AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE UM FOTOPROTETOR NA EFICÁCIA ANTIPOLUIÇÃO, ANTIOXIDANTE E NA PROTEÇÃO CONTRA EFEITOS DA RADIAÇÃO INFRAVERMELHA-A

Ketterlly Inaisder de Lima[1], Sheila Gomes da Silva[1], Kleber Roberto Malaquias[1], Layane Melody da Silva Reis Cavalcante[1], Barbara de Freitas Carli[2], Gustavo Facchini[2], Ana Lucia Tabarini Alves Pinheiro[2], Samara Eberlin[2]

@ketterlly.lima@brainfarma.ind.br

[1]Mantecorp Skin Care, Hynova, Alphaville/SP – Brasil
[2]Grupo Kosmoscience, Valinhos/SP – Brasil.

RESUMO

O envelhecimento cutâneo representa um processo multifatorial que tem como mecanismo primordial a produção excessiva de radicais livres, caracterizando um ambiente de estresse oxidativo após exposição da pele às diversas agressões externas. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de um fotoprotetor (DC-23017-65C) na proteção contra os danos causados pela radiação infravermelha-A (IV-A) por meio da quantificação de metaloproteinase de matriz-1 (MMP-1), na ação antipoluição pela quantificação do receptor aril hidrocarboneto (AhR) e na redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pela radiação UV, utilizando modelo experimental de cultura de células e pele humanas. DC-23017-65C foi aplicado em cultura de pele humana ex vivo, para posterior exposição à radiação UV e fumaça de cigarro, e quantificação de ROS e AhR, respectivamente. Para avaliar a produção de MMP-1 o produto foi aplicado em cultura de fibroblastos e expostos à radiação infravermelha-A (IR-A). Os resultados indicam que DC-23017-65C exerce um efeito profilático contra o aumento da síntese de MMP-1 induzida pela radiação IV-A, preservando a estrutura da matriz extracelular, particularmente o colágeno e atenuando o processo de envelhecimento cutâneo. Além disso, observou-se uma redução significativa na translocação nuclear do receptor AhR e com isso o controle da transcrição de genes envolvidos no estresse oxidativo, inflamação, imunossupressão, pigmentação, entre outros, sugerindo um papel protetor contra os efeitos adversos dos poluentes xenobióticos, o que confere ao produto uma função antipoluição eficaz. Adicionalmente, verificou-se uma diminuição do estresse oxidativo nas culturas pré-tratadas com DC-23017-65C, evidenciando seu efeito protetor contra o aumento excessivo da síntese de ROS, induzido pela radiação UV. Esses achados indicam que o produto DC-23017-65C exerce um efeito abrangente, atenuando os efeitos da exposição à diferentes agentes extrínsecos, como radiação UV, IV-A e poluição. Dessa forma, além da proteção física e química do fotoprotetor, o produto atenua a produção excessiva de biomarcadores que culminam no aumento da susceptibilidade do tecido e evidenciam as alterações inestéticas associadas ao envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: Poluição, Infravermelho-A, Ex-vivo, Fotoproteção

INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e está constantemente exposta a uma variedade de agressores ambientais, como radiação ultravioleta (UV), poluição atmosférica e agentes oxidativos. Esses fatores externos podem desencadear danos à pele, conhecidos como fotodano e estresse oxidativo, que contribuem para o envelhecimento precoce, manchas, rugas e outros problemas dermatológicos. Diante desse cenário, a busca por soluções eficazes na área cosmética e dermatológica tem se concentrado no desenvolvimento de produtos capazes de proteger e reparar a pele contra esses danos. Entre essas soluções, destaca-se a utilização de substâncias antioxidantes, que ajudam a neutralizar os radicais livres e a reduzir os efeitos nocivos da poluição e da radiação UV, promovendo assim a saúde e a beleza da pele.

Uma das formas mais comuns de poluição que estamos expostos é a fumaça do cigarro, que contém mais de 4000 compostos tóxicos, incluindo muitos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), dioxinas e furanos que exercem efeitos prejudiciais sobre a pele, podendo resultar desde alterações inestéticas, como perda de elasticidade e firmeza, até desordens patológicas, como má cicatrização de feridas, carcinoma de células escamosas, melanoma, cancro oral, acne, psoríase, eczema e

alopecia (Kasai et al, 2006; Morita et al, 2009). A maioria desses efeitos é mediada pelo receptor AhR (receptor aril hidrocarboneto), um fator de transcrição citosólico encontrado na forma inativa, que se liga ao agente tóxico sendo então translocado para o núcleo da célula onde regula a transcrição de genes envolvidos com estresse oxidativo, envelhecimento prematuro e câncer de pele(Lodovici et al, 2004; Navid et al, 2013). O ato de tragar consiste na ingestão de 10 (Abel et al, 2010; Dupont et al 2013) espécies reativas de oxigênio, como superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilas e peroxil (Pelle et al, 2002). O estresse oxidativo no microambiente celular resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos, como o malondialdeído, altamente reativos e instáveis que podem levar a oxidação de lipídeos nas membranas celulares por todo o extrato córneo, resultando na redução da hidratação e perda da função protetora da barreira cutânea (Yin et al, 2000). No tecido conectivo, os efeitos nocivos da fumaça de cigarro incluem: glicação da derme, aumento da produção de metaloproteinases, enfraquecimento no reparo tecidual e cicatrização de feridas.Assim, a busca por substâncias que possam retardar ou reverter o processo de envelhecimento cutâneo 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 envolve a utilização de substâncias com ações antioxidante, antipoluição, anti-inflamatória e estimulantes da matriz extracelular.

