

# AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE UMA FORMULAÇÃO COSMÉTICA NA PROTEÇÃO DA BARREIRA CUTÂNEA

Ketterlly Inaisder de Lima<sup>1</sup>, Sheila Gomes da Silva<sup>1</sup>, Layane Melody da Silva Reis Cavalcante<sup>1</sup>, Barbara de Freitas Carli<sup>2</sup>, Gustavo Facchini<sup>2</sup>, Ana Lucia Tabarini Alves Pinheiro<sup>2</sup>, Samara Eberlin<sup>2</sup>

@ketterlly.lima@brainfarma.ind.br

<sup>1</sup>Mantecorp Skin Care, Hynova, Alphaville/SP – Brasil

<sup>2</sup>Grupo Kosmoscience, Valinhos/SP – Brasil.

## RESUMO

A pele reage diariamente para conter os danos induzidos pela exposição aos fatores extrínsecos que culminam no aumento da fragilidade e susceptibilidade. Dentre as reações cutâneas, destacamos a sinalização nuclear do receptor aril hidrocarboneto (AhR), que uma vez ativada promove uma cadeia de respostas oxidativas e inflamatórias com consequências inestéticas importantes, como hiperpigmentação e perda da firmeza. Outra resposta da pele, consiste na produção de peptídeos antimicrobianos, como defensinas e catelicidinas, que reforçam a imunidade inata da barreira epitelial. A pele também possui um mecanismo de regeneração epidérmica que pode ser desencadeado por meio do aumento da proliferação celular indicado pela proteína Ki67. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia protetora de uma formulação cosmética para limpeza diária da face (DC-20068-7) por meio da mensuração de  $\beta$ -defensina 2 (BD-2), Ki67 e AhR. DC-20068-7 foi aplicado em cultura de pele humana, proveniente de cirurgia plástica eletiva, na proporção de 25-30 mg/cm<sup>2</sup> para posterior quantificação proteica do marcador de proliferação celular Ki67, por meio de ensaio imunoenzimático. Para avaliação da ativação do receptor AhR, os fragmentos de pele humana foram tratados com DC-20068-7 e expostos à fumaça de cigarro para medição da disponibilidade citoplasmática de AhR por Elisa. Além disso, os fragmentos de pele pré-tratados com DC-20068-7 e expostos ao lipopolissacarídeo de *Staphylococcus aureus* (LPS) foram avaliados quanto a produção do peptídeo antimicrobiano BD-2 (Elisa). Nossos resultados indicam que a formulação cosmética DC-20068-7 estimula a síntese de Ki67, proteína associada à proliferação dos queratinócitos, sugerindo potencial para renovação, e consequentemente, rejuvenescimento da pele. Além disso, observou-se que DC-20068-7 reduz a translocação nuclear do receptor AhR, indicando uma ação antipoluição contra os poluentes xenobióticos produzidos pela fumaça do cigarro. Constatamos também que o produto DC-20068-7 apresenta uma ação antiinflamatória, devido sua habilidade em reduzir os níveis exacerbados de BD-2, produzidos em consequência da incubação com LPS. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o produto DC-20068-7 possui uma ação global na proteção da barreira, atuando na proteção contra os efeitos da poluição e estresse inflamatório, como na habilidade de estimular a proliferação celular e com isso manter a epiderme renovada e saudável.

**Palavras-chave:** Ex-vivo; Poluição; Microbiota; renovação celular.

## INTRODUÇÃO

O estrato córneo (EC), estágio final da diferenciação celular epidérmica, constitui-se de 10 a 15 camadas de células, com uma espessura média de 10  $\mu$ m. Esta fina membrana, composta principalmente por células queratinizadas mortas e anucleadas embebidas em uma matriz lipídica, desempenha um papel essencial na proteção contra os mais agressivos fatores ambientais (Feingold et al, 2012; Wilkes et al, 1973). A integridade da barreira cutânea formada pelo EC depende criticamente de sua composição, com proteínas representando 75-80%, lipídeos 5-15% e demais constituintes 5-10%. Dentre as proteínas, cerca de 5% correspondem ao envelope cornificado epidérmico (ECE), fundamental na organização dos lipídeos intracelulares e na estruturação da barreira cutânea (Hussian et al, 2013).

