

Avaliação bioquímica e toxicológica de uma água mineral brasileira e seus efeitos cutâneos em uso tópico

Biochemical and toxicological assessment of a Brazilian mineral water and its effects on the skin

RESUMO

Introdução: A indústria de cosméticos francesa comercializa águas minerais como tendo benefícios biológicos.

Objetivo: O presente estudo analisa, *in vitro* e *in vivo*, a composição oligomineral, assim como as características físico-químicas e efeitos biológicos de uma água mineral brasileira.

Métodos: Foram conduzidos testes para avaliar as propriedades químicas, a citotoxicidade (células viáveis) e a irritabilidade (teste het-cam). Estudos *in vitro* foram realizados para avaliar a capacidade de indução de expressão gênica e de detecção imunohistogênica de filagrina e aquaporina 3, de atividade de nf-kb e de proliferação de fibroblastos, em relação à água Milli Q.

Resultados: A água estudada apresentou um alto índice de estrôncio (0,61 mg/ml). A expressão da filagrina e respectivos testes imunohistoquímicos foram relevantes. A aquaporina 3 aumentou 1,8 vezes e a atividade do nf-kb decresceu 47%. A água em questão também foi capaz de estimular a proliferação de fibroblastos.

Conclusão: A avaliação dessa água mineral originária da Serra do Japi (SP, Brasil), indica a existência de potencial para figurar como tratamento adjuvante em dermatologia, pois os resultados sugerem que há hidratação da barreira cutânea, estímulo à proliferação de fibroblastos, além da reparação e inibição de reações inflamatórias. Estudos clínicos adicionais devem ser realizados para que tais resultados sejam confirmados.

Palavras-chave: águas minerais; Brasil; cosméticos.

ABSTRACT

Introduction: The French cosmetics industry sells spring mineral waters that are advertised as having biological benefits.

Objective: This study analyzes, *in vitro* and *in vivo*, a Brazilian mineral water's oligominerals composition, as well as its physical and chemical characteristics and biological effects.

Methods: Tests to evaluate physical chemical properties, cytotoxicity (viable cells) and irritability (het-cam test) were conducted. *In vitro* studies were performed to evaluate its capacity to induce the genic expression and immunohistochemical detection of filaggrin and aquaporin 3, nf-kb activity and fibroblast proliferation compared to Milli Q water.

Results: This water was found to be non-cytotoxic and non-irritating. In addition, it presented a high content of strontium (0.61 mg/ml). The expression of filaggrin and its immunohistochemical tests were relevant. The aquaporin 3 increased 1.8 times and nf-kb decreased its activity by 47%. It was also capable of stimulating fibroblast proliferation.

Conclusion: The initial evaluation of the mineral water from Serra do Japi (SP, Brazil) indicates that it has the potential to be an adjuvant treatment in dermatology, since the results suggest it moisturizes the skin barrier, stimulates the proliferation of fibroblasts, and repairs and inhibits inflammatory reactions. Clinical studies should be done in order to reassure the *in vitro* results achieved on the present study.

Keywords: mineral waters; Brazil; cosmetics.

Artigo Original

Autores:

Samanta Nunes¹
Bhertha Miyuki Tamura²

¹ Dermatologista e diretora médica da ZSN Associados – São Paulo (SP), Brasil.

² Chefe do ambulatório de especialidades do Hospital Heliópolis – São Paulo (SP), Brasil.

Correspondência para:

Samanta Nunes
Rua Diogo Moreira, 132/915 – Brooklin Novo
04569-011 – São Paulo – SP
E-mail: nunes.samanta@uol.com.br

Data de recebimento: 10/05/2011
Data de aprovação: 30/08/2011

Trabalho realizado no Instituto de Bioengenharia da Pele - EVIC Brasil Ltda e Tridskin Laboratórios Ltda.

Suporte financeiro: Trabalho recebeu material do laboratório Puralnova para análise.
Conflito de interesse: Material fornecido pelo laboratório Puralnova para realização do estudo.

