

Artigo Original

Autor:

Flávia Alvim Sant'Anna Addor¹

¹ Medcin Pesquisa (Centro de Pesquisa Clínica - Grupo Medcin) - Osasco (SP), Brasil

Correspondência para:

Flávia Alvim Sant'Anna Addor
Rua Attilio Delanina, 178
Campesina
06023-000, Osasco - SP, Brasil
E-mail: flavia@medcinonline.com.br

Data de recebimento: 31/01/2018

Data de aprovação: 02/09/2018

Trabalho realizado na MEDCIN Pesquisa, Grupo MEDCIN Ltda. - Osasco (SP), Brasil

Suporte Financeiro: O laboratório Fermoquímica Melora (FQM Melora) forneceu amostras e pagamento para a execução das culturas e utilização dos equipamentos para elaboração do estudo.

Conflito de Interesses: A autora afirma não possuir interesses pessoais, comerciais, políticos ou financeiros neste manuscrito.



Eficácia da associação de nutrientes na regulação do ciclo pilar e na queratinogênese: bases moleculares

Efficacy of a nutrient association on hair cycle regulation and keratinogenesis: molecular basis

DOI: <http://www.dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201810311147>

RESUMO

Introdução: Elementos nutricionais associados em doses fisiológicas demonstraram efeitos benéficos sobre a síntese capilar.

Objetivo: Avaliar o impacto de uma associação de nutrientes em parâmetros relacionados à integridade da unidade folicular.

Métodos: Foi realizada uma avaliação de interação do suplemento nutricional *versus* um controle *in vitro*, em cultura de folículos pilosos humanos, sob quatro marcadores distintos: quantificação das queratinas 10 e 14; avaliação por imunofluorescência da expressão proteica do colágeno 17A1 (COL17A1); determinação de β -catenina; quantificação da síntese de ATP.

Resultados: Houve melhora significativa ($p < 0,005$) de todos parâmetros estudados; a histologia demonstrou aumento significativo da presença do colágeno 17A1 sob imunofluorescência.

Conclusões: Os parâmetros avaliados neste estudo permitiram evidenciar o impacto positivo da associação de nutrientes analisada no folículo piloso e derme papilar folicular, com incremento das proliferação e metabolismo celular, além de maior presença do colágeno 17A1.

Palavras-Chave: beta Catenina; Colágeno; Folículo piloso; Queratina-10; Queratina-14

ABSTRACT

Introduction: Associated nutritional elements in physiological doses have demonstrated beneficial effects on capillary synthesis.

Objective: To evaluate the impact of the association of nutrients on parameters related to the follicular unit's integrity.

Methods: An evaluation of the interaction of a nutritional Supplement versus an *in vitro* control was carried out in culture of human hair follicles, under four diverse markers: quantification of keratins 10 and 14; immunofluorescence evaluation of 17A1 collagen (COL17A1) protein expression; determination of β -catenin; and quantification of ATP synthesis.

Results: There was a significant improvement ($p < 0.005$) of all evaluated parameters. Histologic analysis demonstrated a significant increase in the presence of the collagen 17A1 under immunofluorescence.

Conclusions: The parameters evaluated in this study have highlighted the positive impact of the association of nutrients in the hair follicle and follicular papillary dermis, with an increase of cell proliferation and metabolism, as well increased presence of collagen 17A1.

Keywords: beta Catenin; Collagen; Hair follicle; Keratin-10; Keratin-14

INTRODUÇÃO

O crescimento capilar depende de estreita interação entre diferentes populações celulares no compartimento folicular.¹

As células da papila dérmica são derivadas da derme mesenquimal e localizadas na base dos folículos capilares ou pilosos. Essas células desempenham papel crucial na morfogênese e no ciclo capilar por meio de mecanismos que envolvem a via de sinalização *Wnt*.²

A via de sinalização *Wnt* é responsável pelo desenvolvimento e regeneração do folículo piloso, sendo mediada pela β -catenina, que é sinal-chave para o núcleo celular, no qual se liga ao fator de transcrição *TCF/Lef* para ativar a transcrição dos genes que produzem a fibra capilar.³

