162541.

KIM, J. K. et al. 5,7-Dimethoxyflavone, an activator of PPAR α / γ , inhibits UVB-induced MMP expression in human skin fibroblast cells. *Experimental Dermatology*, [s.l.], v. 21, n° 3, p. 211–216, 2012. ISSN: 09066705, DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01435.x.

KIM, K. H. et al. Pro-MMP-2 activation by the PPAR γ agonist, ciglitazone, induces cell invasion through the generation of ROS and the activation of ERK. *FEBS Letters*, [s.l.], v. 581, n° 17, p. 3303–3310, 2007. ISSN: 00145793, DOI: 10.1016/j.febslet.2007.06.012.

KIM, W. S. et al. Development of S-methylmethionine sulfonium derivatives and their skin-protective effect against ultraviolet exposure. *Biomolecules and Therapeutics*, [s.l.], v. 26, n° 3, p. 306–312, 2018. ISSN: 20054483, DOI: 10.4062/biomolther.2017.109.

KONGER, R. L. et al. Epidermal PPAR γ influences subcutaneous tumor growth and acts through TNF- α to regulate contact hypersensitivity and the acute photoresponse. *Oncotarget*, [s.l.], v. 8, n° 58, p. 98184–98199, 2017. ISSN: 19492553, DOI: 10.18632/oncotarget.21002.

KUMAR, V. et al. Endophytic Fungi: Novel Sources of Anticancer Molecules. *Advances in Endophytic Research*. New Delhi: Springer India, 2014. p. 389–422. ISBN: 9788132215752, DOI: 10.1007/978-81-322-1575-2_20.

LAHMANN, C. et al. Induction of mRNA for Matrix Metalloproteinase 1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Human Skin in vivo by Solar Simulated Radiation. *Photochemistry and Photobiology*, [s.l.], v. 73, n° 6, p. 657, 2001. ISSN: 0031-8655, DOI: 10.1562/0031-8655(2001)073<0657:iomfmm>2.0.co;2.

LAVERS, I. Exploring skin anatomy, function and site-specific treatment options. *Journal of Aesthetic Nursing*, [s.l.], v. 6, n° 4, p. 172–180, 2017. ISSN: 2050-3717, DOI: 10.12968/joan.2017.6.4.172.

LEE, H. et al. Anti-aging effects of *Piper cambodianum* P. Fourn. extract on normal human dermal fibroblast cells and a wound-healing model in mice. *Clinical Interventions in Aging*, [s.l.], v. 11, p. 1017–1026, 2016. ISSN: 11781998, DOI: 10.2147/CIA.S107734.

LEE, J.-J. et al. Protective effect of *Arthrospira platensis* extracts against ultraviolet B-induced cellular senescence through inhibition of DNA damage and matrix metalloproteinase-1 expression in human dermal fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, [s.l.], v. 173, p. 196–203, 2017. ISSN: 10111344, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.05.042.

LIN, C. J.; BARBOSA, A. S. **Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, [s.l.], v. 46, nº 4, p. 11, 2002. ISSN: 0004-2730, DOI: 10.1590/S0004-27302002000400004.

LIU, X. *et al.* **Biotransformation ability of endophytic fungi: from species evolution to industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v. 105, nº 19, p. 7095–7113, 2021. ISBN: 0123456789, ISSN: 14320614, DOI: 10.1007/s00253-021-11554-x.

LIU, Y. *et al.* **Isolation and identification of resveratrol-producing endophytes from wine grape Cabernet Sauvignon.** *SpringerPlus*, [s.l.], v. 5, nº 1, 2016. ISSN: 21931801, DOI: 10.1186/s40064-016-2571-0.

LOWRY, O. H. *et al.* **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *The Journal of biological chemistry*, [s.l.], v. 193, nº 1, p. 265–75, 1951. ISBN: 0021-9258 (Print)r0021-9258 (Linking), ISSN: 0021-9258.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. **Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase.** *European Journal of Biochemistry*, [s.l.], v. 47, nº 3, p. 469–474, 1974. ISSN: 14321033, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.