Outro fator rejudicial a pele e que pode acelerar o envelhecimento cutâneo a exposição dano solar que leva a formação de radicais livres como superóxidos e radicais hidroxilas através do processo de fosforilação oxidativa provocando danos aos constituintes celulares lipídicos, proteicos e principalmente aos ácidos nucléicos (Aggrwal et al, 2019; Fabian et al, 2017). O dano solar cutâneo é atribuído quase que exclusivamente à radiação ultravioleta (RUV) a qual representa apenas 6,8% da radiação solar, em comparação com as radiações infravermelha e visível, que representam, respectivamente, 54,3% e 38,9% da energia solar incidente (Yoon et al, 2012).O equilíbrio entre a produção de RLs e a defesa antioxidante natural é essencial para a manutenção da homeostase fisiológica. Se os RLs sobrecarregam a capacidade do corpo de neutralizá-los, uma condição conhecida como estresse oxidativo se instala e aumenta a suscetibilidade do tecido cutâneo, evidenciando de forma impetuosa as alterações estéticas proveniente da formação de proteínas radicaladas (Fabian et al, 2017; Wijeratne et al, 2005).

Além da UV, a radiação do tipo infravermelho (IV) tem despertado interesse da comunidade científica, devido à indução de alterações histológicas similares àquelas induzidas pela exposição crônica à RUV (Bernstein et al, 1995; Schieke et al, 2003). A radiação IV pode causar dois tipos de efeitos: o térmico, que pode ser benéfico ou danoso dependendo da dose, e o dano oxidativo, que fica mais restrito à faixa próxima do infravermelho A (IR-A). A radiação IR-A (760 a 1.500 nm) atinge mais profundamente a pele, sendo que 35% da radiação concentra¬-se na epiderme, 48% na derme e 17% no tecido subcutâneo (Yoon et al, 2012; Skalar et al, 2013). O entendimento da relação de equilíbrio entre a produção e a neutralização de radicais livres favoreceu o desenvolvimento da pesquisa em torno dos marcadores de dano oxidativo utilizando sistemas químicos ou biológicos para avaliar a eficácia de substâncias antioxidantes. Dentre os modelos utilizados, está à mensuração da intensidade de fluorescência emitida pela oxidação da sonda Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) em 2'-7' diclorofluoresceína (DCF) (Aranda et al,2013). Essa técnica nos permite avaliar os efeitos antioxidantes de formulações, frente aos agentes extrínsecos ao qual nossa pele é exposta constantemente. Assim, a neutralização e/ou inibição precoce de RLs, pode prevenir a cascata de sinalização ou reações químicas que inevitavelmente aceleram o envelhecimento.

Além disso, um evento bastante comum após a exposição à radiação IV é a diminuição na síntese das principais proteínas dérmicas, colágeno e elastina, essenciais para a sustentação do tecido. Essa alteração ocorre em consequência do estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio geradas após a exposição à radiação e leva ao aumento de enzimas proteolíticas como a metaloproteinase de matriz tipo 1 (MMP-1). Essa proteinase, por sua vez desencadeia um colapso na matriz extracelular e consequentemente o aparecimento de sinais prematuros do envelhecimento cutâneo (Kim et al, 2006; Cho et al, 2008). Uma estratégia para o desenvolvimento de fotoprotetores mais robustos capazes de prevenir o fotodano causado pela radiação IR-A envolve a utilização de substâncias antioxidantes que evitem o desequilíbrio redox e mantenham a homeostase celular contendo a progressão das reações em cadeia que oxidam substratos orgânicos. Neste sentido, produtos contendo substâncias ativas com propriedades inibidoras das enzimas de degradação dérmica podem ajudar a diminuir e atenuar os aspectos e os sinais do envelhecimento cutâneo.

OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia do produto DC-23017-65C em diferentes aspectos relacionados à saúde da pele. Inicialmente, a ação antipoluição foi investigada por meio da quantificação do receptor AhR em culturas de pele ex-vivo tratadas com o produto e expostas à poluição ambiental. Em seguida, a produção de radicais livres foi avaliada através da semi-quantificação da sonda DCFH-DA em cultura de pele humana tratada com o DC-23017-65C. Por fim, os efeitos pré-clínicos do produto na proteção contra os danos causados pela radiação infravermelha-A foram analisados pela quantificação da MMP-1 em cultura de fibroblastos humanos. Essas análises permitiram uma avaliação abrangente da eficácia do produto em proteger a pele contra os efeitos nocivos da poluição, radiação UV e infravermelha-A, fornecendo informações valiosas para seu desenvolvimento e uso clínico.