O envelhecimento capilar é processo multifatorial em que os fatores intrínsecos se associam aos fatores extrínsecos, assim como em toda a pele: radiação solar, em particular a ultravioleta, é o mais estudado, mas outros fatores oxidativos e mutagênicos, como a dieta e a poluição, têm influência no processo. Da mesma forma, há progressivo declínio da renovação epidérmica, com alterações da barreira cutânea no couro cabeludo.⁴

O processo de envelhecimento capilar está intrinsecamente ligado ao folículo capilar, e este à derme papilar folicular.⁵

A gradual redução da população celular nessas estruturas, aliada a mecanismos de dano ao DNA e oxidativos, constitui evento fundamental no envelhecimento capilar, descrito e correlacionado fenotipicamente com o cabelo.⁶

Há evidências de que essa redução das células-tronco tem correlação com a proteólise gradual de um colágeno específico, do tipo XVIII α 1 (COL17A1).⁷

Clinicamente, esse processo se caracteriza por despigmentação e perda dos fios; histologicamente, é observada miniatização do folículo piloso.⁶

Elementos nutricionais associados em doses fisiológicas demonstraram efeitos benéficos sobre a síntese capilar; nutrientes relacionados à queratinogênese associados a antioxidantes demonstraram efeitos positivos na proliferação e diferenciação queratinocítica;⁸ o efeito clínico dessa mesma associação foi demonstrado em outro estudo, segundo o qual pacientes com eflúvio telógeno em uso da suplementação nutricional apresentaram melhora significativa da relação anágena/telógena após uso diário, em monoterapia, durante 12 semanas.⁹

Possivelmente, alguns dos suplementos nutricionais podem também levar a melhor função metabólica dos queratinócitos envolvidos no folículo piloso, justificando a melhora da queda e estrutura capilar, e tendo efeito relevante em variadas etiologias de alopecia, como o eflúvio telógeno ou alopecia senescente (*aging hair*); o objetivo deste estudo é avaliar o impacto de uma nova associação de nutrientes em parâmetros relacionados à integridade da unidade folicular.

MATERIAL E MÉTODOS

O produto de investigação foi uma associação de micronutrientes e aminoácidos (Exímia Fortalize Kera D[®], FQM Melora, Rio de Janeiro, Brasil) composto das vitaminas A, C, D e E, vitaminas do complexo B: ácidos fólico e pantotênico,

biotina, niacina, piridoxina e tiamina; e os oligoelementos ferro, magnésio e zinco, todos em concentrações fisiológicas (100% IDR), além de um *pool* de aminoácidos essenciais: ácido aspártico, glutâmico, serina, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, cistina, isoleucina, triptofano, leucina, fenilalanina, lisina e hidroxiprolina.

O produto foi previamente preparado para a avaliação nos meios em concentrações não citotóxicas, determinadas previamente pela avaliação de citotoxicidade *in vitro*.

A interação do suplemento nutricional foi avaliada sob quatro marcadores distintos:

- quantificação das queratinas 10 e 14;
- avaliação por imunofluorescência da expressão proteica do colágeno 17A1 (COL17A1);
- determinação de β -catenina: essa molécula é uma subunidade do complexo proteico de caderina, e é sinalizadora na via de sinalização *Wnt*, associada à proliferação celular;
- quantificação da síntese de ATP: estímulo do metabolismo celular.

Para avaliação da qualidade da queratinogênese epidérmica e folicular, fragmentos de escalpo obtidos de cirurgia plástica eletiva foram tratados com três concentrações do produto e avaliados durante 72 horas, para posterior quantificação imunoenzimática das queratinas 10 e 14. Os fragmentos de escalpo também foram submetidos a cinco doses consecutivas da radiação UVA/B e tratados com três concentrações do produto, durante cinco dias, para avaliação de COL17A1 por imunofluorescência, com uso de microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX53, Japão) e *software* cellSens Standard (©2010 OLYMPUS CORPORATION).

Após a obtenção das imagens de imunofluorescência, sua intensidade foi quantificada com auxílio do *software* ImageJ (Unidades Arbitrárias – UA).

Para avaliação do metabolismo celular e qualidade do crescimento capilar, células da papila dérmica folicular humana foram incubadas com três concentrações do produto (0,316, 0,100 e 0,0316mg/ml) durante 72 horas, para quantificação posterior de β -catenina e ATP.

