

**BETANIA LONGARAY FONSECA**

**EFEITOS NEUROPROTETORES CUTÂNEOS DE UM EXTRATO VEGETAL APÓS  
RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Gerontologia Biomédica como  
requisito para a obtenção do grau  
de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Moisés E. Bauer

Porto Alegre

2010

**BETANIA LONGARAY FONSECA**

**EFEITOS NEUROPROTETORES CUTÂNEOS DE UM EXTRATO VEGETAL APÓS  
RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Gerontologia Biomédica como  
requisito para a obtenção do grau  
de Mestre.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Cantarelli Machado – PUCRS

---

Prof. Dr. Vinicius Durval da Silva – PUCRS

---

*Dedicatória*

*Aos meus pais, que tornaram realidade todos os meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho e abençoar minhas escolhas.

Aos meus pais, por me apoiarem em todos os momentos de minha vida; e por nunca deixarem de demonstrar amor, carinho, amizade. Este título é nosso.

As minhas irmãs: Paola e Isabela, que deixam meus dias mais alegres; e estão ao meu lado sempre. Amo vocês.

A toda minha família: Vó, Dindo, Dinda, Tios, Primos e Cunhado; que estão presentes em todos os momentos de minha vida e me dão a certeza que não importa o caminho que trilhamos, mas sim as pessoas que trilham este caminho conosco.

Aos meus primos e amigas: Bru, Mari, Gu, Nã, Zinho, Bê, Cris, Fran, Grazi, Cacá, Marcela e Camilla, vocês tornam meus dias mais alegres; muito obrigada por existirem e me apoiarem em todos os momentos.

Aos colegas e amigos de laboratório, as melhores pessoas que conheci na vida, muito obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar e por todos os momentos de alegrias e brincadeiras. A Déia, Pri, Talita, vocês moram em meu coração, iguais a vocês não há.

Ao meu orientador, Moisés Bauer, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe e por sua impecável orientação, apoiando-me sempre que necessário.

A professora Cristina Bonorino, por sua ajuda nos protocolos e experimentos.

A professora Temis Corte, por toda sua ajuda no desenvolvimento das formulações e por disponibilizar a infra-estrutura do Laboratório de Dermatologia e Cosmetologia da Faculdade de Farmácia da PUCRS para a realização das formulações.

A aluna de iniciação científica Bruna Correa, por toda sua ajuda nos experimentos.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por disponibilizar, com generosidade e amizade, seus equipamentos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

As demais pessoas que fizeram parte desse trabalho contribuindo, mesmo que indiretamente, para que ele pudesse ser realizado e concluído.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>9</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	9
1.1.1 Teorias sobre o envelhecimento .....	9
1.1.2 As teorias sobre o envelhecimento cutâneo .....	10
1.1.3 Radicais livres .....	11
1.1.4 O envelhecimento cutâneo .....	13
1.1.5 Radiação ultravioleta (UV) .....	15
1.1.6 Fotoenvelhecimento .....	17
1.1.7 Filtros Solares .....	21
1.2 OBJETIVOS .....	24
1.2.1 Hipótese .....	24
1.2.2 Objetivo Geral: .....	24
1.2.3 Objetivos Específicos: .....	24
2.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	25
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>28</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>36</b>

## RESUMO

O fotoenvelhecimento, caracterizado pela exposição à luz solar repetidas vezes, é responsável por 90% das mudanças que ocorrem na pele. Os filtros solares são desenvolvidos somente para diminuir o eritema e a queimadura solar, não diminuindo os efeitos crônicos da radiação solar. A busca por novos princípios ativos que diminuam os efeitos crônicos da radiação tem se tornado alvo de inúmeras pesquisas. **Objetivos:** O objetivo do presente trabalho é desenvolver uma formulação contendo novo ativo de origem vegetal e analisar seu efeito neuroprotetor após exposição à radiação UVA e UVB. **Resultados:** As radiações UVA e UVB reduziram significativamente a densidade das terminações nervosas (40-60%) na pele das amostras controle e tratadas com placebo. As amostras tratadas com a formulação contendo novo ativo reduziu significativamente os efeitos da radiação UV sobre as terminações nervosas ( $p < 0.0001$ ), independente da idade e tecido (mama ou abdômen). **Conclusão:** . A formulação que desenvolvemos tem um importante efeito neuroprotetor na pele exposta a radiação UV podendo ser utilizada com filtros solares para reduzir os danos causados pela radiação UV. É de suma importância a pesquisa de novos ativos neuroprotetores que bloqueiem o efeito da radiação UV nas terminações nervosas da pele, pois, como demonstrado neste estudo os filtros solares, por si só, não diminuem a destruição das terminações nervosas livres

**Palavras-chaves:** Fotoenvelhecimento, Radiação UV, Terminações nervosas livres.

## ABSTRACT

Photoageing, characterized by continuous sunlight exposure, is responsible for 90% of changes in skin. Sunscreens just decrease the erythema and sunburn, not decreasing the effects of chronic exposure to UV radiation. Therefore, several works have been looking for new actives that decrease the effects of UV radiation chronic exposure. **Objectives:** The present work evaluates the neuroprotective effects of a new skin care formulation containing a plant extract against UV radiation exposure. **Results:** UVA and UVB reduced significantly (40-60%) the density of nerve endings in the control samples and treated with placebo. The samples treated with new skin care completely blocked the effects of UV irradiation on the nerve endings ( $p < 0.001$ ). These neuroprotective effects were similarly observed regardless of age or tissue analysed (breast vs. abdomen). **Conclusions:** New skin care formulation has important neuroprotective effects against UV irradiation and shall be used together with SPF to prevent photodamage. Searches on new neuroprotective actives are important, due to, as previously as demonstrated in this work, the sunscreens not protect nerve fibers density decrease.

**Keywords:** Photo-ageing, UV radiation, Nerve endings.

## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

#### 1.1.1 *Teorias sobre o envelhecimento*

Envelhecimento é um processo complexo, dinâmico, progressivo, durante o qual ocorrem modificações morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas determinantes na perda da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente. Ocasiona maior vulnerabilidade e maior incidência de problemas de saúde que terminam por provocar à morte (1, 2).

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas e inúmeras teorias propostas para explicar os fatores desencadeantes do processo de envelhecimento. A partir deste entendimento, buscam-se parâmetros que permitam avaliar o estágio real de envelhecimento, meios de retardar o processo de envelhecimento, diminuir as deficiências e prevenir as doenças decorrentes, visando a melhorar qualidade de vida na terceira idade e postergar a morte (3, 4).

Diferentes autores propuseram distintas classificações das inúmeras teorias que tentam explicar o processo de envelhecimento. As teorias com abordagem científica estão sumarizadas, a partir de diferentes pontos de vista, em diversas publicações recentes, tais como Hayflick, Arking e Semsei (5-7).

A classificação proposta por Arking, em 1998, está sumarizada na Figura 1. Esta classificação busca diferenciar teorias sistêmicas de estocásticas, para buscar um melhor entendimento dos inúmeros processos que ocorrem no envelhecimento.