A pele enfrenta não apenas fatores endógenos, mas também agentes extrínsecos que aumentam sua fragilidade e susceptibilidade a processos infecciosos. Como resposta a esses desafios, o tecido cutâneo produz uma variedade de peptídeos antimicrobianos, como defensinas e catelicidinas, que fazem parte de sua imunidade inata (Wehkamp et al, 2006; Niyonsaba et al, 2007).

A fumaça do cigarro, por exemplo, é composta por mais de 4000 compostos tóxicos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), dioxinas e furanos, exercendo efeitos prejudiciais sobre

a pele. Esses efeitos podem variar desde alterações estéticas até desordens patológicas graves (Kasai et al, 2006; Morita et al, 2009). A mediação desses efeitos adversos ocorre, em grande parte, pelo receptor AhR, que regula a transcrição de genes envolvidos com estresse oxidativo, envelhecimento prematuro e câncer de pele (Morita et al, 2009; Nagamma et al, 2011).

O estresse oxidativo gerado pela fumaça do cigarro resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos, como o malondialdeído, que oxidam lipídeos nas membranas celulares do estrato córneo, comprometendo sua hidratação e função protetora (Yin et al, 2000). Além disso, a fumaça de cigarro afeta o tecido conectivo, resultando em glicação da derme, aumento da produção de metaloproteinases e enfraquecimento no reparo tecidual e cicatrização de feridas.

Diante desses desafios, a pesquisa e desenvolvimento na área cosmética e dermatológica buscam substâncias que possam retardar ou reverter o envelhecimento cutâneo. Estratégias incluem o uso de substâncias antioxidantes, antipoluição, anti-inflamatórias e estimulantes da matriz extracelular. Nesse contexto, a avaliação da proliferação de queratinócitos por meio da proteína nuclear Ki67 emerge como uma ferramenta útil para avaliar a eficácia de produtos destinados à renovação epidérmica e reestruturação do EC (Scholzen et al, 2000; Cuylen et al, 2016; Bruno et al, 1992).

Além disso, a expressão de  $\beta$ -defensina 2 (BD-2) também é um indicador importante da saúde da pele em resposta a agentes patogênicos. A avaliação pré-clínica da manutenção ou estímulo às defesas naturais da pele é crucial para o desenvolvimento de produtos eficazes e direcionados (Langan et al, 2020; Wehkamp et al, 2006; Cieřlik et al, 2021).

Assim, a busca por substâncias que possam retardar ou reverter o processo de envelhecimento cutâneo manter ou estimular às defesas naturais da pele, e prevenir estresses oxidativos são importantes ferramentas na avaliação da eficácia de produtos destinados a pele é uma ferramenta constante de pesquisa e desenvolvimento na área cosmética e dermatológica. Uma estratégia para o desenvolvimento de produtos mais robustos capazes de prevenir os efeitos danosos do envelhecimento e manutenção de uma pele saudável envolve a utilização de substâncias com ações antioxidante, antipoluição, anti-inflamatória e estimulantes da matriz extracelular.

## **OBJETIVOS**

Esse estudo teve como objetivo a avaliação abrangente dos efeitos rejuvenescedores, antipoluição e fortalecimento das defesas naturais da pele de um produto investigacional. Para avaliar o potencial rejuvenescedor, quantificamos a expressão de Ki67 em pele humana ex vivo tratada com o produto. Em seguida, investigamos a eficácia do produto contra a ação da poluição, medindo a expressão de AhR em culturas de pele ex vivo expostas à poluição ambiental e tratadas com o produto. Por fim, examinamos o fortalecimento das defesas naturais da pele relacionadas ao equilíbrio da microbiota, através da quantificação de B-defensina 2 (BD-2) em pele humana ex vivo tratada com o produto. Essas análises abrangentes nos permitem compreender o impacto global do produto na saúde e vitalidade da pele.