MCCABE, M. C. *et al.* **Alterations in extracellular matrix composition during aging and photoaging of the skin.** *Matrix Biology Plus*, [s.l.], v. 8, p. 100041, 2020. ISSN: 25900285, DOI: 10.1016/j.mbplus.2020.100041.

MESQUITA, P. G. *et al.* **Metabolites of endophytic fungi isolated from leaves of *Bauhinia variegata* exhibit antioxidant activity and agonist activity on peroxisome proliferator-activated receptors α , β/δ and γ .** *Frontiers in Fungal Biology*, [s.l.], v. 3, nº December, p. 1–17, 2022. DOI: 10.3389/ffunb.2022.1049690.

MIAO, L.; CLAIR, D. K. ST. **Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease.** *Free Radical Biology and Medicine*, [s.l.], v. 47, nº 4, p. 344–356, 2009. ISSN: 08915849, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018.

MISHRA, A. *et al.* ***Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities.** *BioMed Research International*, [s.l.], v. 2013, 2013. ISSN: 23146133, DOI: 10.1155/2013/915436.

MORA HUERTAS, A. C. *et al.* **Molecular-level insights into aging processes of skin elastin.** *Biochimie*, [s.l.], v. 128–129, p. 163–173, 2016. ISSN: 61831638, DOI: 10.1016/j.biochi.2016.08.010.

MOREIRA, L. C. *et al.* **In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae): Prospects for developing a new dermocosmetic product.** *Toxicology in Vitro*, [s.l.], v. 45, nº April, p. 397–408, 2017. ISSN: 18793177, DOI: 10.1016/j.tiv.2017.04.002.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*, [s.l.], v. 65, nº 1–

2, p. 55–63, 1983. ISBN: 0022-1759 (Print)n0022-1759 (Linking), ISSN: 00221759, DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MOUKETTE, B. M. *et al.* **In vitro antioxidant properties, free radicals scavenging activities of extracts and polyphenol composition of a non-timber forest product used as spice: *Monodora myristica*.** *Biological Research*, [s.l.], v. 48, p. 1–17, 2015. ISBN: 4065901500031, ISSN: 07176287, DOI: 10.1186/s40659-015-0003-1.

MOURÃO, R. H. *et al.* **Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 40, n° 11, p. 1129–1133, 2005. ISSN: 02235234, DOI: 10.1016/j.ejmech.2005.06.002.

MUKHERJEE, S. *et al.* **Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety.** *Clinical interventions in aging*, [s.l.], v. 1, n° 4, p. 327–348, 2006. ISSN: 11769092, DOI: 10.2147/ciia.2006.1.4.327.

MUÑOZ-GUTIÉRREZ, C. *et al.* **Study of the interactions between Edaglitazone and Ciglitazone with PPAR γ and their antiplatelet profile.** *Life Sciences*, [s.l.], v. 186, n° April, p. 59–65, 2017. ISSN: 18790631, DOI: 10.1016/j.lfs.2017.07.031.

NAM, J. J. *et al.* **Ultraviolet- and infrared-induced 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activating skin photoaging is inhibited by red ginseng extract containing high concentration of ginsenoside Rg3(S).** *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, [s.l.], v. 33, n° 6, p. 311–320, 2017. ISSN: 16000781, DOI: 10.1111/phpp.12337.

NATH, A.; RAGHUNATHA, P.; JOSHI, S. R. **Diversity and biological activities of endophytic fungi of *Emblica officinalis*, an ethnomedicinal plant of India.** *Mycobiology*, [s.l.], v. 40, n° 1, p. 8–13, 2012. ISSN: 12298093, DOI: 10.5941/MYCO.2012.40.1.008.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. **Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis.** *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 11, n° 14, p. 1200–15, 2011. ISBN: 1875-5607 (Electronic)r1389-5575 (Linking), ISSN: 1875-5607, DOI: 10.1007/s00403-009-1001-3.Skin.