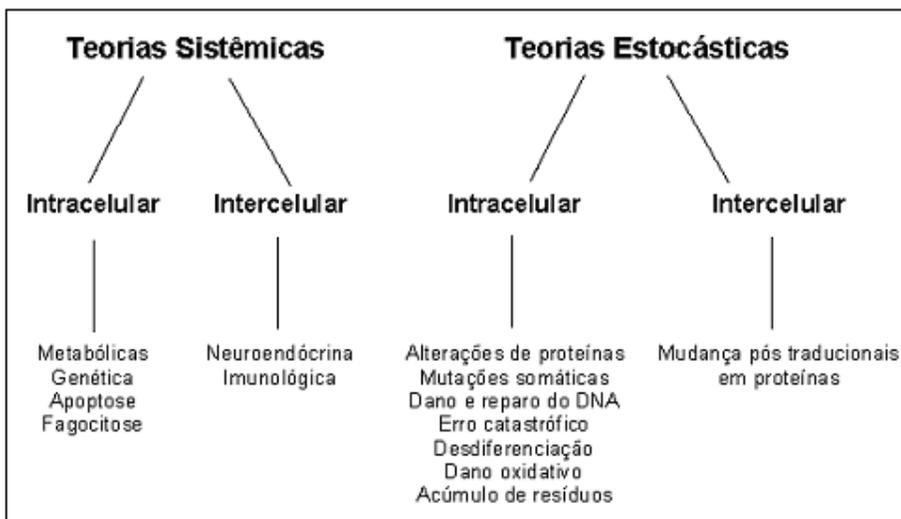


Figura 1 - Teorias e mecanismos do envelhecimento (5).

Incontáveis teorias sobre o envelhecimento têm sido publicadas, indicando a natureza complexa desse processo, mas nenhuma delas explica por completo tal fenômeno (7).

### 1.1.2 As teorias sobre o envelhecimento cutâneo

O envelhecimento é particularmente óbvio nas mudanças externas da aparência da pele e pode ser explicado por diferentes teorias inter-relacionadas. Outros fatores intervêm de maneira mais limitada, como os processos não enzimáticos de glicosilação de proteínas, a diminuição da capacidade de defesa do sistema imune com o passar do tempo, as anomalias neuroendócrinas com disfunção do eixo hipotalâmico-hipofisário, as modificações em relação ao funcionamento de numerosos órgãos e o estado hormonal da mulher durante a menopausa (8). A Figura 2 apresenta um esquema das diferentes teorias relacionadas com o envelhecimento cutâneo.

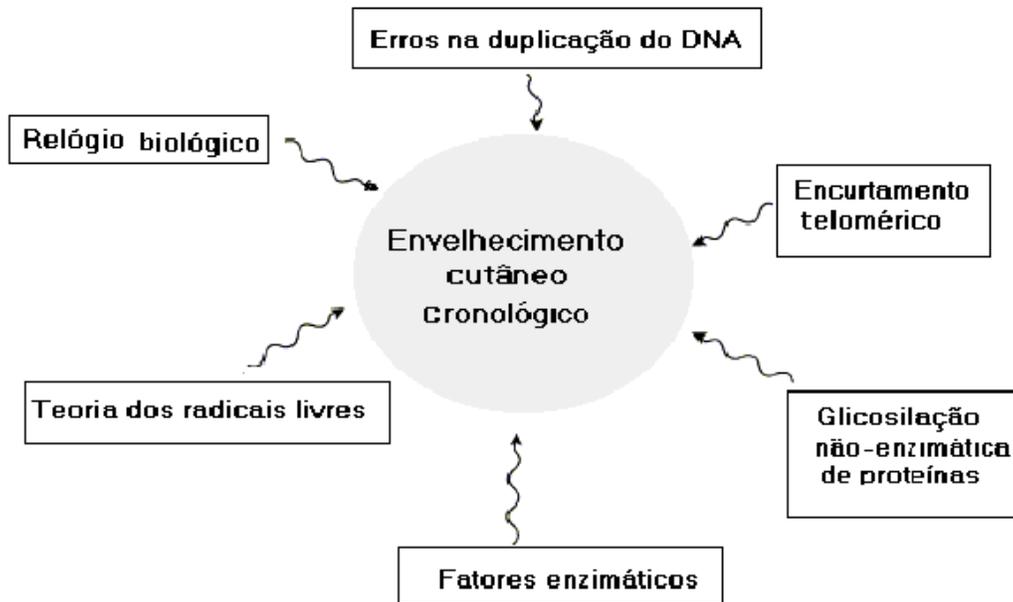


Figura 2 - Teorias sobre o envelhecimento cutâneo (9)

O envelhecimento cronológico pode ser considerado um fenômeno geneticamente programado (10). Muitas células humanas derivadas de tecidos embrionários, fetais e de recém-nascidos, quando dispostas em meio de cultura, podem sofrer 40 a 60 divisões celulares. Aproximadamente após a 50ª divisão algumas células param de se dividir e entram no processo de envelhecimento celular (6, 11,12,13).

### 1.1.3 Radicais livres

A teoria dos radicais livres (14) sugere que, no processo de envelhecimento, ocorre, ao longo da vida, o acúmulo no organismo, de produtos de oxidação de proteínas, DNA e lipídios gerados pela ação de radicais livres (15, 16). Inúmeros estudos demonstram associação entre o aumento da idade e a produção de radicais livres, ocasionando um aumento de proteínas e de DNA oxidados (17). No entanto, a intensidade e a maneira como o estresse oxidativo contribuem para o envelhecimento pode variar entre diferentes organismos, tecidos e células (18).

O estresse oxidativo é causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem moléculas conhecidas como radicais livres, entre eles o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), o superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), o alcoxil ( $\text{RO}\cdot$ ), o alquiperóxil ( $\text{ROO}\cdot$ ) e o hidroperóxil ( $\text{HO}_2\cdot$ ), bem como, também, por não-radicais livres, como peróxido de hidrogênio (19). As ROS caracterizam-se por serem altamente reativas e potentes oxidantes de outras moléculas (8).

As ROS são geradas em todas as células aeróbias, como mediadores de reações, que ocorrem durante o metabolismo normal, em organelas intracelulares (mitocôndrias, lisossomas, peroxissomas e retículo endoplasmático), membranas celulares e componentes solúveis do citoplasma (19). Em torno de 0,4 a 4% do oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido em ROS (18) que participam de diversos processos biológicos naturais como diferenciação celular, morte celular programada, senescência celular (20).

Entre os mecanismos de defesa do organismo para os radicais livres destacam-se a prevenção da indução de danos, os mecanismos de reparo e a atividade direta contra os metabólitos deletérios. O sistema antioxidante é composto principalmente por dois grupos: enzimas antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular. Sua função é dissipar os oxidantes intracelulares a fim de diminuir o dano oxidativo celular e manter a homeostasia (20, 21).

O sistema antioxidante não é infalível, pois existem dados de estudos *in vivo* e *in vitro* que sugerem a correlação entre o processo de envelhecimento e a formação de radicais livres em todos os órgãos. Concomitantemente a este processo, ocorre a diminuição da ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (17).

É chamado de estresse oxidativo o distúrbio das defesas antioxidantes das células, cuja ocorrência dá-se pelo desequilíbrio entre a proporção de oxidantes e antioxidantes das células (19). O dano oxidativo pode ser um importante causador do envelhecimento cutâneo e outras doenças comuns relacionadas (8). As proteínas que têm grupamentos com enxofre ou insaturações na molécula são de sobremaneira sensíveis às agressões radiculares. As conseqüências são múltiplas em âmbito cutâneo, como despolimerização do colágeno, da elastina e do ácido

hialurônico, ruptura de moléculas por inativação enzimática, produtos tóxicos ou formação de agregados protéicos (10). As membranas, ricas em lipídios, são alvos ideais para ROS, devido ao caráter poliinsaturado de certos ácidos graxos, resultando na perda de integridade das membranas celulares e de suas funções. A peroxidação lipídica é igualmente responsável pela formação de novos radicais livres, com o desencadeamento da cascata do ácido araquidônico e o catabolismo das bases púricas (22).