MATERIAS E MÉTODOS

Cultura de pele humana

Para esse os testes de efeito antipoluição e antioxidante, 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.

Cultivo de Fibroblatsos e determinação das concentrações não citotóxicas

Para a avaliação do efeito de proteção contra radiação Infravermelha-A, optamos pelo modelo de fibroblastos humanos primários, que foram semeados em garrafas de 75 cm^2 (Corning, USA), cultivados e expandidos em incubadora a 37ºC em presença de 5% de CO_2, utilizando meio de cultura específico. A escolha das concentrações utilizadas foi utilizado o teste de viabilidade celular baseado no corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.). Para a realização do ensaio o produto foi preparado em meio de cultura com Tween 20 e adicionado à placa de 96 poços em uma diluição seriada na faixa de 10,00 a 0,003 mg/mL utilizando o fator de diluição de 3,16 (OECD 129, 2010). A cultura foi incubada por um período de 48 horas. O MTT foi então adicionado na cultura na concentração de 0,75 mg/mL (100 µL/poço) e incubado por adicionais 4 horas. O conteúdo do poço foi removido e 100 µL de isopropanol foram adicionados com o propósito de solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância de cada poço foi determinada a 570nm em monocromador Multiskan GO (Thermo Scientific, Finlândia). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem e calculada conforme a equação:

Equação 1. Cálculo de procentagem de células viaveis pelo método de MTT.

$$\%\ Células\ Viáveis = \frac{Absorbância\ da\ amostra\ incubada\ com\ as\ células}{absorbância\ do\ controle}\ x\ 100$$

Tratamento dos fragmentos de pele e cultura de fibroblastos humanos

Nosso protocolo teve inicio com o fracionamneto dos fragmentos de pele foram em pedaços de aproximadamente 1,5 cm^2, acondicionados em placas de culturas (Corning, USA), incubados em meio de cultura específico, tratados com o produto avaliado DC-23017-65C na proporção de 25-30 mg/cm^2 e mantidos em incubadora a 37°C em presença de 5% de CO^2 por 48h. As culturas celulares, por sua vez, foram incubadas com 3 concentrações não-citotóxicas do produto avaliado determinadas de acordo teste de MTT. As concentrações do produto DC-23017-65C avaliadas neste estudo foram 0.0016; 0.0005 e 0,0002 mg/mL e as células foram mantidas em contato com o produto avaliado por 48 horas

Simulação de estresse de poluição ambiental, Radiação Infravermelha-A e Radiação Ultravioleta.

Para a simulação de poluição ambiental, os fragmentos de pele ex vivo foram submetidos ao procedimento de combustão completa de dois (2) cigarros Marlboro (Philip Morris, Brasil). Após o

estresse, as peles foram lavadas com solução trampão fosfato (PBS), retratadas com o produto avaliado DC-23017-65C e alocadas em condições de cultura semelhante as descritas acima por 24 horas. Posteriormente, os fragmentos de pele ex vivo foram pesados e lisados com auxílio de beads de zircónio para extração de proteínas totais e quantificação do AhR.

Para o estresse de radiação UV, os fragemntos de pele foram submetidos a uma dose de 15 J/cm^2 de radiação ultravioleta (UV), usando os dispositivos UVA Cube 400, SOL 500 H1 filter e UV Meter (Honle UV America Inc., MA, USA). Os fragmentos expostos à radiação UV foram emblocados em Tissue-Tek® O.C.T.™ e, em seguida, secções histológicas seriadas de 12 micrômetros foram coletadas diretamente sobre lâminas silanizadas com criostato (Leica, GER – CRYOCUT 1800). Posteriormente, as secções foram lavadas com tampão fosfato (PB) e incubadas por 1 minuto com solução (1:10.000 em tampão fosfato) de Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma, USA). Para a mensuração de MMP-1, o sobrenadante das culturas de fibroblastos foi coletado.

Por fim, as culturas celulares de fibroblastos foram submetidas a uma dose de 360 J/cm2 de radiação IR-A utilizando os dispositivos Hydrosun 750 e HBM1 (Hydrosun Medizintechnik GmbH, Müllheim, Germany). As células foram incubadas por adicionais 24 horas com o produto avaliado.

Mensurações

A investigação da atividade de AhR foi mensurada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits adquiridos comercialmente (Elabscience, USA). Os valores da atividade de AhR foram normalizado pelo peso em gramas da pele cultivada. As concentrações de MMP-1 foram mensuradas no sobrenadante das culturas de fibroblastos por meio de ensaio de ELISA sanduiche, utilizando kit adquirido comercialmente (R&D Systems, Minneapolis, MN) e os valores foram normalizados pela viabilidade celular das culturas. A leitura das absorbâncias foi realizada a 450nm em monocromador Multiskan GO (Termo Scientific).O parâmetro de intensidade de fluorescência emitido pela oxidação da sonda DCFH-DA foi analisada sob o microscópio (OLYMPUS, JAP – BX53) usando o software CellSens (©2010 OLYMPUS CORPORATION), após a obtenção das imagens, a intensidade de fluorescência foi quantificada com por meio do software ImageJ (versão 1.48, Unidades Arbitrárias – A.U.).