INTRODUÇÃO

Muitos estudos publicados na literatura demonstraram que as fontes possuem águas minerais ou termais com diferentes características físico-químicas e que essas diferenças podem ter influência na aplicação clínica na dermatologia. Sendo o Brasil rico em bacias hidrográficas e fontes de águas minerais, a análise de águas minerais brasileiras é oportunidade de aproveitar e valorizar os recursos naturais a fim de utilizá-los de forma comprovada em afecções dermatológicas. O presente estudo visa descrever uma água mineral brasileira, suas características e efeitos biológicos, bem como estudos clínicos realizados na pele. A água mineral a ser descrita é originária das águas pluviais infiltradas no subsolo da fonte Alvorada, localizada na Mineração Joana Leite Ltda, na Serra do Japi, em Jundiá. A Serra do Japi é marco geológico, com centenas de quilômetros quadrados e com cobertura de florestas atlânticas de planalto, representando um dos maiores refúgios de biodiversidade florística e faunística do Estado de São Paulo. Suas rochas, extremamente duras, figuram entre as mais antigas da região (datam de mais de 570 milhões de anos) e, com seus mais de 1.200 metros de altitude, foram cobertas por geleiras. O clima da região é tropical, com temperaturas médias anuais variando entre 18 e 20°C, com volume anual de precipitações na ordem de 1.300ml.

OBJETIVOS

Estudar a composição e as características biológicas da água mineral da Serra do Japi, proveniente da fonte Alvorada, localizada em território de mata atlântica no Estado de São Paulo, Região Sudeste do Brasil. Das características físico-químicas e biológicas, pretendeu-se avaliar a segurança e a eficácia *in vitro*, bem como verificar os efeitos biológicos a confirmar clinicamente.

MÉTODOS

Características físico-químicas, citotoxicidade e irritabilidade ocular

Foram avaliadas as características físico-químicas, citotoxicidade (células viáveis) e irritabilidade ocular (HET-CAM) da água mineral da fonte Alvorada. O teste de citotoxicidade foi realizado em cultura de células (fibroblastos Balb/C 3T3, clone A31). O método baseou-se na redução do crescimento celular e contagem de células viáveis, o que indica a citotoxicidade. O teste de irritabilidade (HET-CAM) foi realizado com um controle positivo (solução de SDS a 1%), um controle negativo (solução salina) e uma amostra de água sem minerais (Água Milli Q).

Estimulação da expressão gênica de filagrina e aquaporina 3

Foram ainda realizados estudos para avaliar a expressão gênica de filagrina e de aquaporina 3 pelo teste chamado Real Time PCR. Queratinócitos humanos (Cascade Biologics, EUA) foram cultivados, e, após seis horas de contato com a água mineral, o RNA total foi extraído utilizando-se Trizol[®] Solution (Applied Biosystems) e quantificado através da utilização de Quant-iT[™] RNA Assay Kit (Invitrogen) realizando-se a leitura

no equipamento Quibit[®] Fluorometer (Invitrogen). Os testes foram conduzidos em um aparelho StepOnePlus (Applied Biosystems). Para a realização dos ensaios de expressão gênica de filagrina, foi utilizado um sistema de ensaio TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems); para análise da expressão gênica de aquaporina 3, o kit EXPRESS One-Step SYBR[®] GreenER[™] (Invitrogen). Em ambos os estudos, a quantidade relativa de mRNA foi calculada conforme descrito por Pfaffl¹ e Gregory & Edith.² Para avaliar a estimulação da expressão gênica de filagrina, foi realizada, ainda, análise imuno-histoquímica em microscópio de fluorescência (Leica – DM 1000) de fragmentos de pele *ex-vivo*, coletados após a cirurgia plástica. Os anticorpos utilizados para essa análise foram: anticorpo primário antifilagrina (Santa Cruz; sc-AKH1) e anticorpo secundário Alexa Flour 488-Goat anti Mouse (Invitrogen; A11001).

Diminuição da atividade do fator de transcrição nuclear (NF-κβ)

A atividade do NF-κβ foi avaliada por meio de cultura de queratinócitos humanos. As células foram submetidas à radiação UVA/UVB e mantidas novamente em contato com o produto por mais 24 horas. A atividade do NF-κβ foi mensurada utilizando *kit* da empresa Cayman Chemical, EUA.

Estimulação da proliferação de fibroblastos

Para avaliar o estímulo do crescimento celular, foi feita fixação e lise, com leitura de absorbância a 260nm. Utilizou-se o plaqueamento em meio DMEM diluído em água desmineralizada (Milli-Q – controle) e outra placa em meio diluído em água mineral da fonte Alvorada.