A pele é constantemente exposta a radiações ultravioleta, radiações ionizantes, ozônio e poluentes ambientais que podem, deletariamente, aumentar o estresse oxidativo normal observado em rotas metabólicas. A incidência de radiações UVA e UVB na pele aumentam a quantidade de radicais livres como ânion superóxido e radical hidroxila, assim como oxidantes não radicais, como peróxido de hidrogênio, com concomitante diminuição das enzimas antioxidantes. As radiações ultravioletas são consideradas a principal causa de envelhecimento extrínseco, denominado fotoenvelhecimento (23).

#### *1.1.4 O envelhecimento cutâneo*

A pele, assim como outros órgãos do corpo, apresenta significativas modificações estruturais, funcionais e morfológicas durante o processo de envelhecimento (24, 25). Tais alterações resultam de um processo progressivo no qual danos ambientais (envelhecimento extrínseco), em áreas expostas, sobrepõem-se ao envelhecimento natural (envelhecimento intrínseco), determinando como resultado a aparência da pele (26). Entre os diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos incluem-se as características genéticas, as exposições ambientais (radiações ultravioleta, estresse mecânico), as mudanças hormonais e os processos metabólicos. Dos fatores extrínsecos, a exposição às radiações solares é considerado o mais importante para o envelhecimento cutâneo (23, 27).

O envelhecimento cronológico caracteriza-se por rugas finas, xerose, flacidez, pele sem manchas, atrofia epidermal, com estrato córneo inalterado, pouca displasia celular, achatamento da junção derme epiderme, moderada reorganização

das fibras elásticas, pequenas modificações no tamanho e na organização dos feixes de colágeno, redução da área da microvasculatura, redução do número de glândulas sebáceas e écrinas, neoplasmas benignos (ceratose seborréica) e diminuição da espessura e do crescimento de pêlos (10, 28, 29).

Na epiderme, ocorrem alterações estruturais significativas – afinamento em toda a epiderme, variando de 10 a 50% entre os 30 e os 80 anos. A análise histológica da epiderme permite constatar que o afinamento da pele está relacionado à diminuição dos queratinócitos, sem alteração no estrato córneo. Os queratinócitos aumentam de tamanho com a idade, enquanto a filagrina epidermal, responsável pela união dos feixes de queratina, e de lipídios intercelulares, especialmente as ceramidas, diminuem (16, 30).

A redução de melanócitos ativos presumivelmente contribui para diminuir a proteção contra radiações UV. Além disso, verifica-se um decréscimo do número de células de Langerhans de 20 a 50%, o que pode contribuir para a diminuição da resposta imunológica da pele, com o envelhecimento (26, 31).

Na epiderme envelhecida ocorre o achatamento da junção derme epiderme com diminuição das fibras de ancoragem, especialmente de colágeno (26). Esse decréscimo da superfície de contato entre a derme e a epiderme pode diminuir a transferência de nutrientes e facilitar sua separação, levando ao aumento da fragilidade da pele após traumas (32, 33)

A diminuição da espessura da derme se atribui ao decréscimo da capacidade proliferativa das células dérmicas e às alterações na rede dérmica de colágeno e elastina. A degradação do colágeno e da elastina predomina sobre sua síntese, com o aumento das ligações cruzadas e desorganização das fibras de colágeno (33). Ocorre o desequilíbrio entre três parâmetros: a síntese de macromoléculas da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos), as proteinases (metaloproteinases), capazes de degradar esses compostos, e os inibidores específicos dessas enzimas (fator de inibição tissular)(34).

As metaloproteinases matriciais constituem uma grande família de endoproteases zinco dependentes, capazes de degradar os componentes da derme, predominantemente colágeno I e III, elastina, proteoglicanos, fibronectina e outras

proteínas da matriz extracelular (34). A expressão das metaloproteinases matriciais colagenase-1 (MMP-1), estromelina-1 (MMP-3) e gelatinase A (MMP-2) estão aumentadas durante o envelhecimento cutâneo cronológico, enquanto a expressão de seu inibidor tissular (TIMP-1) está diminuída durante a senescência dos fibroblastos, o que justifica o catabolismo dérmico durante o processo de envelhecimento (32).

A MMP-1 degrada colágeno tipo I e III, a MMP-3 degrada colágeno tipo IV e a MMP-9 os fragmentos de colágeno produzidos. Essa degradação, somada a um sistema de reparo insuficiente, causa o acúmulo de colágeno fragmentado na derme (30). Como o colágeno e a elastina são responsáveis pela sustentação e a elasticidade da pele, sua desorganização, com o aumento da idade, causa o aspecto de pele envelhecida (34).

A derme torna-se atrófica com diminuição do volume total das fibras de colágeno e elastina, diminuição de glicosaminoglicanos e proteoglicanos, diminuição de mastócitos e macrófagos, redução no número e na função das glândulas sudoríparas ecrinas, aumento do tamanho das glândulas sebáceas, com diminuição de função, diminuição dos vasos sanguíneos e ausência de sinais de inflamação (33, 35).

#### *1.1.5 Radiação ultravioleta (UV)*

A radiação ultravioleta é a região do espectro eletromagnético emitido pelo sol que compreende os comprimentos de onda de 100 a 400 nm e pode ser dividida em três faixas, levando-se em conta suas características de propagação e efeitos fisiológicos.

UVA (320-400nm): dependendo da espessura da pele podem atingir tecidos dérmicos, o que os torna tão perigosos quanto os comprimentos de onda de maior energia (UVB). A faixa UVA pode se subdividida em UVA baixo, de 320-340 nm, responsável pela grande maioria dos efeitos fisiológicos do UVA na pele, e UVA alto, de 340-400nm, responsável por alterações muito pequenas nas fibras elásticas.

UVB (290-320nm): possuem pequena penetração na pele; contudo, devido à sua alta energia, são os maiores responsáveis pelos danos imediatos da radiação solar e por boa parte dos danos tardios. São responsáveis também pela transformação do ergosterol epidérmico em vitamina D.

UVC (100-290): são absorvidos pelas camadas superiores da atmosfera terrestre, rica em ozônio, e praticamente não chegam à superfície terrestre (36).