Culturas celulares com iguais concentrações foram irradiadas com espectro ultravioleta B/A (UV meter, Honle UV America Inc. MA, USA).

As concentrações de ATP, β -catenina e queratinas 10 e 14 foram medidas por Elisa (enzyme-linked immunosorbent assay – USCN-USA).

A avaliação estatística dos dados quantitativos obtidos foi realizada no *software* GraphPad Prism v6 pelo teste Anova, que permitiu mensurar o nível de variação dos resultados, comparando os dados entre os grupos. Para confirmação dos resultados obtidos, utilizou-se o pós-teste Bonferroni, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Quantificação de queratinas 10 e 14 nas culturas de escalpo *ex vivo*

A concentração de 0,316mg/ml promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) na produção das queratinas 10 e 14, em 60,1% e 27,8%, respectivamente, em relação ao grupo basal, conforme demonstram os gráficos 1 e 2.

Os resultados referentes à quantificação de β -catenina revelaram que a concentração de 0,316mg/ml também foi capaz de estimular a produção desse mediador em 41,3%, em comparação com o grupo basal, conforme demonstrado no gráfico 3.

Adicionalmente, as concentrações de 0,100 e 0,0316mg/ml promoveram aumentos significativos ($p < 0,001$) na síntese de ATP em culturas de HHDPs (*human hair dermal papilla cells*). Observa-se aumento de 53,2% na concentração de 0,100mg/ml

e 50,6% na concentração de 0,0316mg/ml, conforme gráfico 4.

Com relação ao efeito da radiação sobre a COL17A1, a imunofluorescência demonstrou que a exposição cumulativa à radiação UVA/B reduz significativamente a síntese proteica de Col17A1 em 42,3% ($p < 0,001$) em área não tratada (proteína Col17A1 está imunomarcada em verde, e a marcação em azul representa o núcleo celular exposto-DNA) enquanto o tratamento com o produto avaliado foi capaz de preservar a síntese de Col17A1 nos fragmentos de escalpo submetidos à radiação UVA/B em 70,5%, 48,9% e 43,6%, nas concentrações de 0,316; 0,100 e 0,0316mg/ml, respectivamente, conforme evidenciado na figura 1.

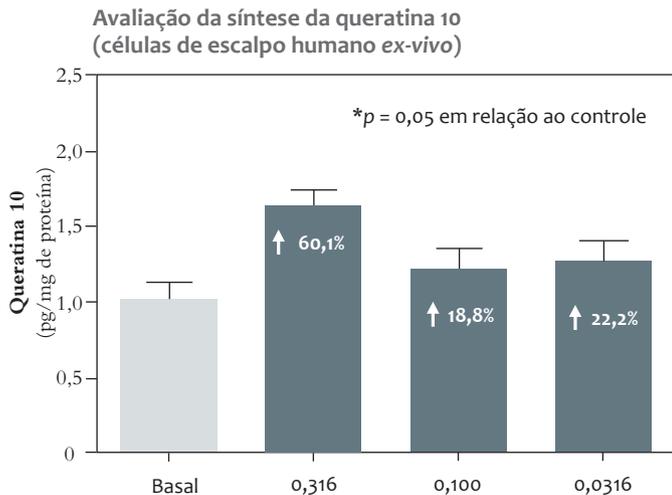


GRÁFICO 1: Barra clara: média da área controle; barras escuras: média da síntese de queratina 10 com tratamento com concentrações de 0,316 0,1 e 0,0316 mg/ml respectivamente. ($p < 0,005^*$)

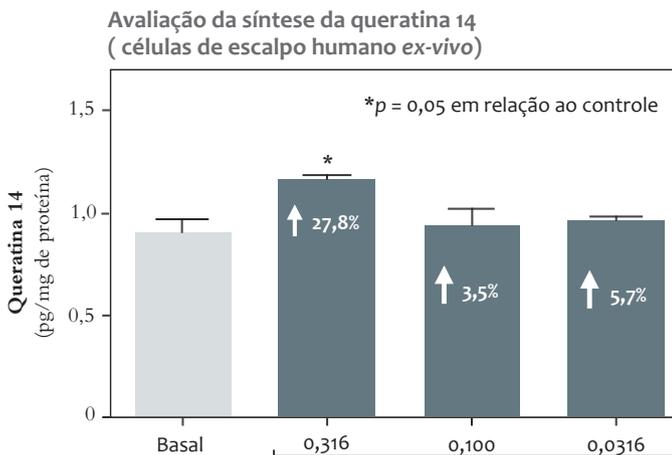


GRÁFICO 2: Barra clara: média da área controle; barras escuras: média da síntese de queratina 14 com tratamento com concentrações de 0,316 0,1 e 0,0316 mg/ml respectivamente. ($p < 0,005^*$)