RESULTADOS

Características físico-químicas

A água mineral da fonte Alvorada é água natural caracterizada pela presença de 15 macro e microminerais. A água mineral da Serra do Japi nasce à temperatura de 21°C, com pH de 5,9, sem nenhuma contaminação microbiológica, em fonte localizada a 970 metros do nível do mar. As características físico-químicas e composição dessa água são apresentadas na tabela 1.

Citotoxicidade e irritabilidade ocular (HET-CAM)

A água mineral da fonte Alvorada não apresentou atividade citotóxica nem potencial irritante no teste HET-CAM.

Estimulação da expressão gênica de filagrina

A incubação da água mineral da fonte Alvorada, em cultura de queratinócitos humanos, foi capaz de aumentar de maneira relevante a expressão relativa de filagrina (mRNA) nas concentrações 12,5 e 6,25% (v/v) (1,75 e 2,87 vezes, respectivamente), conforme pode ser verificado no gráfico 1. Os resultados demonstram aumento de 1,5 vez a expressão gênica de filagrina (m-RNA) em comparação com o grupo-controle.

A maior produção de filagrina também foi evidenciada pela técnica de imuno-histoquímica (Figura 1). Os cortes foram

Tabela 1 - Características físico-químicas da água mineral da fonte Alvorada

Água Mineral da Fonte Alvorada	
Temperatura (°C)	21
pH	5,9
Resíduo seco a 180°C (mg/L)	42,27
Bicarbonatos (mg/L)	27,79
SO ₂ ⁻⁴ (sulfatos) (mg/L)	0,1
Cl ⁻ (cloretos) (mg/L)	0,12
NO ₃ (nitratos) (mg/L)	1,7
F ⁻ (fluoretos) (mg/L)	0,08
Ca ²⁺ (cálcio) (mg/L)	2,87
Mg ²⁺ (magnésio) (mg/L)	1,94
K ⁺ (potássio)(mg/L)	1,89
Na ⁺ (sódio) (mg/L)	3,18
Sr ²⁺ (estrôncio) (mg/L)	0,61
Ba (bário) (ug/L)	0,71
Radioatividade na fonte (maches)	2,28

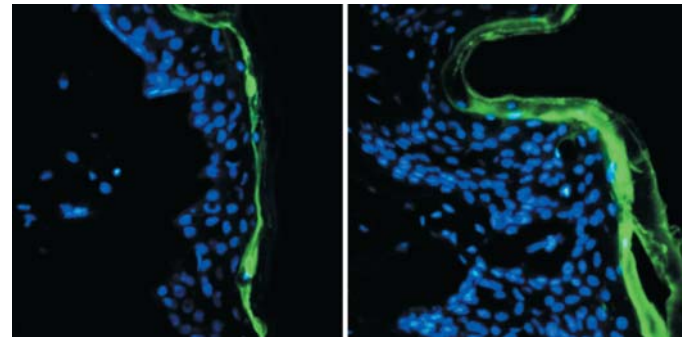


Figura 1 - Imunofluorescência antifilagrina (verde) e contracoloração com Dapi (azul; marcador de DNA). Cortes histológicos de 5Vm em fragmentos de pele humana *ex-vivo* incubados com meio de cultura (controle) (a) e com a água mineral da fonte Alvorada (b) (aumento 40x)

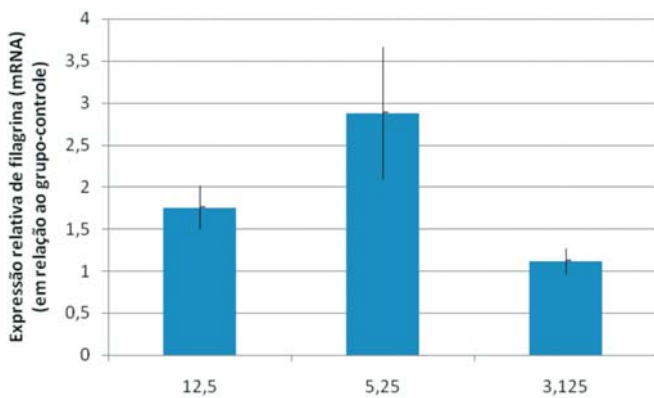


Gráfico 1 - Expressão gênica relativa de filagrina (mRNA) em relação ao grupo-controle em diferentes concentrações da água mineral da fonte Alvorada