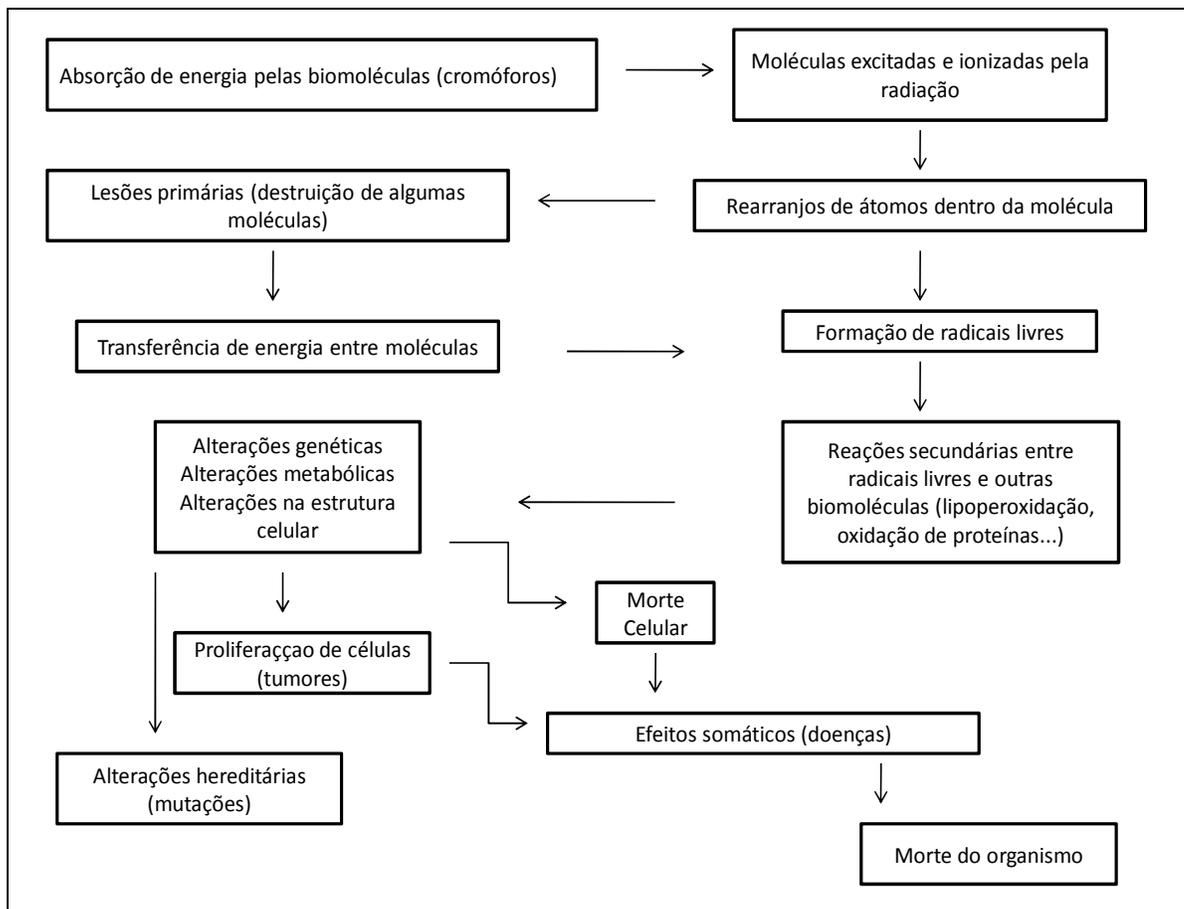


Figura 3 - Esquema geral de interação da luz com a pele, desde cromóforo até alterações mais duradouras (36).

Quando a luz incide sobre a pele, pode ser absorvida, refletida ou espalhada. Somente a luz absorvida produz alterações na molécula que a absorve. Este ponto de absorção é chamado cromóforo. Cada cromóforo absorve a luz numa determinada faixa de comprimento de onda e sofre alterações em consequência desta absorção. As alterações sofridas pelos cromóforos são denominadas reações fotoquímicas. São as reações fotoquímicas que desencadeiam todas as outras reações bioquímicas que resultam em danos à pele (Fig. 3). A maioria dos efeitos fisiológicos da radiação é consequência das reações de caráter inflamatório e oxidante desencadeadas pelas reações fotoquímicas. Alguns exemplos de cromóforos: ácidos nucleicos, aminoácidos e ácido urocânico. Todos estes absorvem radiação de comprimento de onda menor que 300nm. A melanina é o principal cromóforo na pele e absorve desde 300 até 1200nm (36). A radiação UVA e UVB geram eritemas diferentes devido à profundidade de penetração nas respectivas faixas, conforme figura 4 (37).

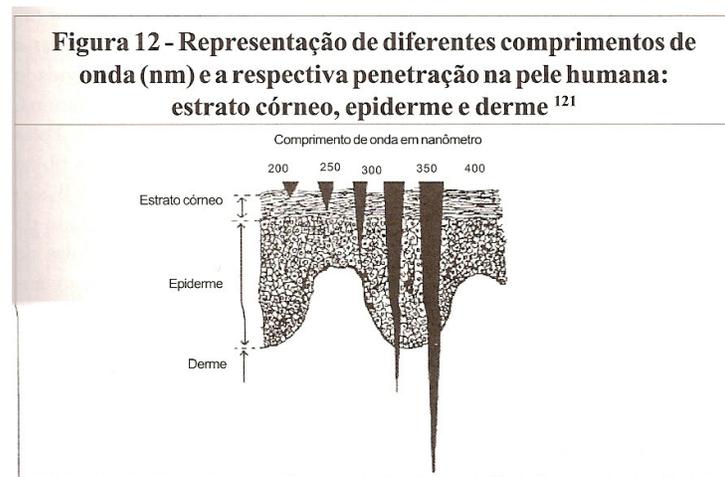


Figura 4 - Representação de diferentes comprimentos de onda (nm) e a respectiva penetração na pele humana (37).

#### 1.1.6 Fotoenvelhecimento

A radiação UV produz espécies reativas de oxigênio (ROS), estas causam danos nos lipídios de membrana levando a liberação de ceramidas, bem como

hiperplasia epidérmica, diminuição da produção de colágeno e degradação da matriz dérmica. As ROS ativam os receptores da superfície celular, incluindo receptores de fator de crescimento da epiderme (EGF), a interleucina (IL -1), insulina, fator de crescimento de queratinócitos e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). A ativação do receptor é mediada, em parte, pela inibição, causada pelo ROS, das enzimas proteína- tirosina fosfatase(k), cuja função é manter os receptores de EGF inativos (23). A ativação do receptor conduz a uma sinalização intracelular através da estimulação das proteínas ativadas por mitógeno (MAP), quinases amino-terminal p38 (JNK) (38). A ativação da quinase induz a transcrição do complexo nuclear de transcrição (AP-1). A ativação do receptor (causado pelas ROS) causa danos nos lipídios de membrana levando a liberação de ceramidas, pela ativação de AP-1. O ácido araquidônico liberado pela oxidação dos lipídeos de membrana é convertido, por enzimas cicloxigenase, em prostaglandinas, recrutando células inflamatórias para a área (1).

Aumento de transcrição de AP-1 interfere na síntese do colágeno I e III, uma vez que bloqueia o efeito do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), uma citocina que aumenta a transcrição do colágeno (39) e regula negativamente a proliferação de queratinócitos (40). Os efeitos do TGF-  $\beta$  são mediados pela ativação das proteínas de sinalização intracelular SMAD2 e SMAD3 e são antagonizados pela proteína de sinalização intracelular SMAD7 (41). De fato, a radiação UV induz a SMAD7, interferindo na sinalização de TGF-  $\beta$  / SMAD2-3 (42). Isso desencadeia a proliferação de queratinócitos e hiperplasia epidérmica e diminui a produção de colágeno tipo I, levando à perda de colágeno. AP-1 também diminui o nível de receptores TGF- $\beta$ , inibindo a transcrição de colágeno e antagonizando intrinsecamente o efeito do ácido retinóico na estimulação da síntese de colágeno. Assim, na pele danificada pela a radiação UV, a síntese de colágeno é reduzida (43).