Procedimentos para análise dos dados

Para a avaliação estatística 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%.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A exposição contínua à poluição ambiental representa um desafio significativo para a saúde da pele, resultando em uma série de efeitos adversos, desde alterações estéticas até distúrbios patológicos mais graves. Nesse contexto, a busca por estratégias eficazes para mitigar os efeitos danosos da poluição sobre a pele é de extrema importância. No presente estudo, investigamos o potencial efeito antipoluição de um produto dermatológico, DC-23017-65C, em culturas de pele expostas a agentes poluentes. Além disso, quantificamos a expressão do receptor aril hidrocarboneto (AhR), um marcador chave na resposta celular à poluição. Para a quantificação de AhR obtivemos como valor médio 266,60 pg/ml/g de tecido para o controle basal, um valor médio de 503,66 pg/ml/g de tecido para o grupo exposto a poluição e 344,62 pg/ml/g de tecido para o grupo tratado com DC-23017-65C.

Conforme observado, a exposição dos fragmentos de pele à poluição ambiental resultou em uma redução significativa de aproximadamente 88,93% ($P<0,001$) na disponibilidade de AhR, em comparação com o Controle Basal não exposto. Essa diminuição sugere uma possível migração do receptor para o núcleo celular, associada à ativação de genes relacionados, como aqueles envolvidos em processos inflamatórios e imunossupressão.

No entanto, o produto avaliado DC-23017-65C demonstrou a capacidade de prevenir a translocação nuclear do AhR, apresentando um nível significativamente maior deste receptor, com um aumento de 31,58% ($P<0,001$), em comparação com os fragmentos expostos à poluição ambiental. Esses resultados sugerem que o produto pode oferecer proteção contra os efeitos adversos da poluição sobre a pele, possivelmente através da modulação da resposta celular mediada pelo AhR.

Esses achados destacam a importância do desenvolvimento de produtos dermatológicos com propriedades antipoluição eficazes, visando preservar a saúde e a integridade da pele diante dos desafios ambientais contemporâneos.

Figura 1: Efeito do produto avaliado DC-23017-65C sobre a produção de AhR em cultura de pele humana exposta à poluição ambiental. Os dados representam a média ± desvio padrão de 03 replicatas (ANOVA - Bonferroni).

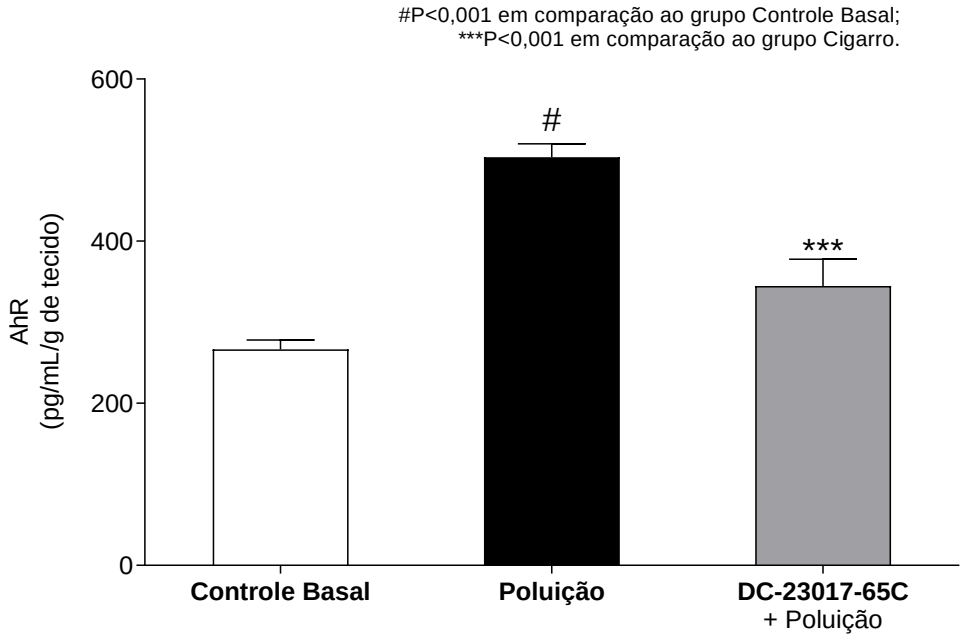


Tabela 1. ANOVA test, corrigido por Bonferroni, da quantificação de AhR em fragmentos ex-vivo, comparação do controle de poluição ambiental, o controle basal e o tratado com DC-23017-65C.

AhR (ANOVA;Bonferroni)	***Controle basal Vs Poluição***	***Controle basal Vs 23017-65C***	***DC-23017-65C vs Poluição***
Diferença Média	-237,1	-78,03	159,0
t, df	t=12,98, df=3	t=4,274, df=3	t=8,711, df=3
Valor de P	0,0001	0,0157	0,0004
Significante (P<0,05)	Sim	Sim	Sim

A exposição à radiação ultravioleta (UV) é uma das principais causas do fotoenvelhecimento da pele, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de estresse oxidativo e danos celulares. Neste estudo, investigamos o potencial efeito antioxidante do produto dermatológico DC-23017-65C em culturas de pele humana submetidas à radiação UV.