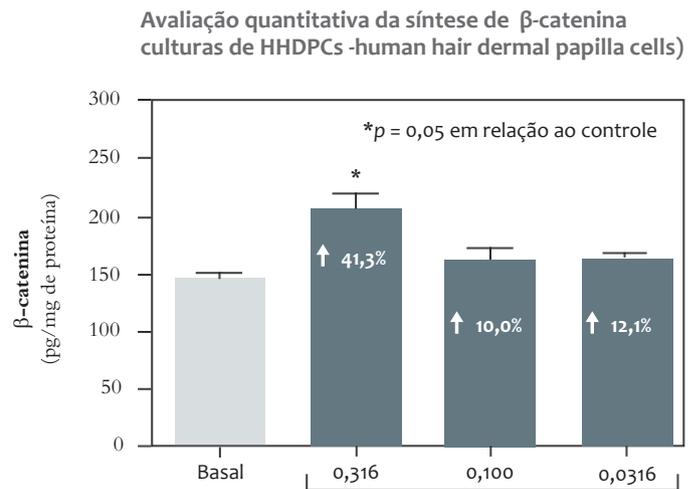


GRÁFICO 3: Legenda: barra branca: média da área controle; barras rosa: média percentual da síntese de β -catenina com tratamento com concentrações de 0,316 0,1 e 0,0316 mg/ml respectivamente. ($p < 0,005^*$)

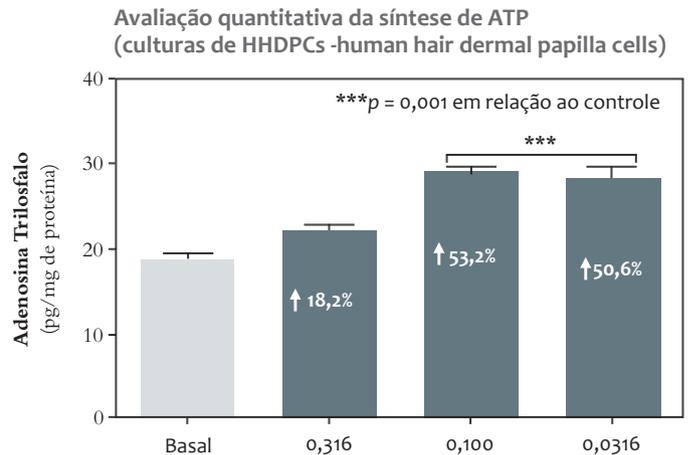


GRÁFICO 4: Legenda: barra branca: média da área controle; barras rosa: média percentual da síntese de ATP com tratamento com concentrações de 0,316 0,1 e 0,0316 mg/ml respectivamente. ($p < 0,001^{***}$)

O gráfico 5, com o resultado da quantificação da coloração obtida por imunofluorescência, demonstra o efeito significativo das três concentrações avaliadas sobre a síntese da COL17A1.

DISCUSSÃO

Os parâmetros avaliados neste estudo permitiram evidenciar o impacto da associação dos nutrientes presentes na formulação em análise, nos mecanismos de queratinogênese da epiderme perifolicular, refletindo maior integridade do componente epidérmico (folículo piloso propriamente dito) e dérmico (papila folicular).