Além disso, a radiação UV ativa o fator nuclear de transcrição (NF- $\kappa$ B) que induz a expressão da citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e TNF-  $\beta$ , proteínas envolvidas na imunorregulação e na sobrevivência celular (44). A exposição à radiação UV induz à produção de metaloproteínas e TIMP-1 (regulador inibitório das metaloproteinases). No entanto, a indução de metaloproteinases excede a produção de seu regulador,

gerando um desequilíbrio que determina a degradação da rede protéica da matriz extracelular (45). Tem sido proposto que esse é o principal fator clínico do fotoenvelhecimento, pois 70% do peso seco da derme são compostos por colágeno (34).

O fotoenvelhecimento ocorre, principalmente, nas áreas expostas ao sol e é caracterizado clinicamente por perda de elasticidade, aumento da aspereza e secura, rugas profundas, elastose, pele seca e descamante, aparência coureácea, alterações pigmentares, atrofia cutânea. Além disso, há aumento da ocorrência de neoplasias, malignas e benignas na pele fotoenvelhecida (19, 33).

O aumento da produção de melanina que se segue após a exposição solar resulta em um maior grau de fotoproteção (46). O mecanismo de fotoproteção desempenhado pela melanina envolve a dissipação da radiação UV em calor (conversão interna). Este processo fotoquímico é extremamente rápido e 99,9% da energia são dissipados em calor. Esta grande dissipação de calor não é prejudicial à saúde e é essencial para evitar o dano indireto ao DNA. Contudo, se a energia da radiação UV não for transformada em calor produz radicais livres (18).

Fótons UVB têm 1000 vezes mais energia do que fótons UVA e são esmagadoramente responsáveis pela queimadura solar, bronzeamento e câncer de pele. A radiação UVB é a das principais causas de danos diretos ao DNA e induz inflamação e imunossupressão, bem como a síntese e liberação de prostaglandinas (PG), particularmente PGE<sub>2</sub>, através da indução de da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2). UVB também induz ornitina descarboxilase, a enzima limitante na biossíntese de poliaminas, que estimula a proliferação celular, contribuindo, desta forma, para a formação de câncer (47). UVB também afeta a angiogênese cutânea pela diminuição da expressão do inibidor de angiogênese de protrombina-1. Apesar dos efeitos bem documentados de UVB, UVA é suspeito de desempenhar um papel proporcionalmente maior no fotoenvelhecimento devido à sua presença ser 10 vezes maior em ambientes terrestres e maior profundidade média de penetração na derme comparado com UVB. Além disso, a pele humana exposta diariamente por apenas um mês a doses de UVA demonstra hiperplasia epidérmica, espessamento estrato córneo, depleção de células de Langerhans e infiltrados dérmicos inflamatórios com a deposição de lisozima nas fibras elásticas (19).

Uma comparação das características do envelhecimento intrínseco (cronológico) e extrínseco (fotoenvelhecimento) pode ser vista na Figura 5.

	Envelhecimento intrínseco	Envelhecimento extrínseco
Rugas	Finas	Profundas
Elasticidade	Reduzida	Elastose solar
Manchas	Não	Áreas hiperpigmentadas
Estrato córneo	Inalterado	Espessado
Atrofia epidermal	Sim	Sim
Displasia celular	Pouca	Acentuada
Achatamento da JDE	Moderado	Acentuado
Reorganização das FE	Moderada	Acentuada
Tamanho e organização dos FC	Modificações leves	Modificações acentuadas
Microvasculatura	Redução na área	Aumento da fragilidade e dilatação, infiltrado inflamatório perivascular.
N de glândulas sebáceas e écrinas	Reduzido	Reduzido
Neoplasias	Benignas: ceratose seborréica	Ceratose seborréica, lesões pré-malignas (ceratose actínica) e lesões malignas

JDE: junção derme epiderme; FE: fibras elásticas, FC: feixes do colágeno, N: número.

Figura 5 - Comparação das características do envelhecimento cutâneo intrínseco e extrínseco (9, 35).

É interessante observarmos que muitas doenças de pele como psoríase, dermatite atópica ou linfoma cutâneo melhoram significativamente por foto (químio) terapia, embora os mecanismos por trás dos efeitos terapêuticos da foto (químio) terapia ainda estão longe se serem compreendidos. Diversos caminhos e meios através dos quais a energia de raios ultravioletas provenientes de fontes naturais ou artificiais, é finalmente transformada em efeitos biológicos na pele têm sido sugeridas e os nervos sensoriais cutâneos, neuropeptídeos, neurotrofinas e certos receptores nervosos estão entre os caminhos prováveis (48). De fato, uma rede tridimensional de fibras nervosas sensoriais derivadas de gânglios da raiz dorsal intercala todas as camadas da pele, incluindo a epiderme. Nesta frente de defesa contra os impactos ambientais (incluindo UVR) sobre a pele, as fibras nervosas sensoriais tornam-se alvos por si só, pois estão em contato com todas as camadas da pele e influenciam na infiltração de células cutâneas(45).

Assim, as terminações nervosas e os neuropeptídeos presentes nestas terminações, estão em uma posição central para participar na mediação dos efeitos

terapêuticos da foto (químio) terapia e do fotoenvelhecimento (49). Hosoi et. al.(1993) mostrou que o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), contido nas terminações nervosas está em íntimo contato com células de Langerhans, sugerindo uma associação funcional entre as fibras nervosas sensoriais e células de Langerhans na epiderme (50).

Seité *et. al.* (2003) sugerem que há uma diminuição das células de Langerhans pela radiação UV. A diminuição da densidade de células de Langerhans epidérmicas é uma possível razão para uma redução associada à idade na resposta cutânea imune adaptativa (31). O papel crítico da imunossupressão no câncer de pele é sustentada por pelo menos duas observações. Afaq *et al.* (2005) descreveram a coexistência de regiões de regressão e progressão das lesões de melanoma (47). Além disso, demonstraram que a resposta imune contra melanomas humanos envolve um padrão distinto de citocinas que está associada com regressão espontânea. Quando estes resultados são considerados com os de Yano *et al.* (2005), que mostram que os protetores solares UVB não impedem a progressão de melanomas transplantados, a importância do amplo espectro de proteção UV é enfatizada (51).

Sabe-se que a radiação UV aumenta a geração de ROS em 180%. Sendo assim, atualmente vários ativos antioxidantes estão sendo estudados para diminuir a formação de ROS (52).

### 1.1.7 Filtros Solares

Filtros solares tornaram-se um modo quase exclusivo de proteção utilizado pelo público; o uso rotineiro tem mostrado eficácia na diminuição do número de ceratoses actínicas (53) e células escamosas cancerígenas (CCEs) (54) e em retardar alguns aspectos do processo de fotoenvelhecimento. Quanto aos carcinomas basocelular (CBC), o benefício de proteção não é conclusivo. Quanto ao papel da proteção solar no desenvolvimento de melanoma, há intensas discussões científicas. A principal controvérsia sobre o uso de filtro solar é que este pode levar a um aumento do melanoma. Os estudos epidemiológicos não são conclusivos, alguns

mostram uso benéfico e preventivo, enquanto outros mostram um risco aumentado para desenvolvimento de melanoma. Uma recente meta-análise concluiu que é seguro usar protetores solares, e o uso não aumenta o risco para o desenvolvimento melanoma (55), mas também não o previne. Muitos fatores podem explicar a ausência de efeito protetor com uso de filtro solar diariamente. Diffey *et al.* (2005) sugeriu que a maioria dos protetores solares, no passado, ofereciam nenhuma ou pouca proteção UVA, e isso poderia ser um dos fatores. Muitos sinais do envelhecimento, tais como a formação de rugas, aparecimento de pigmentação, e a perda de colágeno, são acelerados pela exposição à UVA (56).