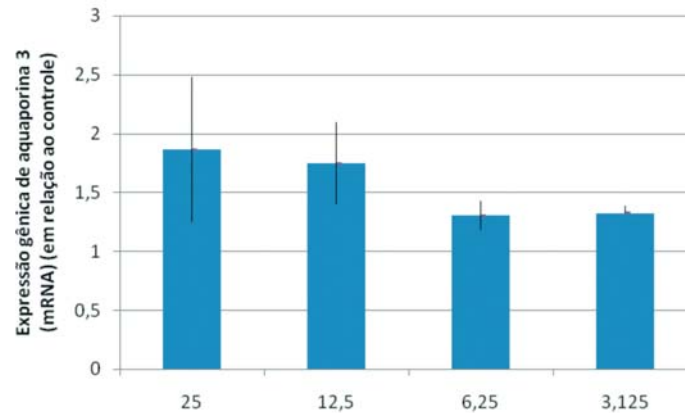


Gráfico 2 - Expressão relativa de mRNA para aquaporina 3 em cultura de queratinócitos humanos incubados com água mineral da fonte Alvorada, em relação ao grupo-controle (água desmineralizada)

incubados com anticorpos antifilagrina (em verde) e marcador de DNA (em azul). As análises foram feitas em microscópio de fluorescência.

Estimulação da expressão gênica de aquaporina 3

Os resultados do gráfico 2 demonstram que a água mineral da fonte Alvorada foi capaz de aumentar de maneira relevante a expressão relativa de aquaporina 3 nas concentrações 25 e 12,5% em 1,8 e 1,7 vez, respectivamente.

Diminuição da atividade do fator de transcrição nuclear (NF-κβ)

Testes científicos com queratinócitos cultivados *in vitro* evidenciaram que a água mineral da fonte Alvorada diminuiu a quantidade de NF-κβ produzido por essas células, especialmente após a exposição solar (Gráfico 3).

Estimulação da proliferação de fibroblastos

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a água mineral da fonte Alvorada teve a capacidade de estimular o crescimento de fibroblastos, com diferença estatisticamente significativa da água Milli Q, usualmente utilizada para o crescimento em culturas de células. Os resultados encontrados estão no gráfico 4.

DISCUSSÃO

As características físico-químicas observadas mostram que a água da fonte Alvorada pode ser classificada como água mineral, mas não termal, visto que ela sai da fonte à temperatura de 21°C, ou seja, quase em temperatura ambiente. A definição de água termal envolve água mineral que sai de sua fonte a pelo menos 4°C acima da temperatura ambiente. Com relação ao pH, verificou-se o valor de 5,9, bem próximo ao pH da pele, o que sugere melhor compatibilidade fisiológica nas afecções cutâneas. O baixo conteúdo de resíduo seco, de 42,27mg/L

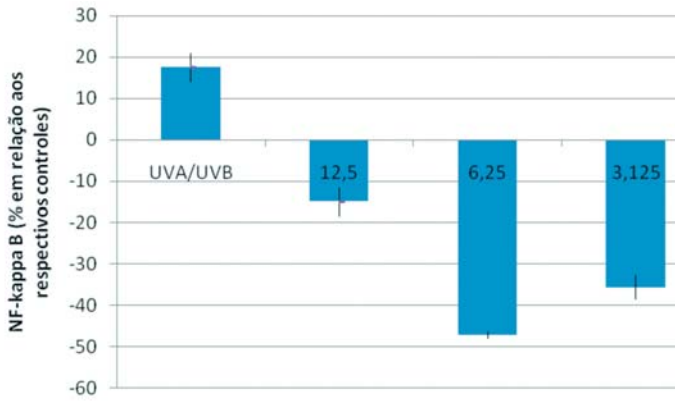


Gráfico 3 - Efeito da água mineral da fonte Alvorada sobre a atividade do NF- κ B em culturas de queratinócitos submetidos à radiação UVA/UVB

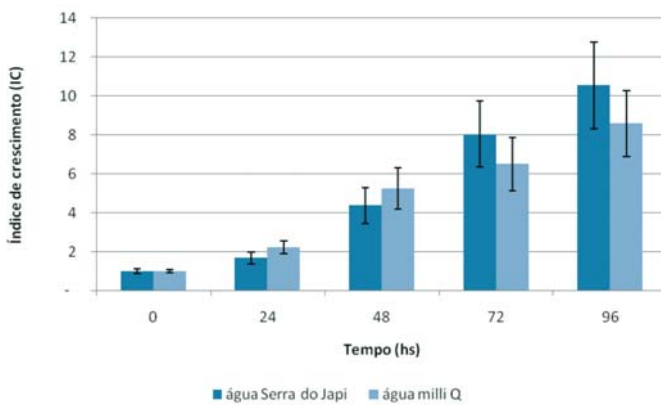


Gráfico 4 - Índice de crescimento de fibroblastos em até 96h, em meio de cultura com água MilliQ (azul-claro) e água mineral da fonte Alvorada (azul-escuro).