ODIEKA, A. E.; OBUZOR, G. U.; OYEDEJI, O. O.; GONDWE, M.; HOSU, Y. S.; OYEDEJI, A. O. **The Medicinal Natural Products of *Cannabis sativa* Linn.:A Review.** [s.l.], v. 27, n° 5, p. 1–23, 2022.

OH, J.- H *et al.* **Thioredoxin secreted upon ultraviolet a irradiation modulates activities of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [s.l.], v. 423, n° 1, p. 218–226, 2004. ISSN: 00039861, DOI: 10.1016/j.abb.2003.12.026.

OH, J.H.; KIM, J.; KARADENIZ, F.; KIM, H.R.; PARK, S.Y.; SEO, Y.; KONG, C.-S. **Santamarine shows anti-photoaging properties via inhibition of mapk/ap-1 and stimulation of tgf- β /smad signaling in uva-irradiated hdfs.** *Molecules*, [s.l.], v. 26, n° 12, 2021. ISSN: 14203049, DOI: 10.3390/molecules26123585.

OULTRAM, J. M. J. *et al.* ***Cannabis sativa*: Interdisciplinary Strategies and Avenues for**

Medical and Commercial Progression Outside of CBD and THC. *Biomedicines*, [s.l.], v. 9, n° 3, p. 234, 2021. DOI: 10.3390/biomedicines9030234.

PAL, A. *et al.* **UVB irradiation-enhanced zinc oxide nanoparticles-induced DNA damage and cell death in mouse skin.** *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, [s.l.], v. 807, p. 15–24, 2016. ISSN: 18793592, DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.06.005.

PAMPLONA, R. **Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, [s.l.], v. 1777, n° 10, p. 1249–1262, 2008. ISSN: 00052728, DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.07.003.

PANGESTUTI, R.; SHIN, K. H.; KIM, S. K. **Anti-photoaging and potential skin health benefits of seaweeds.** *Marine Drugs*, [s.l.], v. 19, n° 3, 2021. ISSN: 16603397, DOI: 10.3390/MD19030172.

PANICH, U. *et al.* **Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging.** *Stem Cells International*, [s.l.], v. 2016, 2016. ISSN: 16879678, DOI: 10.1155/2016/7370642.

PAPACCIO, F. *et al.* **Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging.** *Antioxidants*, [s.l.], v. 11, n° 6, 2022. ISSN: 20763921, DOI: 10.3390/antiox11061121.

PARK, M. A.; SIM, M. J.; KIM, Y. C. **Anti-photoaging effects of *Angelica acutiloba* root ethanol extract in human dermal fibroblasts.** *Toxicological Research*, [s.l.], v. 33, n° 2, p. 125–134, 2017. ISSN: 22342753, DOI: 10.5487/TR.2017.33.2.125.

PARK, Y. *et al.* **Effect of porcine placenta extract from subcritical water extraction on photodamage in human keratinocytes.** *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, [s.l.], v. 35, n° 2, p. 164–170, 2015. ISSN: 12258563, DOI: 10.5851/kosfa.2015.35.2.164.

PÉREZ, V. I. *et al.* **Is the oxidative stress theory of aging dead?** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, [s.l.], v. 1790, n° 10, p. 1005–1014, 2009. ISSN: 03044165, DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.06.003.

POON, F.; KANG, S.; CHIEN, A. L. **Mechanisms and treatments of photoaging.** *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, [s.l.], v. 31, n° 2, p. 65–74, 2015. ISSN: 16000781, DOI: 10.1111/phpp.12145.

RAUT, S. *et al.* **Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging.** *Acta Pharmaceutica Sinica B*, [s.l.], v. 2, n° 1, p. 8–15, 2012. ISBN: 9623603800, ISSN: 22113835, DOI: 10.1016/j.apsb.2011.12.005.

SÁRDY, M. **Role of matrix metalloproteinases in skin ageing.** *Connective Tissue Research*, [s.l.], v. 50, n° 2, p. 132–138, 2009. ISSN: 03008207, DOI: 10.1080/03008200802585622.