Para a semi-quantificação da intendsidade da sonda DCFH-DA obtivemos o valor médio de 12,07 A.U./μM^2 para o controle basal, o valor médio de 34,43 A.U./μM^2 para o grupo submetido somente à radiação UV e um valor médio de 13,71 A.U./μM^2 para o grupo tradato com o produto DC-23017-65C.

Como esperado, a exposição à radiação UV resultou em um aumento expressivo de 185,34% (P<0,001; Figuras 1 e 2) na produção de espécies reativas de oxigênio (RLs), em comparação com o controle não exposto. Esse aumento indica a instalação do estresse oxidativo, um dos principais contribuintes para o fotoenvelhecimento cutâneo. No entanto, o produto avaliado DC-23017-65C demonstrou um efeito protetor contra os danos causados pela radiação UV, prevenindo a produção excessiva de RLs. Esses resultados sugerem que o produto pode desempenhar um papel crucial na neutralização dos efeitos prejudiciais da radiação UV sobre a pele.

Além disso, na Figura 3 apresentamos os resultados da semi-quantificação da produção de RLs, obtida a partir da análise das imagens microscópicas. Observamos que o tratamento com o produto DC-23017-65C promoveu uma redução significativa de 60,19% na produção de RLs, em comparação com a exposição à radiação UV ($P<0,001$). Esses achados reforçam a eficácia do produto na proteção contra os danos oxidativos induzidos pela radiação UV, evidenciando seu potencial como agente antioxidante na manutenção da saúde e integridade da pele.

Figura 2. Avaliação de micrografia fluorescente da síntese de radicais livres (RLs) em cultura de fragmentos de pele humana incubados com o produto avaliado e expostos à irradiação Ultravioleta (UV). A-C – Fragmentos de pele sem tratamento (Controle Basal); D-F – Fragmentos de pele somente expostos à UV; G-I – Fragmentos de pele incubados com o produto avaliado DC-23017-65C . Os RLs estão marcados em verde principalmente na derme e a marcação azul representa o núcleo da célula (DNA; DAPI). A barra de referência corresponde a 50 µm.