(água leve, ou seja, com menor concentração de sais minerais), sugere boa aceitabilidade em afecções com comprometimento de barreira cutânea. Com relação à composição química, vale destacar a alta concentração de estrôncio e cálcio, cujos testes *in vitro* demonstram ação anti-inflamatória. Há indícios, por meio de testes *in vitro*, de que os demais minerais presentes na água mineral da fonte Alvorada sejam adequados ao uso em afecções dermatológicas inflamatórias.

Os testes de citotoxicidade e irritabilidade (HET-CAM) demonstraram a segurança *in vitro* cutânea e ocular da água mineral da fonte Alvorada.

Os testes de expressão gênica de filagrina e sua análise imuno-histoquímica objetivaram analisar a ação dessa água mineral na recuperação da barreira cutânea. A integridade da barreira cutânea e a manutenção do equilíbrio hídrico da pele não podem ser consideradas unicamente pela presença de substâncias específicas, mas sim pela complexidade do equilíbrio entre os elementos de sua composição global.³ Parte desse complexo equilíbrio é gerido pelo envelope corneificado epidérmico

(ECE), uma camada lipoproteica que substitui a membrana plasmática dos corneócitos e consiste de complexa mistura de proteínas interligadas covalentemente associada a uma camada de característica lipídica anexada à superfície extracelular da camada proteica.⁴ Muitos constituintes do ECE têm sido identificados, entre eles, pró-filagrina, filagrina, involucrina, loricrina, diversos subtipos de queratina.⁵ A proteína epidérmica pró-filagrina, sintetizada de forma tardia durante a diferenciação epidérmica, desempenha papel crucial na geração e manutenção da flexibilidade e hidratação do estrato córneo (EC).^{4,6} Durante a transição da camada granular para o EC, a pró-filagrina (altamente fosforilada) é convertida em filagrina por proteólise específica e defosforilação.⁵ Os monômeros resultantes da filagrina associam-se aos filamentos intermediários de queratina e são os verdadeiros responsáveis por sua coesão.^{7,8} No EC a filagrina – proteína catiônica que auxilia na agregação e subsequentes ligações dissulfeto entre filamentos de queratina – é liberada das interações com queratina e totalmente degradada em seus constituintes aminoácidos, tais como PCA e ácido urocânico.^{4,8,9} Esses aminoácidos constituem aproximadamente 50% dos NMFs e são retidos no interior dos corneócitos maduros no EC. Os NMFs são cruciais na manutenção da hidratação da barreira epidérmica e encontram-se reduzidos na pele seca ou ressecada, efeito que é mais pronunciado com o envelhecimento e frente às alterações sazonais. Em condições nas quais a pró-filagrina se encontra diminuída (como na dermatite atópica) ou ausente (como na ictiose vulgar), a qualidade do EC fica comprometida devido à deficiência de NMF e consequente perda de água transepidermica.^{10,11} O aumento da filagrina determinado por esses testes pode ter importância clínica no tratamento coadjuvante de muitas afecções dermatológicas.

Outro teste que denota o aumento da hidratação cutânea pode ser avaliado por meio da expressão gênica de aquaporina 3. As aquaporinas são canais presentes nas membranas plasmáticas das células responsáveis pelo transporte de água e de pequenas moléculas de soluto, especialmente glicerol, essenciais para a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico celular de todos os organismos vivos. São amplamente distribuídas nas membranas celulares e fazem parte de uma classe maior de proteínas denominadas proteínas integrais (“MPIS – *major intrinsic protein*”). Das várias aquaporinas, a AQP3, que se localiza na epiderme, possui maior intensidade nas membranas plasmáticas das células basais e das células intermediárias adjacentes.¹² Como as células da epiderme sofrem constante diferenciação, a presença de AQP3 diminui gradativamente até seu completo desaparecimento na camada queratinizada da pele, denominada estrato córneo. A AQP3 também está presente em estruturas associadas à epiderme como nos folículos e nas glândulas capilares e atuam como maquinaria especializada capaz de suprir a perda excessiva de água.¹³ Outros estudos revelam a capacidade transportadora de água dos canais de aquaporina. A permeabilidade à água nas células da epiderme é inibida por agentes mercuriais e por pH ácido, indicando que realmente o transporte de água é carregado pela presença desses canais.¹⁴ Nesse sentido, mostrou-se que a redução da permeabilidade à água é acompanhada também por