## **MATERIAS E MÉTODOS**

### **Cultura de pele humana**

Para esse estudo, optamos como modelo fragmentos de pele ex-vivo, provenientes de cirurgia plastica eletiva e doadas para fins de pesquisa. Os fragmentos utilizados neste estudo foram provenientes de um (01) indivíduo sadio, do sexo feminino, fototipo II, 25 anos, submetido à abdominoplastia. Após a realização do procedimento cirúrgico os fragmentos de pele foram coletados em frascos plásticos contendo soro fisiológico 0,9% e mantidos em refrigeração por até 24 horas. Esse projeto não contemplou o armazenamento e estocagem do material biológico para uso futuro, sendo que os fragmentos sobressalentes foram descartados apropriadamente como lixo infectante. A utilização de fragmentos de pele humana provenientes de cirurgias eletivas para realização deste estudo foi submetida para o Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade São Francisco – SP, CAAE 82685618.9.0000.5514, sob o parecer 2.493.285.

### **Protocolo de tratamento**

A pele dessa doadora foi fracionada em pedaços de aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup>, acondicionados em placas de culturas (Corning, USA) e incubados em meio de cultura. Em seguida, foram tratados com o produto avaliado DC-20068-7 na proporção de 25-30 mg/cm<sup>2</sup>, aplicando o produto em contato com a

epiderme lavando-o logo em seguida. Os fragmentos tratados foram então cultivados por mais 24 horas em meio de cultura e a 37°C.

### **Simulação de estresse de poluição ambiental e simulação de estresse inflamatório**

Para a simulação de poluição ambiental, os fragmentos de pele *ex vivo* foram submetidos apenas ao procedimento de combustão completa de dois (2) cigarros Marlboro (Philip Morris, Brasil), seguida da coleta para quantificação do receptor aril hidrocarboneto (AhR). Para a simulação de estímulo de microrganismos invasores (estresse inflamatório), os fragmentos de pele *ex vivo* foram submetidos a estímulo com LPS (150 µg/mL) por 24 horas, seguida da coleta dos sobrenadantes para quantificação do BD-2. Após estresse, as peles foram lavadas com solução fosfato (PBS) e colocadas em nova placa com meio de cultura e a 37°C, por 24 horas. As peles foram coletadas, pesadas e lisadas com auxílio de beads de sílica para extração das proteínas.

### **Quantificação de AhR e Ki67**

A investigação da atividade de AhR e Ki67 foram mensuradas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits adquiridos comercialmente (R&D Systems; Cloud-Clone Corp, USA). A leitura da absorbância foi realizada em monocromador Multiskan GO (Termo Scientific). Os valores da atividade de AhR e Ki67 foram normalizados pelo peso em gramas da pele cultivada.

### **Quantificação de BD-2**

A produção de B-defensina 2 foi mensurada no sobrenadante através do ensaio de ELISA sanduiche, utilizando kits adquiridos comercialmente (Uscn Life Science Inc., USA e ABclonal, USA). A leitura da absorbância foi realizada em monocromador Multiskan GO.