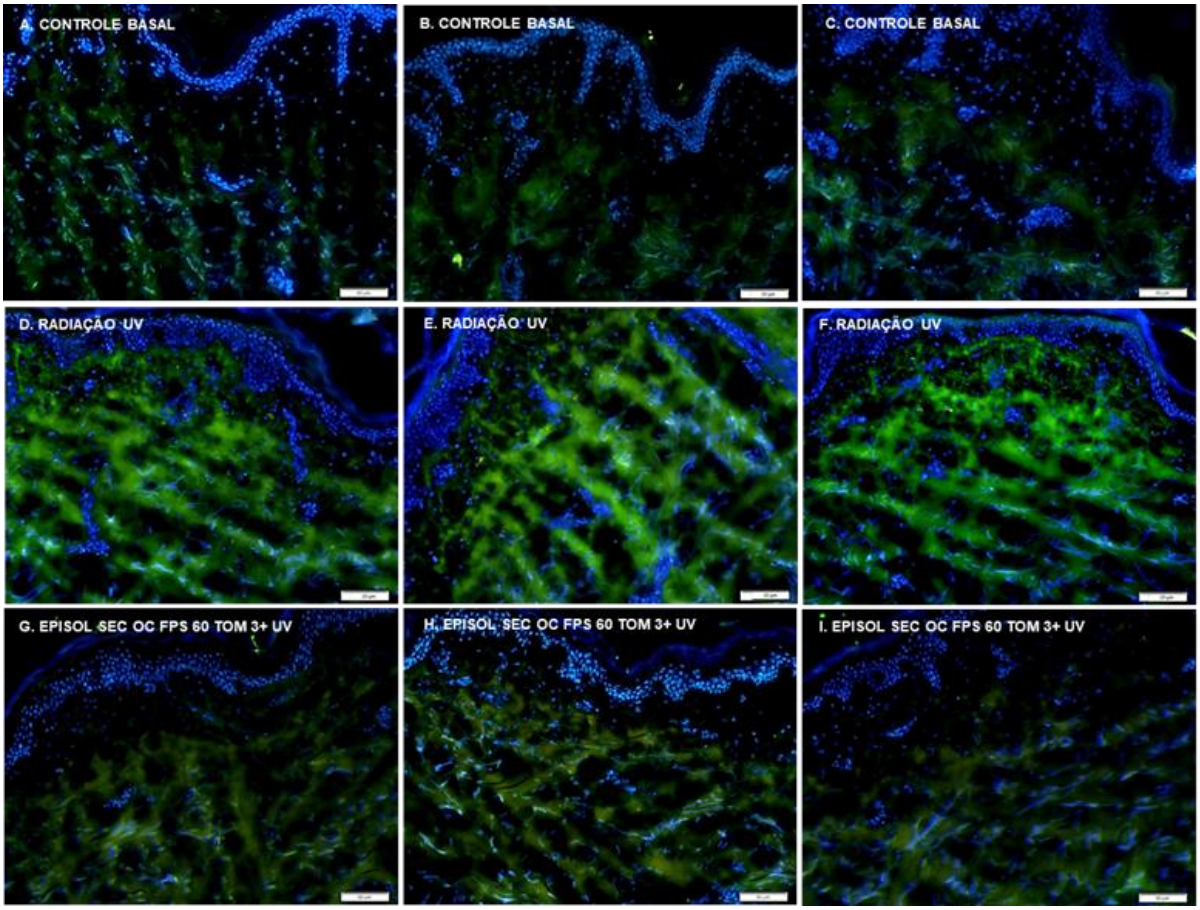


Figura 3. Avaliação da síntese de radicais livres (RLs) em cultura de fragmentos de pele humana incubados com o produto avaliado DC-23017-65C e exposto à radiação Ultravioleta Os dados representam a média ± desvio padrão de 06 replicatas (ANOVA - Bonferroni).

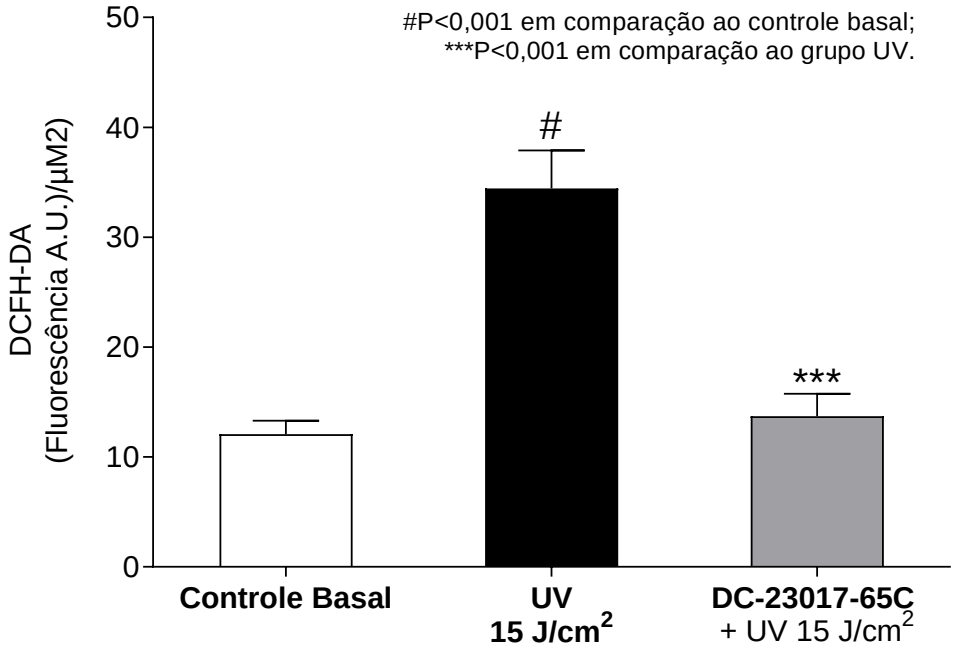


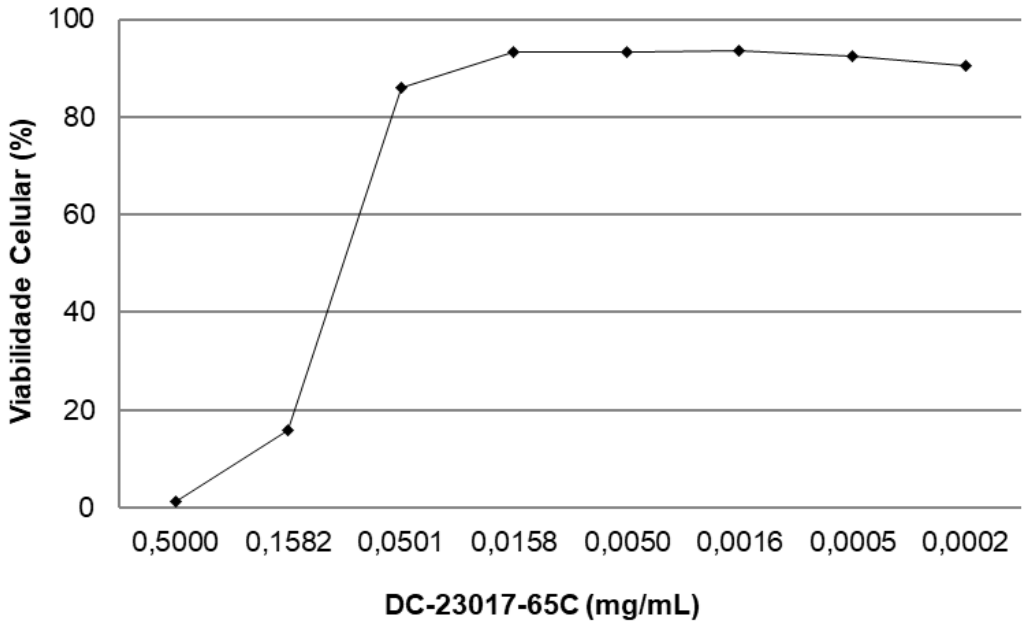
Tabela 2. ANOVA test, corrigido por Bonferroni, da semi-quantificação da sonda DCFH-DA em fragmentos ex-vivo, comparação do controle de exposição à radiação UV, o controle basal e o tratado com DC-23017-65C.