mudanças na permeabilidade ao glicerol, de modo que as AQP3 possuem importante papel na hidratação da epiderme.¹⁵ Queratinócitos, melanócitos, fibroblastos, células endoteliais e adipócitos estão igualmente envolvidos em dinâmica interação capaz de detectar uma variedade de perturbações no ambiente cutâneo e rapidamente transmitir sinais apropriados que alertam e recrutam componentes do sistema imunológico.^{16,17} Uma vez estimuladas, essas células são capazes de ativar e liberar vários fatores que promovem a expressão de inúmeros receptores que estão significativamente envolvidos na imunorregulação e biosíntese de eicosanoides.^{18,19}

Já o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) foi analisado devido a sua importância em muitas doenças dermatológicas. Sabe-se que ele desempenha papel crucial no processo de ativação de genes que codificam a síntese de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas, eicosanoides e óxido nítrico, dando início a uma série de manifestações fisiológicas que culminam na degradação tecidual.^{20,21} Cabe ressaltar que NF- κ B é um dos principais fatores de transcrição envolvidos nos sinais e sintomas observados na pele após exposição aguda à RUV.²⁰ Nesse sentido, produtos contendo substâncias ativas com propriedades anti-inflamatórias e calmantes podem prevenir o dano tecidual e atenuar os aspectos envolvidos no estresse pós-fotoexposição, bem como os sinais característicos no fotoenvelhecimento. O NF- κ B é complexo proteico que regula a resposta imunológica e está envolvido em respostas celulares a estímulos como estresse e radiação ultravioleta.

O último teste *in vitro* realizado analisou a proliferação de fibroblastos induzida pela água mineral em estudo. Sabemos que as células se reproduzem pela duplicação de seus conteúdos e, então, dividem-se em duas. Esse ciclo de divisão celular é a maneira fundamental pela qual todos os seres vivos são reproduzidos. Em espécies multicelulares, diversos ciclos de divisão celular são requeridos, e a divisão celular é necessária para substituir as células que são danificadas, funcionalmente deficientes ou que são perdidas por morte celular programada (apoptose). Assim, um adulto humano precisa manufaturar milhões de novas células a cada segundo simplesmente para manter o estado de equilíbrio, e se a divisão celular é danificada, por exemplo, por uma dose de radiação ionizante, o indivíduo morrerá em poucos

dias.²² O índice de crescimento celular mostra quanto tempo a célula leva para se duplicar ou o período de duplicação celular. A proliferação de fibroblastos observada nesse teste pode ter ocorrido devido à presença de íons necessários para o crescimento celular como, por exemplo, o cálcio.

Todos os testes *in vitro* parecem corroborar a hipótese de que a água mineral da Serra do Japi apresente efeitos biológicos na pele devido a suas características físico-químicas. Uma das substâncias de sua composição, que difere da de outras águas disponíveis comercialmente, é a presença de estrôncio. Hahn²³ demonstrou que sais de estrôncio podem ser usados antes de algum tratamento ou mesmo em associação com a substância irritante com o objetivo de inibir a irritação sensorial e a dermatite irritativa. Em outro estudo de Zhai e colaboradores, foi testada a associação de nitrato de estrôncio a 20% e ácido glicólico a 70%, também demonstrando que o estrôncio poderia suprimir a sensação de irritação quimicamente induzida.²⁴ Em resumo, há indícios de propriedades hidratantes, com ação de reconstituição de barreira cutânea, assim como efeito anti-inflamatório por meio da redução da atividade de NF- κ B. O papel do estrôncio também sugere que essa composição possa reduzir a irritação da pele. Vale ressaltar que este último está envolvido na fisiopatogenia de muitas doenças dermatológicas. Todos os efeitos aqui comprovados *in vitro* ainda devem ser confirmados e testados clinicamente por meio de ensaios controlados.