SAYAGO, C. *et al.* **Chemical composition and in vitro antioxidant activity of hydro-ethanolic extracts from *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* and *B. variegata*.** *Acta Biologica*

Hungarica, [s.l.], v. 64, n° 1, p. 21–33, 2013. ISSN: 02365383, DOI: 10.1556/ABiol.64.2013.1.3.

SCAPAGNINI, G. *et al.* **Cocoa bioactive compounds: Significance and potential for the maintenance of skin health.** *Nutrients*, [s.l.], v. 6, n° 8, p. 3202–3213, 2014. ISSN: 20726643, DOI: 10.3390/nu6083202.

SCHEINBERG, R. S. **Alpha-Hydroxy Acids for Skin Rejuvenation.** *Western Journal of Medicine*, [s.l.], v. 160, n° 4, p. 366–367, 1994.

SHARMA, N. *et al.* **Isolation of phytochemicals from *Bauhinia variegata* L. Bark and their in vitro antioxidant and cytotoxic potential.** *Antioxidants*, [s.l.], v. 8, n° 10, p. 1–19, 2019. ISSN: 20763921, DOI: 10.3390/antiox8100492.

SHEN, D. *et al.* **Pioglitazone attenuates aging-related disorders in aged apolipoprotein E deficient mice.** *Experimental Gerontology*, [s.l.], v. 102, p. 101–108, 2018. ISSN: 18736815, DOI: 10.1016/j.exger.2017.12.002.

SHIMODA, M. **Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue microenvironment.** *Advances in Clinical Chemistry*, [s.l.], v. 88, p. 35–66, 2019. ISSN: 00652423, DOI: 10.1016/bs.acc.2018.10.006.

SHIN, M. H. *et al.* **Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha improves aged and UV-irradiated skin by catalase induction.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 11, n° 9, p. 1–15, 2016. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0162628.

SONG, E. *et al.* ***Gastrodia elata* blume extract modulates antioxidant activity and ultraviolet a-irradiated skin aging in human dermal fibroblast cells.** *Journal of Medicinal Food*, [s.l.], v. 19, n° 11, p. 1057–1064, 2016. ISSN: 15577600, DOI: 10.1089/jmf.2016.3722.

SUBEDI, L. *et al.* **Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [s.l.], v. 2017, 2017. ISSN: 19420994, DOI: 10.1155/2017/8379539.

SUN, Z.-H. *et al.* **Two New Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Endomelanconiopsis endophytica*.** *Molecules*, [s.l.], v. 21, n° 7, p. 943, 2016. ISSN: 1420-3049, DOI: 10.3390/molecules21070943.

TAKASAO, N. *et al.* **Cinnamon Extract Promotes Type I Collagen Biosynthesis via Activation of IGF-I Signaling in Human Dermal Fibroblasts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], v. 60, n° 5, p. 1193–1200, 2012. ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf2043357.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. **Endophytes: a rich source of functional metabolites (1987 to 2000).** *Natural Product Reports*, [s.l.], v. 18, n° 4, p. 448–459, 2001. ISSN: 02650568, DOI: 10.1039/b100918o.

TERAZAWA, S. *et al.* **The attenuated secretion of hyaluronan by UVA-exposed human fibroblasts is associated with up- and downregulation of HYBID and HAS2 expression via activated and inactivated signaling of the p38/ATF2 and JAK2/STAT3 cascades.**

International Journal of Molecular Sciences, [s.l.], v. 22, n° 4, p. 1–27, 2021. ISSN: 14220067, DOI: 10.3390/ijms22042057.

TOBIN, D. J. **Introduction to skin aging**. *Journal of Tissue Viability*, [s.l.], v. 26, n° 1, p. 37–46, 2017. ISSN: 18764746, DOI: 10.1016/j.jtv.2016.03.002.