A expressão das queratinas 10 e 14 aumentou significativamente na presença da associação, demonstrando aumento da síntese da queratina capilar. A expressão dessas queratinas aumenta fisiologicamente na fase anágena, sendo elas marcadores

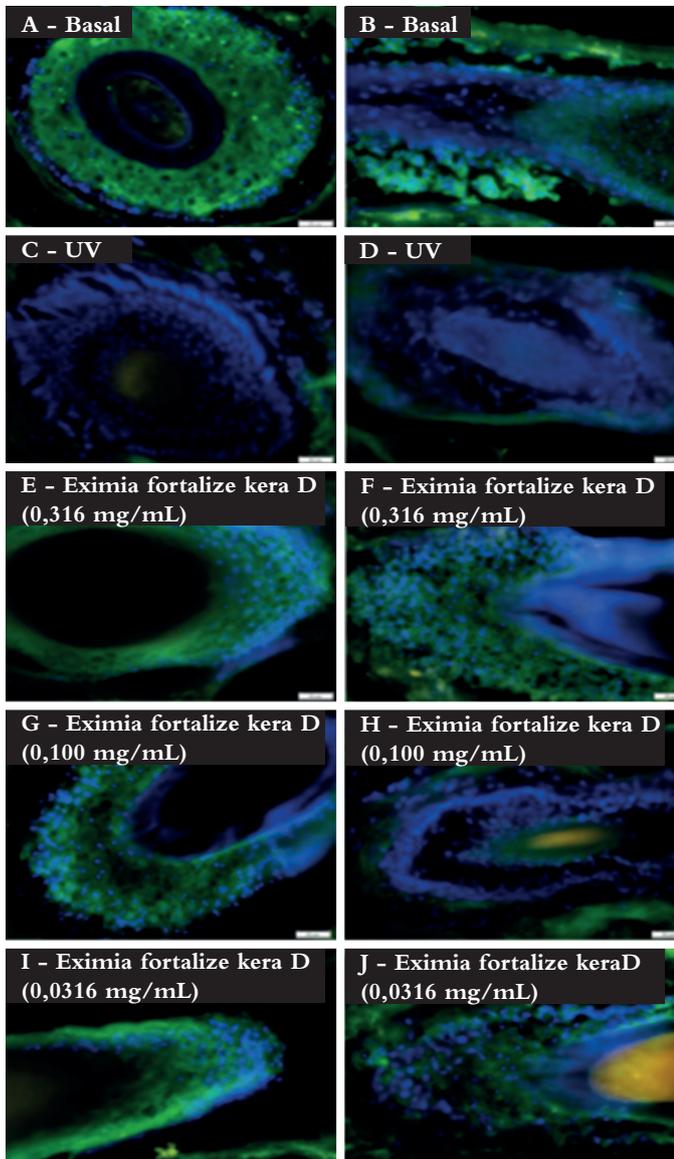


FIGURA 1: Avaliação histológica por imunofluorescência da síntese proteica de Col17A1 (fragmentos de escalpo humano ex-vivo)

Gráfico 05: Avaliação semi-quantitativa da COL17A1 imunomarcada (culturas de HHDPCs -human hair dermal papilla cells) em unidades arbitrárias

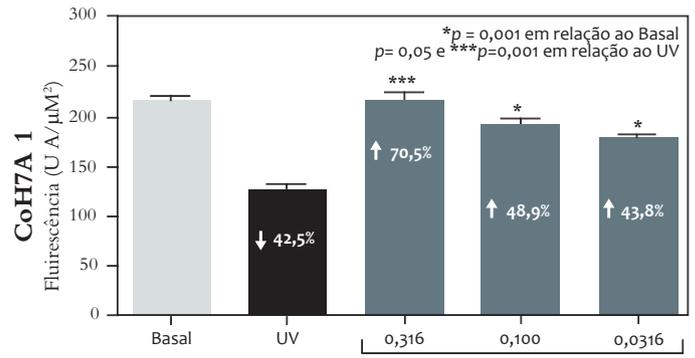


GRÁFICO 5: Barra clara: média da área controle; barra preta: área não tratada e irradiada com redução da COL17A1 (p < 0,01 em relação ao basal #) barras médias: média percentual da presença de COL17A1 sob tratamento com concentrações de 0,316 (p<0,001***), 0,1 (p<0,05*) e 0,0316 mg/ml (p<0,05*) respectivamente

proliferativos da camada basal da epiderme interfolicular.¹⁰

Um estudo em modelo animal demonstrou que em situações de hiperglicemia, há redução da expressão da queratina 14 e indução ectópica da queratina 10, o que demonstra uma alteração da proliferação e diferenciação queratinocítica nesses pacientes. Esses achados justificam as alterações de barreira cutânea encontradas nesses pacientes.¹¹