CONCLUSÃO

O presente estudo pode ser considerado avaliação inicial da água mineral da fonte Alvorada que se mostrou promissora ao sugerir efeitos biológicos de redução de inflamação, de reconstrução de barreira cutânea e de hidratação. A eficácia dos efeitos *in vitro* deve ser comprovada posteriormente por meio de ensaios clínicos. Ademais, considerando que o Brasil é um dos países mais ricos em fontes de águas minerais, vislumbram-se grandes oportunidades de pesquisas relacionadas com os diferentes efeitos biológicos que possam ser observados com as mais diversas águas minerais brasileiras. Conhecer todas as características físico-químicas e biológicas dessa água mineral brasileira é de suma importância no entendimento de sua aplicabilidade clínica e dermatológica. ●

REFERÊNCIAS

1. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2011; 29(9): 2000-7.
2. Gregory E. Miller, Edith Chen. Life stress and diminished expression of genes encoding glucocorticoid receptor and 2 adrenergic receptor in children with asthma. *PNAS.* 2006;103(4); 5496-501.
3. Bouwstra JA, Groenink HW, Kempenaar JA, Romeijn SG, Ponc M. Water distribution and natural moisturizer factor content in human skin equivalents are regulated by environmental relative humidity. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(2): 378-88.
4. Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, et al. Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J Cell Biol.* 2000; 151(2): 389-400.
5. Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol.* 1998; 7(1): 1-10.
6. Harding CR, Scott IR. Histidine-rich proteins (filaggrins). Structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. *J Mol Biol.* 1983; 170(3): 651-73.
7. Resing KA, Walsh KA, Haugen-Scofield J, Dale BA. Identification of proteolytic cleavage sites in the conversion of profilaggrin to filaggrin in mammalian epidermis. *J Biol Chem.* 1989; 264(3): 1837-45.
8. Dale BA, Holbrook KA, Steinert PM. Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in microfibrils. *Nature.* 1978; 276(5689): 729-31.
9. Harding CR, Scott IR. Stratum corneum moisturizing factors. In: Leyden J, Rawlings A, editors. *Skin Moisturization.* Marcel Dekker, New York; 2002. p.61-80.
10. Jackson SM, Elias PM. Epidermis as an organ of protection. In: Fitzpatrick TB et al, editors: *Dermatology in General Medicine*, 4th edition. McGraw-Hill: New York; 1993.
11. Kuechle MK, Presland RB, Lewis SP, Fleckman P, Dale BA. Inducible expression of filaggrin increases keratinocyte susceptibility to apoptotic cell death. *Cell Death Different.* 2000; 7(6): 566-73.
12. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Progr Histochem Cytochem.* 2004; 39(1): 1-83.
13. Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K. Water channel protein AQP3 is present in epithelia exposed to the environment of possible water loss. *J Histochem Cytochem.* 1999; 47(10): 1275-86.
14. Hara M, Verkman AS. Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100(12): 7360-5.
15. Liu H, Wintour EM. Aquaporins in development – a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3: 1-10.
16. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Rev Immunol.* 2004; 4(3): 211-20.
17. Bologna JL. Aging skin. *Am J Med.* 1995; 98 (1A): 99S-103S.
18. Rebholz B, Haase I, Eckelt B, Paxian S, Flaig MJ, Ghoreschi K, et al. Crosstalk between keratinocytes and adaptive immune cells in an IkBa protein-mediated inflammatory disease of the skin. *Immunity.* 2007; 27(2): 296-307.
19. Iversen L, Kragballe K. Eicosanoids in inflammatory and immunological skin disorders. In: *Skin Immune System.* In: Bos JD, editor. 2 ed. CRC Press: New York; 1997. p. 227-37.
20. Tripathi P, Aggarwal A. NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Curr Sci.* 2006; 90(4): 519-531.
21. Luger TA, Beissert S, Schwartz T. The epidermal cytokine network. In: *Skin Immune System.* In: Bos JD, editor. 2 ed.. CRC Press: New York; 1997. p. 271-310.
22. Alberts B. *Biologia molecular das células.* 3ª edição. Artes Médicas, 1997. p.863-910.
23. Hahn GS. Strontium is a potente and selective inhibitor of sensory irritation. *Dermatol Surg.* 1999; 25(9):689-93
24. Zhai H, Hannon W, Hahn GS, Pelosi A, Harper RA, Maibach HI. Strontium nitrate suppresses chemically-induced sensory irritation in humans. *Contact Dermatitis.* 2000; 42(2): 98-100