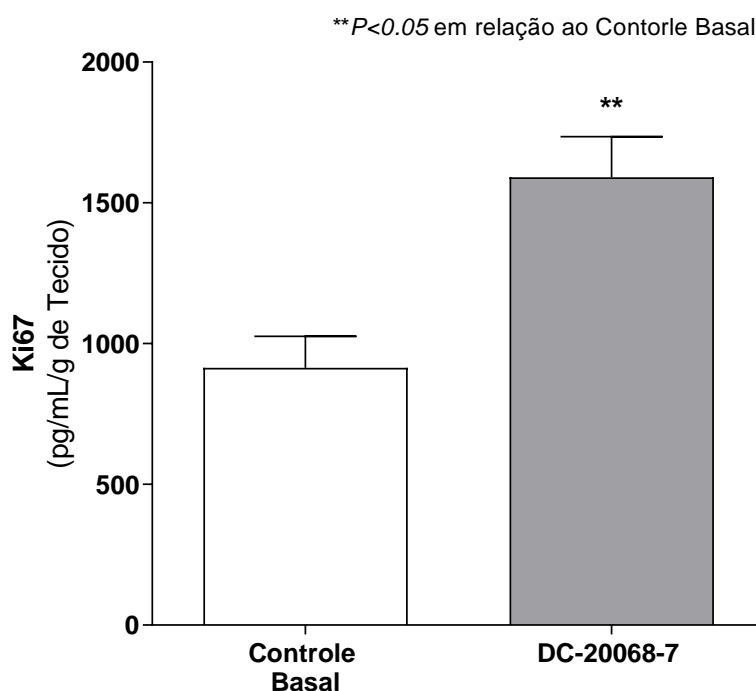
### **Análise estatística**

Para a avaliação estatística da quantificação de Ki67 utilizou-se o teste t de Welch, uma adaptação do teste t adequada para analisar duas populações com variâncias desiguais, já para a avaliação estatística das quantificações de AhR e Ki67, utilizou-se o teste ANOVA que permitiu mensurar a variação dos resultados, comparando os dados entre os grupos. Em seguida foi aplicado o pós-teste Bonferroni, que reforçou e tornou ainda mais preciso o resultado apresentado no teste ANOVA. Foi utilizado o nível de significância de 5% (GraphPad Prism v6).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A regeneração celular é um processo fundamental para a saúde e a vitalidade da pele, especialmente quando se trata de reparar danos causados por agressores ambientais e processos de envelhecimento. Nesse sentido, a quantificação de marcadores celulares como Ki67 desempenha um papel crucial na avaliação da eficácia de tratamentos e produtos cosméticos destinados a promover a regeneração e a renovação da pele. Na Figura 1, podemos observar que o tratamento com o produto avaliado DC-20068-7 resultou em um aumento significativo na quantificação de Ki67, indicando uma maior atividade de regeneração celular em comparação com o grupo controle basal. Esse aumento na produção de Ki67, um marcador de proliferação celular, sugere um efeito positivo do tratamento na estimulação da renovação celular e na promoção da saúde da pele. Esses dados destacam a importância de abordagens terapêuticas que visam estimular a regeneração celular como parte integrante de estratégias de cuidados com a pele.

**Figura 1.** Semi-quantificação de Ki67 em fragmentos de pele humana *ex vivo* incubados com o produto avaliado **DC-20068-7**, através de ELISA. Os dados representam a média ± desvio padrão de 06 áreas (*t test de Welch*).