Os ativos de proteção solar são divididos em dois grupos: inorgânicos e orgânicos. Protetores solares inorgânicos trabalham tanto na dispersão quanto na absorção de raios UV. Atualmente, nos Estados Unidos, existem apenas dois filtros inorgânicos, dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ), aprovado pela FDA. Em comparação com os ativos orgânicos,  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  oferecem uma série de vantagens. Ambos os ativos são fotoestáveis, produzindo produtos de proteção solar com graus previsível de fotoproteção após a exposição UV. Tanto  $\text{TiO}_2$  quanto  $\text{ZnO}$  têm baixo potencial alergênico e baixa taxas de sensibilização. Finalmente,  $\text{ZnO}$  oferece proteção que se estende ao UVA I (até 380 nm) (57), mas a magnitude da proteção UV é baixo quando comparado com outros filtros UV orgânicos. Por fim, a natureza opaca e oclusiva desses produtos torna-os comedogênicos (57).

Para enfrentar essas limitações, a indústria buscou a redução do tamanho da partícula do  $\text{ZnO}$  e  $\text{TiO}_2$ . Diminuir o tamanho conduz a uma menor dispersão da luz visível e melhoria da aparência. Convencionalmente, as nanopartículas são definidas como partículas com dimensões inferiores a 100nm. Sendo assim, as nanopartículas acabam apresentando propriedades mecânicas e elétricas muito diferentes das moléculas convencionais. Estas novas propriedades podem levar a resultados imprevisíveis quando interagem com os tecidos biológicos. Para este própria razão, há uma preocupação crescente quanto o perfil de segurança dos produtos de cuidados pessoais que contêm nanomateriais (58).

Assim, há um maior controle de organização sem fins lucrativos, comunidades científicas e agências reguladoras governamentais sobre questões de segurança das nanopartículas, especificamente relacionadas com a penetração da

pele e perfis de toxicidade dessas novas formulações. Quanto à questão da penetração, as principais preocupações são de que essas nanopartículas podem penetrar a barreira da pele com relativa facilidade e interagir com células vivas na porção inferior da epiderme (59).

Em contraste com os filtros inorgânicos, os filtros orgânicos atuam absorvendo a radiação UV através dos seus conjugados do anel aromático. Após a exposição aos raios UV, elétrons destes compostos são energizados tornam-se instáveis. Com o tempo, os elétrons retornam para o estado estável e liberam a energia na forma de calor (60). Dentre os filtros orgânicos os mais utilizados no mundo são: aminobenzoatos, cinamatos, benzofenonas e avobenzonas. As desvantagens dos filtros orgânicos resumem-se em: 4% da população têm alergias aos aminobenzoatos, e, descobriu-se que há um potencial carcinogênico desse agente (61, 62). A benzofenona possui absorção sistêmica e é detectado na urina e sangue, podendo possuir efeito no sistema endócrino e potencial cancerígeno, apesar de não existirem estudos conclusivos (63); e, também, as benzofenonas são fotoinstáveis e podem gerar radicais livres de oxigênio quando expostas à radiação UV (64). Já a avobenzona é fotoinstável e ocorre significativa fotodegradação, com perda de 50 a 90% das moléculas, após uma hora de exposição à radiação UV (65).

Na indústria de cosméticos, a medida mais estudada atualmente e que indica efetividade do filtro solar, ou seja, bloqueio contra radiações UV é o fator de proteção solar (FPS). O FPS pode ser caracterizado a partir do tempo necessário para desenvolver um eritema após exposição UV ou solar. Contudo, a sua quantificação limita-se somente ao dano celular observado na epiderme (66).

Quantificar o efeito dos compostos químicos com propósito protetor é o objetivo de muitos grupos de estudo atualmente e seria de grande relevância encontrar formulações que amenizassem ou até mesmo evitassem processos de dano e injúria celular. Em decorrência do crescente aumento de doenças relacionadas à exposição UV e a constatação que os filtros solares não protegem danos as células, como as células Langerhans (67), estas de extrema importância para a homeostasia da pele, faz-se necessária a busca e a avaliação da efetividade de novos princípios ativos com finalidade de proteção contra os danos celulares causados pelas radiações.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Hipótese

A exposição UV deverá reduzir significativamente as terminações livres da pele humana e a formulação desenvolvida com *Echinacea purpúrea* deverá proteger as terminações nervosas livres dos danos da radiação UV.

### 1.2.2 Objetivo Geral:

Quantificar os efeitos neuroprotetores da formulação com *Echinacea purpúrea* nas terminações nervosas pele humana, após radiação UV-A e UV-B.

### 1.2.3 Objetivos Específicos:

- Desenvolver uma formulação com novo ativo de origem vegetal.
- Demonstrar efeito neuroprotetor de ativos vegetais em modelo *ex vivo*, após irradiação UVA e UVB.

## 2.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo comprovou que há uma redução nas terminações livres da pele, após radiação UV. Demonstramos, também, que não ocorre proteção total destas terminações com a aplicação de protetor solar. Porém, ao testarmos uma formulação com filtros solares e novo ativo vegetal observamos que há uma total proteção das terminações nervosas da pele, independente da idade e tecido (mama ou abdômen).

As terminações nervosas livres têm função primordial para a conservação da vida, pois recebem informações do ambiente e estas informações fazem com que o indivíduo perceba o que é maléfico para si. A percepção de dor é recebida e interpretada, fazendo com que percebamos o que prejudicará nossa saúde. A pele está ligada ao SNC através destas terminações nervosas cutâneas (terminações nervosas que chegam até a base da epiderme). Entre estas terminações nervosas e as células da pele, circulam mensageiros, substâncias imunomoduladoras, neurotransmissores e hormônios (88). Desta perfeita comunicação depende a normalidade de fenômenos fisiológicos tais como a renovação da pele, a cicatrização, a resposta imune, a síntese dos pigmentos que determinam a cor da pele (melanina), entre outros (74).

Segundo Bishop (89), a radiação UVB produz redução na sensibilização e no mecanismo de dor periférica. Este estudo vai de encontro aos nossos achados, pois a consequência da destruição das terminações nervosas seria a modificação dos mecanismos de sensibilização.

Acreditamos que a destruição das terminações nervosas livres leva a perda de sensibilidade cutânea. Os indivíduos que sofrem de patologias caracterizadas pela perda da sensibilidade cutânea, como a hanseníase, não percebem a sensação de dor, sendo assim ferem-se gravemente inúmeras vezes e isto agrava o quadro da doença, tornando-os mais propensos a infecções e inflamações graves. Os idosos, segundo Bretan (90), possuem perda de

sensibilidade cutânea, agravando o quadro de edemas e feridas cutâneas comuns em indivíduos senescentes. Isso mostra-nos a importância de estudar a destruição das terminações nervosas pela radiação UV, pois, assim, tornaremos possível o desenvolvimento de novas formulações protetoras e a consequente preservação da qualidade de vida da população.