DCFH-DA (ANOVA;Bonferroni)	***Controle basal Vs UV 15 J/cm²***	***Controle basal Vs 23017-65C***	***DC-23017-65C vs UV 15 J/cm²***
Diferença Média	-22,36	-1,642	20,72
t, df	t=15,95, df=15	t=1,171, df=15	t=14,77, df=15
Valor de P	0,0001	0,7800	0,0001
Significante (P<0,05)	Sim	Não	Sim

A avaliação da viabilidade celular é essencial para determinar os efeitos de substâncias ou produtos sobre as células em cultura. Neste estudo, investigamos a viabilidade de fibroblastos humanos tratados com o produto dermatológico DC-23017-65C por meio do teste de MTT.

Conforme observado na Figura 4, o produto avaliado DC-23017-65C demonstrou concentrações não citotóxicas a partir da diluição de 0,0016 mg/mL. Esse resultado indica que o produto não afeta adversamente a viabilidade dos fibroblastos em cultura, mesmo em concentrações relativamente altas. Esses achados sugerem um perfil de segurança favorável do produto, o que é crucial para sua aplicação em produtos dermatológicos destinados ao cuidado da pele. Essa avaliação da viabilidade celular fornece informações importantes sobre a segurança e tolerabilidade do produto, destacando sua potencial utilidade como um agente dermatológico seguro e eficaz para o cuidado da pele.

Figura 4. Avaliação das concentrações não-citotóxicas do produto avaliado DC-23017-65C em fibroblastos humanos após 48 horas de incubação pelo método do MTT.



A exposição à radiação infravermelha A (IR-A) é conhecida por desencadear danos à pele, incluindo o aumento na produção de matriz metaloproteinase 1 (MMP-1), uma enzima associada ao envelhecimento cutâneo. Neste estudo, investigamos os efeitos do produto dermatológico DC-23017-65C na produção de MMP-1 em cultura de fibroblastos humanos expostos à radiação IR-A.

Para a quantificação de MMP-1, por ELISA, obtivemos o valor médio de 2,17 ng/ml para o controle basal, valor médio de 2,80 ng/ml para o grupo exposto somente à radiação IR-A e o valores médios de 1,67, 2,10 e 2,31 ng/ml para as concentrações ,0016, 0.0005 e 0,0002 mg/ml do produto DC-23017-65C.

Conforme demonstrado na Figura 4, a exposição à radiação IR-A resultou em um aumento significativo de 28,60% (P< 0,001) na produção de MMP-1 em comparação com o controle basal não irradiado. Esse aumento evidencia o papel da radiação IR-A no processo de fotodano cutâneo, especialmente por meio do aumento da atividade da MMP-1. No entanto, o produto avaliado DC-23017-65C apresentou um efeito protetor contra os efeitos da radiação IR-A nas culturas celulares. Observou-se uma redução estatisticamente significativa de 40,37% (P<0,001), 24,69% (P<0,001) e 17,44% (P<0,01) nas concentrações de 0,0016, 0.0005 e 0,0002 mg/mL, respectivamente, quando comparado ao grupo irradiado sem tratamento. Esses resultados sugerem que o produto DC-23017-65C pode mitigar os efeitos nocivos da radiação IR-A na pele, oferecendo potencial para o desenvolvimento de terapias dermatológicas que visam combater o fotoenvelhecimento cutâneo.

Figura 5. Efeitos do produto avaliado DC-23017-65C sobre a produção de MMP-1 em cultura de fibroblastos humanos submetidos à radiação infravermelha-A (IR-A). Os dados representam a média ± desvio padrão de 3 replicatas (ANOVA, Bonferroni).