UZMA, F. *et al.* **Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: A review**. *Frontiers in Pharmacology*, [s.l.], v. 9, n° APR, p. 1–37, 2018. ISSN: 16639812, DOI: 10.3389/fphar.2018.00309.

VIEIRA, E. S. **Síntese , Estrutura e Modelagem Molecular de Novos Derivados Acridino-imidazolidínicos e Benzilideno-tiazolidínicos Síntese , Estrutura e Modelagem Molecular de Novos Derivados Acridino-imidazolidínicos e Benzilideno-tiazolidínicos**. [s.l.], 2004.

WAQAS, M. *et al.* **Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress**. *Molecules*, [s.l.], v. 17, n° 9, p. 10754–10773, 2012. ISSN: 14203049, DOI: 10.3390/molecules170910754.

WEN, K.-C. *et al.* **Inhibitory Effects of *Terminalia catappa* on UVB-Induced Photodamage in Fibroblast Cell Line**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, [s.l.], v. 2011, p. 1–9, 2011. ISSN: 1741-427X, DOI: 10.1155/2011/904532.

WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. **Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue**. *Nature protocols*, [s.l.], v. 5, n° 1, p. 51–66, 2010. ISBN: 1750-2799 (Electronic)n1750-2799 (Linking), ISSN: 1750-2799, DOI: 10.1038/nprot.2009.197.MEASUREMENT.

WU, L.; GUO, C.; WU, J. **Therapeutic potential of PPAR γ natural agonists in liver diseases**. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, [s.l.], v. 24, n° 5, p. 2736–2748, 2020. ISSN: 15821838, DOI: 10.1111/jcmm.15028.

WU, S. *et al.* **The effect of Cyanidin-3-o-glucoside on UVA-induced damage in human dermal fibroblasts**. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, [s.l.], v. 34, n° 4, p. 224–231, 2018. ISSN: 09054383, DOI: 10.1111/phpp.12374.

XUAN, S. H. *et al.* **Suppression of Ultraviolet B-mediated Matrix Metalloproteinase Generation by *Sorbus commixta* Twig Extract in Human Dermal Fibroblasts**. *Photochemistry and Photobiology*, [s.l.], v. 94, n° 2, p. 370–377, 2018. ISSN: 00318655, DOI: 10.1111/php.12868.

ZHANG, Jing *et al.* **Exogenous melatonin suppresses dark-induced leaf senescence by activating the superoxide dismutase-catalase antioxidant pathway and down-regulating chlorophyll degradation in excised leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)**. *Frontiers in Plant Science*, [s.l.], v. 7, n° OCTOBER2016, p. 1–15, 2016. ISSN: 1664462X, DOI: 10.3389/fpls.2016.01500.

ZHANG, Jun *et al.* **Metabolites of medicine food homology-derived endophytic fungi and their activities**. *Current Research in Food Science*, [s.l.], v. 5, n° July, p. 1882–1896, 2022. ISSN: 26659271, DOI: 10.1016/j.crfs.2022.10.006.

ZHENG, Y *et al.* **Inhibition CatG-MMPs-and-TGF- β -in-photoaging.pdf.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, [s.l.], v. 21, p. 5160–5165, 2017.

ZHENG, Yue *et al.* **Transcriptome analysis of ultraviolet A-induced photoaging cells with deep sequencing.** *Journal of Dermatology*, [s.l.], v. 45, n° 2, p. 175–181, 2018. ISSN: 13468138, DOI: 10.1111/1346-8138.14157.

ZHOU, B. R. *et al.* **Baicalin protects human skin fi broblasts from ultraviolet A radiation-induced oxidative damage and apoptosis.** *Free Radical Research*, [s.l.], v. 46, n° 12, p. 1458–1471, 2012. ISSN: 10292470, DOI: 10.3109/10715762.2012.726355.

ZHOU, R. *et al.* **Therapeutic effect of concentrated growth factor preparation on skin photoaging in a mouse model.** *Journal of International Medical Research*, [s.l.], v. 48, n° 10, 2020. ISSN: 14732300, DOI: 10.1177/0300060520962946.