O presente trabalho observou o efeito agudo da radiação UV nas terminações nervosas livres, desta forma não podemos afirmar o que o efeito crônico da exposição solar produz nas terminações nervosas livres. Outro questionamento do presente estudo seria a possibilidade de estarmos constatando uma diminuição da expressão das células NCAM; contudo, esta possibilidade é improvável, pois a formulação que desenvolvemos mostrou a conservação das terminações nervosas. Sendo assim, se a diminuição da expressão das células NCAM fosse verdadeira ocorreria tanto nos cortes submetidos à proteção com novo ativo, quanto nos cortes controle.

Grewe *et. al*(2001) comprovou a ineficácia dos filtros solares na depleção das células de Langerhans, após radiação UV,(91). Entretanto, o polifenóis – compostos antioxidantes do chá verde- diminuem a depleção das células de Langerhans na pele, após radiação UV (31). Comprovando que o espectro de radiação UV, que causas danos celulares, não é alcançado pelos filtros solares atuais e reafirmando que a ação dos compostos antioxidantes ocorre de maneira diferenciada.

O FDA, bem como todas as outras entidades do mundo que regulam os setores cosmético e farmacêutico, exigem que as indústrias verifiquem somente o quanto o filtro solar protege a formação de eritema na pele. O nosso trabalho vai de encontro com inúmeras outras pesquisas (92,93,31), estas observam que há inúmeras estruturas que sofrem danos da radiação UV e precisam ser protegidas. Desta forma, é extremamente necessário diferenciar e abranger os testes com filtros solares.

Sendo assim, deve haver incentivos por parte do governo à indústria de cosméticos, para prospecção de produtos que contenham formulações que possam de alguma maneira proteger os efeitos nocivos das radiações UV-A e UV-B e não

somente proteger a pele de eritema. Seria interessante buscar a ampliação de nossos conhecimentos com estudos *in vivo*, cuja limitação, até o momento, envolve questões éticas e humanas.

A utilidade deste trabalho é mostrar que há muito que desenvolver quando falamos de danos dos raios UV na pele e como preveni-los. Trabalhos futuros deverão elucidar o mecanismo de destruição das terminações nervosas da pele, bem como se há alguma relação com a depleção das células de Langerhans.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yaar M, Gilchrist BA. Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. *Clin Geriatr Med* 2001;17(4):617-30, v.
2. Papaléo Netto M. PJR. 1996. São Paulo: Atheneu; Envelhecimento: desafio na transição do século.
3. Friedrich U, Griesse E, Schwab M, Fritz P, Thon K, Klotz U. Telomere length in different tissues of elderly patients. *Mech Ageing Dev* 2000;119(3):89-99.
4. Winker MA. Aging: a global issue. *Jama* 1997;278(16):1377.
5. Arking. *Biology of Aging: Observations and Principles*. Massachusetts: Sinauer Associates.; 1998.
6. Hayflick. Theories of biological aging. *Experimental Gerontology* 1985;20(145).
7. Semsei. On the nature of ageing. *Mechanisms of ageing and development* 2000;117(93).
8. Grundmann-Kollmann MPM. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing, and their role in skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology* 2001(26):578-82.
9. Corte T. Desenvolvimento e avaliação da eficácia de emulsões cosméticas para xerose senil. PORTO ALEGRE: PUCRS; 2006.
10. Boisnic S BM. Cutaneous chronologic aging. *EMC Dermatologie Cosmetologie*, 2005;4(2):232-41.
11. Allsopp RC. Models of initiation of replicative senescence by loss of telomeric DNA. *Exp Gerontol* 1996;31(1-2):235-43.
12. HAYFLICK L. Como e por que envelhecemos. Rio de Janeiro: campus; 1997.

13. Hayflick. Living forever and dying in the attempt. *Experimental Gerontology* 2003;11-12(38):1231-41.
14. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(11):7124-8.
15. Kohen R, Fanberstein D, Tirosh O. Reducing equivalents in the aging process. *Arch Gerontol Geriatr* 1997;24(2):103-23.
16. Yaar M, Eller MS, Gilchrest BA. Fifty years of skin aging. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2002;7(1):51-8.
17. Kohen R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress--new approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother* 1999;53(4):181-92.
18. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* 2002;1(2):117-23.
19. Benedetto AV. The environment and skin aging. *Clin Dermatol* 1998;16(1):129-39.
20. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(2):247-54.
21. Brown AL, Lane J, Coverly J, Stocks J, Jackson S, Stephen A, et al. Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: randomized controlled trial. *Br J Nutr* 2009;101(6):886-94.
22. Amano S. Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2009;14(1):2-7.
23. Yaar M, Gilchrest BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol* 2007;157(5):874-87.
24. Ramos-e-Silva M, Carneiro SC. Cosmetics for the elderly. *Clin Dermatol* 2001;19(4):413-23.

25. Rittie L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 2002;1(4):705-20.
26. Tzaphlidou M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. *Micron* 2004;35(3):173-7.
27. Laube S. Skin infections and ageing. *Ageing Res Rev* 2004;3(1):69-89.
28. Holtkotter O, Schlotmann K, Hofheinz H, Olbrisch RR, Petersohn D. Unveiling the molecular basis of intrinsic skin aging(1). *Int J Cosmet Sci* 2005;27(5):263-269.
29. Kohl E, Landthaler M, Szeimies RM. [Skin aging]. *Hautarzt* 2009;60(11):917-33; quiz 934.
30. Farage MA, Miller KW, Berardesca E, Maibach HI. Clinical implications of aging skin: cutaneous disorders in the elderly. *Am J Clin Dermatol* 2009;10(2):73-86.
31. Seite S, Zucchi H, Moyal D, Tison S, Compan D, Christiaens F, et al. Alterations in human epidermal Langerhans cells by ultraviolet radiation: quantitative and morphological study. *Br J Dermatol* 2003;148(2):291-9.
32. Hornebeck W. Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol Biol (Paris)* 2003;51(10):569-73.
33. Hadshiew IM, Eller MS, Gilchrest BA. Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair. *Am J Contact Dermat* 2000;11(1):19-25.
34. Kim HH, Lee MJ, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC, et al. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech Ageing Dev* 2005;126(11):1170-7.
35. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci* 2008;30(2):87-95.

36. Okuno. Radiação ultravioleta: características e efeitos. São Paulo: Livraria da Física.; 2005.
37. Harris M. Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento. São Paulo: Senac editora; 2003.
38. Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Lin P, McPhillips F, Wang Z, et al. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest* 1998;101(6):1432-40.
39. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002;138(11):1462-70.
40. Pittelkow MR, Coffey RJ, Jr., Moses HJ. Keratinocytes produce and are regulated by transforming growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 1988;548:211-24.
41. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 1997;89(7):1165-73.
42. Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2005;280(9):8079-85.
43. Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation blocks cellular responses to transforming growth factor-beta by down-regulating its type-II receptor and inducing Smad7. *J Biol Chem* 2001;276(28):26349-56.
44. Ruland J, Mak TW. Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol Rev* 2003;193:93-100.
45. Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Photoaging: pathogenesis, prevention, and treatment. *Clin Geriatr Med* 2001;17(4):643-59, v-vi.