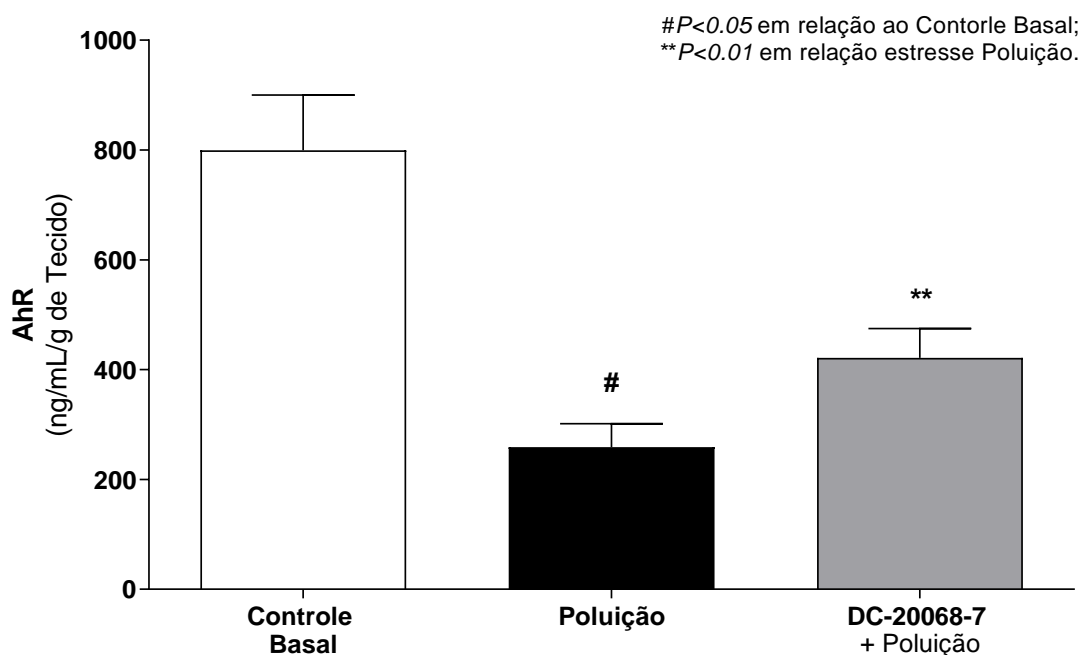


**Tabela 1** Welch's t test da quantificação de Ki67 em fragmentos ex-vivo, comparação entre o controle basal e tratado com DC-20068-7.

<i>Ki67</i>	<i>Welch's t test</i>
<b>Média Basal</b>	913,74
<b>Média DC-20068-7</b>	1591,21
<b>t, df</b>	t=6,436, df=3,773
<b>Valor de P</b>	0,0037
<b>Significante (<math>P &lt; 0,05</math>)</b>	Sim

Em seguida, foi avaliado o efeito o produto avaliado DC-20068-7 sobre a produção de AhR em cultura de pele humana exposta à poluição ambiental (2 cigarros malboro), representada pela figura 2. A exposição à poluição ambiental, incluindo substâncias como a fumaça do cigarro, pode desencadear uma série de efeitos adversos na pele, incluindo inflamação e imunossupressão, através da ativação do receptor aril hidrocarboneto (AhR). Como resultado das quantificações obtivemos um valor médio para os fragmentos tratados com DC-20068-7 de 799,39 ng/ml/g de tecido, um valor médio de 258,89 ng/ml/g para fragmentos somente expostos a poluição ambiental e um valor médio de 421,46 ng/ml/g para o controle basal. Conforme pode-se observar, a exposição dos fragmentos à poluição ambiental promoveu uma redução de aproximadamente 67,61% ( $P < 0,05$ ) na disponibilidade de AhR quando comparado ao Controle Basal não exposto. Esse resultado indica uma possível migração do receptor para o núcleo celular acoplado ao agente xenobiótico o que culmina na ativação dos genes relacionados por exemplo, a inflamação e imunossupressão. O produto avaliado DC-20068-7 demonstrou habilidade em prevenir a translocação nuclear de AhR, apresentando nível maior deste receptor 62,80% - ( $P < 0,01$ ) em relação aos fragmentos expostos à poluição ambiental (aumentos de em relação ao grupo somente exposto).

**Figuar 2.** Efeito do produto avaliado DC-20068-7 sobre a produção de AhR em cultura de pele humana exposta à poluição ambiental. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 03 replicatas (ANOVA - Bonferroni).