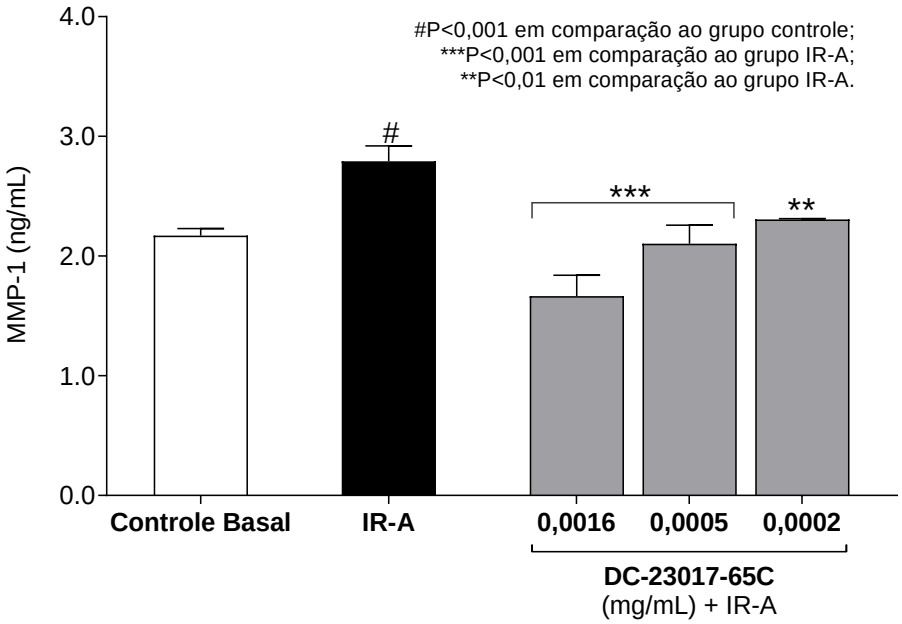


Tabela 3 ANOVA test, corrigido por Bonferroni, da quantificação de MMP-1 em fibroblastos tratados com 3 concentrações não-citotóxicas do produto DC-23017-65C, comparação do controle de exposição à radiação IR-A, o controle basal e os tratados com DC-23017-65C.

MMP-1 (ANOVA;Bonferroni)	***Controle basal Vs IR-A 360 J/cm²***	***IR-A 360 J/cm² Vs 23017-65C (0,0016 mg/ml)***	***IR-A 360 J/cm² vs 23017-65C (0,0005 mg/ml)***	***IR-A 360 J/cm² vs 23017-65C (0,0002 mg/ml)***
Diferença Média	0,6210	1,128	0,6893	0,4870
t, df	t=6,248, df=10	t=11,35, df=10	t=6,935, df=10	t=4,900, df=10
Valor de P	0,0004	0,0001	0,0002	0,0025
Significante (P<0,05)	Sim	Sim	Sim	Sim

CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação do produto DC-23017-65C revelaram múltiplos benefícios para a pele. Primeiramente, constatou-se que esse produto reduziu significativamente a translocação nuclear do receptor AhR, sugerindo um papel protetor contra os efeitos nocivos dos poluentes xenobióticos. Isso indica que o DC-23017-65C possui um efeito antipoluição, oferecendo proteção contra os danos ambientais à pele. Além disso, observou-se que o DC-23017-65C também diminuiu o estresse oxidativo na pele, agindo como um escudo contra o aumento excessivo da produção de radicais livres induzido pela exposição à radiação UV. Esse efeito protetor contribui para manter a integridade e a saúde da pele diante da exposição solar. Outro achado importante foi a capacidade do produto DC-23017-65C em prevenir o aumento da síntese de MMP-1 induzida pela radiação infravermelha-A. Essa redução na produção de MMP-1 preserva a estrutura da matriz extracelular, um fator crucial para prevenir o envelhecimento cutâneo tanto intrínseco quanto extrínseco. Portanto, o DC-23017-65C demonstrou proteção contra os efeitos prejudiciais da radiação infravermelha-A, contribuindo para suas propriedades antienvelhecimento.

REFERENCIAS

Aggarwal, M., et al. (2019). Assessing in vitro dermal absorption of dry residues of agrochemical sprays using human skin within OECD TG 428. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 106, 55–67.

Aranda, A., et al. (2013). Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. Toxicology in Vitro, 27, 954–963.

Bernstein, E. F., Brown, D. B., Urbach, F., Forbes, D., DelMonaco, M., & Wu, M. (1995). Ultraviolet radiation activates the human elastin promoter in transgenic mice: a novel in vivo and in vitro model of cutaneous photoaging. Journal of Investigative Dermatology, 105, 269-273.

Costa, A., Eberlin, S., Clerici, S. P., & Abdalla, B. M. Z. (2015). In vitro effects of infrared A radiation on the synthesis of MMP-1, catalase, superoxide dismutase and GADD45 alpha protein. Inflammation & Allergy Drug Targets.

Fabian, E., Oesch, F., Ott, K., Landsiedel, R., & van Ravenzwaay, B. (2017). A protocol to determine dermal absorption of xenobiotica through human skin in vitro. Archives of Toxicology, 91, 1497–1511.

Kim, M. S., Kim, Y. K., Cho, K. H., & Chung, J. H. (2006). Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. Mechanisms of Ageing and Development, 127, 875-882.

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.

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.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (2010). Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, Paris.

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.

Schroeder, P., Krutmann, J., Lademann, J., Darvin, M. E., Stege, H., Marks, C., & Bruhnke, S. (2008). Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection. Journal of Investigative Dermatology, 128, 2491-2497.

Wijeratne, S. S. K., Cuppett, S. L., & Schlegel, V. (2005). Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 8768–8774.

Yin, L., Morita, A., & Tsuji, T. (2000). Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. Archives of Dermatological Research, 292, 188–194.

Yoon, H. S., Kim, Y. K., Matsui, M., & Chung, J. H. (2012). Possible role of infrared or heat in sun-induced changes of dermis of human skin in vivo. Journal of Dermatological Science, 66, 71-84.