46. Hennessy A, Oh C, Rees J, Diffey B. The photoadaptive response to ultraviolet exposure in human skin using ultraviolet spectrophotometry. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005;21(5):229-33.
47. Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res* 2005;571(1-2):153-73.
48. Legat FJ, Jaiani LT, Wolf P, Wang M, Lang R, Abraham T, et al. The role of calcitonin gene-related peptide in cutaneous immunosuppression induced by repeated subinflammatory ultraviolet irradiation exposure. *Exp Dermatol* 2004;13(4):242-50.
49. Legat FJ, Wolf P. Cutaneous sensory nerves: mediators of phototherapeutic effects? *Front Biosci* 2009;14:4921-31.
50. Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, et al. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 1993;363(6425):159-63.
51. Yano K, Kadoya K, Kajiya K, Hong YK, Detmar M. Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and by downregulation of thrombospondin-1. *Br J Dermatol* 2005;152(1):115-21.
52. Seite S, Medaisko C, Christiaens F, Bredoux C, Compan D, Zucchi H, et al. Biological effects of simulated ultraviolet daylight: a new approach to investigate daily photoprotection. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2006;22(2):67-77.
53. Darlington S, Williams G, Neale R, Frost C, Green A. A randomized controlled trial to assess sunscreen application and beta carotene supplementation in the prevention of solar keratoses. *Arch Dermatol* 2003;139(4):451-5.
54. Green A, Williams G, Neale R, Hart V, Leslie D, Parsons P, et al. Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999;354(9180):723-9.
55. Dennis LK, Beane Freeman LE, VanBeek MJ. Sunscreen use and the risk for melanoma: a quantitative review. *Ann Intern Med* 2003;139(12):966-78.

56. Diffey BL. Sunscreens and melanoma: the future looks bright. *Br J Dermatol* 2005;153(2):378-81.
57. Pinnell SR, Fairhurst D, Gillies R, Mitchnick MA, Kollias N. Microfine zinc oxide is a superior sunscreen ingredient to microfine titanium dioxide. *Dermatol Surg* 2000;26(4):309-14.
58. DeBuys HV, Levy SB, Murray JC, Madey DL, Pinnell SR. Modern approaches to photoprotection. *Dermatol Clin* 2000;18(4):577-90.
59. Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Australas J Dermatol* 1996;37(4):185-7.
60. Bech-Thomsen N, Wulf HC. Sunbathers' application of sunscreen is probably inadequate to obtain the sun protection factor assigned to the preparation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1992;9(6):242-4.
61. Gasparro FP, Mitchnick M, Nash JF. A review of sunscreen safety and efficacy. *Photochem Photobiol* 1998;68(3):243-56.
62. Lowe NJ. An overview of ultraviolet radiation, sunscreens, and photo-induced dermatoses. *Dermatol Clin* 2006;24(1):9-17.
63. Janjua NR, Mogensen B, Andersson AM, Petersen JH, Henriksen M, Skakkebaek NE, et al. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *J Invest Dermatol* 2004;123(1):57-61.
64. Schallreuter KU, Wood JM, Farwell DW, Moore J, Edwards HG. Oxybenzone oxidation following solar irradiation of skin: photoprotection versus antioxidant inactivation. *J Invest Dermatol* 1996;106(3):583-6.
65. Deflandre A, Lang G. Photostability assessment of sunscreens. Benzylidene camphor and dibenzoylmethane derivatives. *Int J Cosmet Sci* 1988;10(2):53-62.

66. Jung K, Seifert M, Herrling T, Fuchs J. UV-generated free radicals (FR) in skin: their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2008;69(5):1423-8.
67. Dumay O, Karam A, Vian L, Moyal D, Hourseau C, Stoebner P, et al. Ultraviolet A1 exposure of human skin results in Langerhans cell depletion and reduction of epidermal antigen-presenting cell function: partial protection by a broad-spectrum sunscreen. *Br J Dermatol* 2001;144(6):1161-8.
68. Nielsen KP, Zhao L, Stamnes JJ, Stamnes K, Moan J. The importance of the depth distribution of melanin in skin for DNA protection and other photobiological processes. *J Photochem Photobiol B* 2006;82(3):194-8.
69. Slominski A, Pawelek J. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin Dermatol* 1998;16(4):503-15.
70. Chen WP, Chang YC, Hsieh ST. Trophic interactions between sensory nerves and their targets. *J Biomed Sci* 1999;6(2):79-85.
71. Latreille J, Gardinier S, Ambroisine L, Mauger E, Tenenhaus M, Guehenneux S, et al. Influence of skin colour on the detection of cutaneous erythema and tanning phenomena using reflectance spectrophotometry. *Skin Res Technol* 2007;13(3):236-41.
72. Del Bino S, Sok J, Bessac E, Bernerd F. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Res* 2006;19(6):606-14.
73. Waris T, Astrand K, Hamalainen H, Piironen J, Valtimo J, Jarvilehto T. Regeneration of cold, warmth and heat-pain sensibility in human skin grafts. *Br J Plast Surg* 1989;42(5):576-80.
74. Bishop T, Ballard A, Holmes H, Young AR, McMahon SB. Ultraviolet-B induced inflammation of human skin: characterisation and comparison with traditional models of hyperalgesia. *Eur J Pain* 2009;13(5):524-32.
75. Bretan O, Pinheiro RM, Corrente JE. Balance and plantar cutaneous sensitivity functional assessment in community-dwelling elderly. *Braz J Otorhinolaryngol*;76(2):219-24.

76. Grewe M. Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. *Clin Exp Dermatol* 2001;26(7):608-12.
77. Lu YP, Lou YR, Xie JG, Peng QY, Liao J, Yang CS, et al. Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(19):12455-60.
78. Rice-Evans C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;220(4):262-6.

## ANEXO

- Aprovação do comitê de Ética

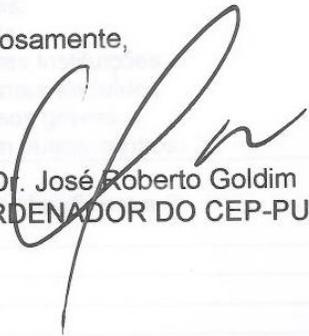
Entregando relatórios aos pesquisadores. De acordo com o item VII.13.2, da Resolução CNS 466, tais relatórios deverão ser anuais (parciais ou finais, em função da duração da pesquisa). Nos trabalhos sobre "Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos ou não registrados no país" (Art. 1º, III), os relatórios deverão ser semestrais (Resolução CNS 351/97, item V.1.c). Portanto, solicitamos a Vossa Senhoria examinar ao CEP, relatório de sua pesquisa conforme situação da pesquisa acima mencionada.

**Título do Projeto:** O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03326, intitulado: **"Efeitos da radiação UV-A e UV-B sobre a imunidade e terminações nervosas da pele humana"**.

**provação:** 26/12/2006 **Aprovação CONEX:** data:  
**relatórios Entregues:** 26/09/2007  
**relatório(s) do pesquisador responsável:** Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

**tipo de Pesquisa:** Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser entregues a este CEP.

Projeto		Fase		Mecanismo	
Nacional	Internacional	Tratado concluído			
Situação atual do projeto		2. Nº de pessoas pesquisadoras:			
Iniciado data:		Pessoa Físicas:			
Início data:		Pessoa Jurídica:			
Data início:		3. Nº de participantes:			
Data término:		4. Eventos adversos:			
Interrupção temporária data:		No curso: 1. em			
Encerrado data:		1. em			
Recursos financeiros necessários:		1. em			
Anexo não disponível:		1. em			
Resultado total (local):					
Observações:					
Parâmetro CEP:					

Atenciosamente,  
  
Prof. Dr. José Roberto Goldim  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Dr(a) Moises Evandro Bauer  
N/Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [cep@pucrs.br](mailto:cep@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/prppg/cep](http://www.pucrs.br/prppg/cep)