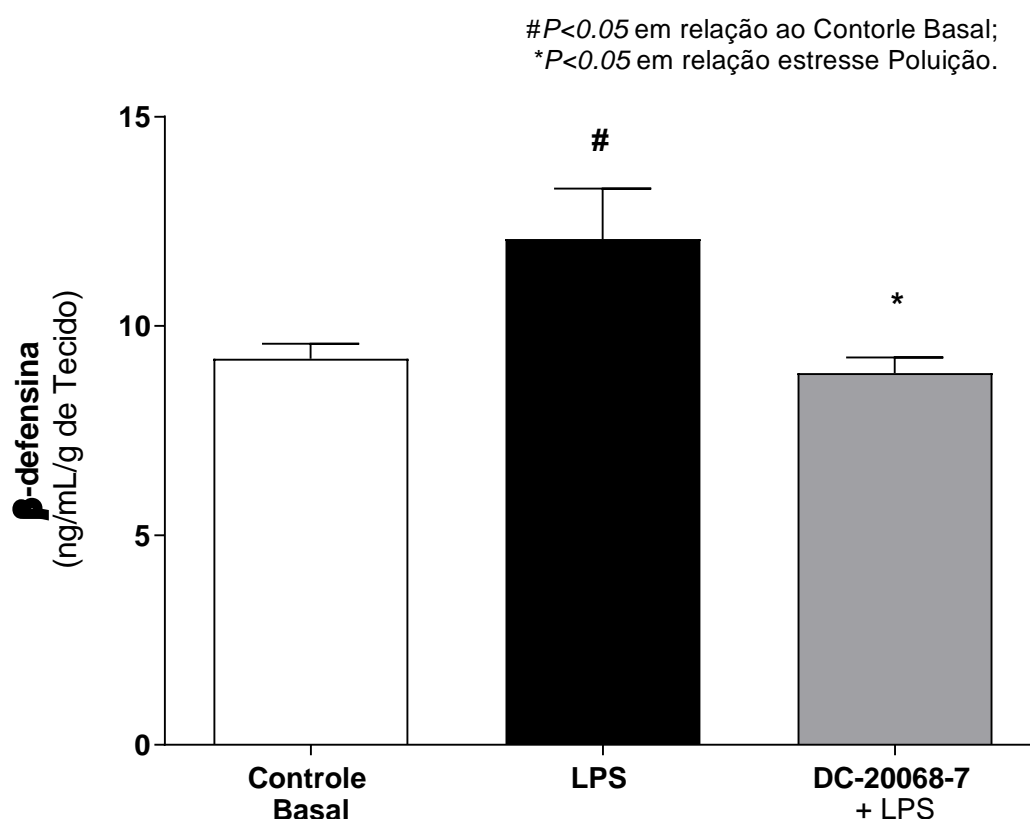


**Tabela 2.** ANOVA test, corrigido por Bonferroni, da quantificação de AhR em fragmentos ex-vivo, comparação do controle de poluição ambiental, o controle basal e o tratado com DC-20068-7.

AhR (ANOVA; Bonferroni)	Controle basal Vs Poluição	Controle basal Vs DC-20068-7	DC-20068-7 vs Poluição
Diferença Média	540,5	377,9	-162,6
t, df	t=13,14, df=2	t=8,606, df=2	t=20,09, df=2
Valor de P	0,0172	0,0397	0,0074
Significante ( $P < 0,05$ )	Sim	Sim	Sim

Por fim, foi realizada a avaliação do efeito o produto avaliado DC-20068-7 na produção de  $\beta$ -defensina 2 (BD-2) no sobrenadante de fragmentos ex-vivo, expostos à estresse inflamatório. A quantificação resultou em um valor médio de 9,22 ng/mL/g de tecido para o controle basal, 12,08 ng/mL/g de tecido para o controle LPS e 8,88 ng/mL/g de tecido para o tratado com o produto avaliado DC-20068-7. Conforme pode-se observar, a exposição dos fragmentos ao LPS promoveu uma redução de aproximadamente 31,03% ( $P < 0,05$ ) na disponibilidade de BD-2 quando comparado ao Controle Basal não exposto. Esse resultado indica um possível aumento na resposta inflamatória, devido ao contato da pele com o xenobiótico LPS. Além disso, o produto avaliado DC-20068-7 demonstrou habilidade em prevenir a translocação nuclear de BD-2, apresentando nível maior deste receptor 26,52% ( $P < 0,05$ ) em relação aos fragmentos expostos somente ao LPS. A manutenção da integridade da barreira cutânea é crucial para proteger a pele contra agressões externas, como micro-organismos patogênicos e agentes irritantes. Nesse contexto, as beta-defensinas, peptídeos antimicrobianos produzidos pelas células da pele, desempenham um papel fundamental. Além de suas propriedades antimicrobianas diretas, as beta-defensinas também estão envolvidas na regulação da homeostase da pele, incluindo a modulação da resposta imune, a cicatrização de feridas e a diferenciação celular.

**Figura 3.** Efeito do produto avaliado DC-20068-7 sobre a produção de BD-2 em cultura de sebócitos humanos. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 03 replicatas (ANOVA - Bonferroni).



**Tabela 3.** ANOVA test, corrigido por Bonferroni, da quantificação de BD-2 em sobrenadante de fragmentos ex-vivo, comparação do controle estresse inflamatório, o controle basal e o tratado com DC-20068-7.

<i><math>\beta</math>-defensina 2 (ANOVA; Bonferroni)</i>	<i>Basal Vs LPS (150 <math>\mu</math>g/ML)</i>	<i>DC-20068-7 Vs Basal</i>	<i>LPS (150 <math>\mu</math>g/ML) Vs DC-20068-7</i>
Diferença Média	-2,860	0,3430	3,203
t, df	t=5,358, df=3	t=1,488, df=3	t=6,997, df=3
Valor de P	0,0382	0,7001	0,0180
Significante (P<0,05)	Sim	Não	Sim

## CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que o produto DC-20068-7 aumentou significativamente a síntese de Ki67, uma proteína associada à proliferação e mitose dos queratinócitos, sugerindo um potencial na renovação e rejuvenescimento da pele. Além disso, observamos que o produto DC-20068-7 reduziu a translocação nuclear do receptor AhR, indicando um possível efeito protetor contra os danos causados pelos poluentes ambientais, evidenciando sua ação antipoluição. Também verificamos que o produto DC-20068-7 reduziu os níveis de BD-2, contribuindo para a proteção da pele contra possíveis inflamações causadas por microrganismos invasores. Esta redução sugere um papel regulador do produto no microbioma cutâneo, particularmente relevante em condições como a dermatite atópica.

## REFERENCIAS

- Abel, J., & Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Chemical Research in Toxicology*, 23, 1235–1248.
- Bruno, S., & Darzynkiewicz, Z. (1992). Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki67 antibody in HL-60 cells. *Cell Proliferation*, 25, 31–40.

- Cieřlik, M., Bagińska, N., Górski, A., & Jończyk-Matysiak, E. (2021). Human  $\beta$ -defensin 2 and its postulated role in modulation of the immune response. *Cells*, 10, 1–18.
- Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A. Z., Muller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., et al. (2016). Ki67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535, 308–312.
- Dupont, E., Gomez, J., & Bilodeau, D. (2013). Beyond UV radiation: A skin under challenge. *International Journal of Cosmetic Science*, 35, 224–232.
- Feingold, K. R., & Denda, M. (2012). Regulation of permeability barrier homeostasis. *Clinical Dermatology*, 30, 263–268.
- Hussain, S. H., Limthongkul, B., & Humphreys, T. R. (2013). The biomechanical properties of the skin. *Dermatologic Surgery*, 39, 193–203.
- Kasai, A., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Yao, J., Maeda, S., & Kitamura, M. (2006). High levels of dioxin-like potential in cigarette smoke evidenced by in vitro and in vivo biosensing. *Cancer Research*, 66, 7143–7150.
- Langan, S. M., Irvine, A. D., & Weidinger, S. (2020). Atopic dermatitis. *The Lancet*, 396, 345–360.
- Lodovici, M., Akpan, V., Evangelisti, C., & Dolara, P. (2004). Sidestream tobacco smoke as the main predictor of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Applied Toxicology*, 24, 277–281.
- Morita, A., Torii, K., Maeda, A., & Yamaguchi, Y. (2009). Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14, 53–55.
- Navid, F., Bruhs, A., Schuller, W., Fritsche, E., Krutmann, J., Schwarz, T., & Schwarz, A. (2013). The aryl hydrocarbon receptor is involved in UVR-induced immunosuppression. *Journal of Investigative Dermatology*, 133, 2763–2770.
- Niyonsaba, F., et al. (2007). Antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 594–604.
- Pelle, E., Miranda, E. P., Fthenakis, C., Mammone, T., Marenus, K., & Maes, D. (2002). Cigarette smoke-induced lipid peroxidation in human skin and its inhibition by topically applied antioxidants. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15, 63–68.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182, 311–322.
- Wilkes, G. L., Brown, I. A., & Wildnauer, R. H. (1973). The biomechanical properties of skin. *CRC Critical Reviews in Bioengineering*, 1, 453–495.
- Yin, L., Morita, A., & Tsuji, T. (2000). Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Archives of Dermatological Research*, 292, 188–194.
- Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., Schröder, J. M. M., & Harder, J. (2006). *Pseudomonas aeruginosa*- and IL-1 $\beta$ -mediated induction of human  $\beta$ -defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF- $\kappa$ B and AP-1. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 121–127.