A associação de aminoácidos sulfurados colabora para essa síntese da queratina capilar, especificamente metionina e cisteína.¹²

A taxa de proliferação celular também foi medida por outro marcador, a beta-catenina, proteína mediadora da via Wnt (*wingless type MMTV integration site Family*). Essa via de sinalização é fundamental nos eventos de proliferação celular, estando envolvida na interação das células epiteliais-mesenquimais do folículo piloso, implicando sua redução a redução de diferenciação queratinocítica.¹³

A via Wnt/beta-catenina também está implicada na modulação da migração celular em processos de cicatrização epitelial, desenvolvimento e regeneração do folículo capilar.¹⁴

Com relação aos colágeno tipo XVIIIα1 (COL17A1), Matsumura e colaboradores descreveram o passo a passo da dinâmica de envelhecimento dos folículos capilares, esclarecendo mecanismos de dano ao DNA e envelhecimento das células-tronco associados ao fenótipo do cabelo envelhecido, levando à miniaturização do folículo piloso, bem como das populações celulares circundantes; o marcador foi a proteólise do colágeno 17 A1, relacionada com a renovação das células-tronco.⁷

Neste estudo, avaliou-se o impacto da radiação ultravioleta no COL17A1 demonstrando que o fotodano é capaz também de induzir sua proteólise, o que seria um mecanismo de aceleração do envelhecimento, além do dano oxidativo.

A associação de nutrientes aqui estudada foi capaz de prevenir a degradação excessiva de COL17A1 no folículo capilar

exposto à radiação UVA/B, prevenindo, portanto, o processo de envelhecimento capilar UV induzido; este é o primeiro estudo a demonstrar esse efeito protetor da COL17A1, acenando com uma possibilidade de prevenir o envelhecimento capilar por fatores extrínsecos.

A redução da síntese do fio também está associada ao declínio da função celular observada no envelhecimento; concomitantemente, o estresse oxidativo inerente aos processos metabólicos celulares sofre incremento pelos fatores extrínsecos já citados, a exemplo do dano oxidativo cutâneo, gerando microinflamação no folículo e área perifolicular.

O aumento de ATP observado demonstra que a associação estudada foi capaz de estimular o metabolismo celular na células da papila dérmica, aumentando sua síntese.

Nesse contexto, é importante frisar que a papila dérmica tem papel importante na interação dermoepidérmica que controla a síntese capilar e os eventos do ciclo pilar, alterados não somente na senescência capilar, mas também na alopecia androgenética.¹⁵

A associação de nutrientes contida no produto Eximia Fortalize Kera D demonstrou atuar positivamente em alguns dos principais parâmetros moleculares envolvidos na queratinogênese e no ciclo capilar, podendo, portanto, atuar positivamente na senescência capilar e miniaturização dos fios.

REFERÊNCIAS

- Solanas G, Benitah SA. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(11):737-48.
- Soma T, Fujiwara S, Shirakata Y, Hashimoto, K, Kishimoto J. Hair inducing ability of human dermal papilla cells cultures under β -catenin signaling activation. *Exp Dermatol.* 2012;21(4):299-319.
- Chen W, Thiboutot D, Zoubolis CC. Cutaneous androgen metabolism: Basic research perspectives. *J Invest Dermatol.* 2002;119(5):992-1007.
- Florence P, Cornillion C, D'Arras MF, Flament F, Panhard S, Diridollou S, et al. Functional and structural age related changes in the scalp skin of Caucasian women. *Skin Res Technol.* 2013;19(4):384-93.
- Tobin DJ, Paus R. Graying: gerontobiology of the hair follicle pigimentary unit. *Exp Gerontol.* 2001;36(1):29-54.
- Trüeb RM. Effect of ultraviolet radiation, smoking and nutrition on hair. *Curr Probl Dermatol.* 2015;47:107-20.
- Matsumura H, Mohri Y, Binh NT, Morinaga H, Fukuda M, Ito M, et al. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. *Science.* 2016;351(6273):aad4395.
- Addor FAS. Nutrient supplementation influence on keratinocytes' metabolism: an in vitro study. *Surg Cosmet Dermatol.* 2012;4(2):154-4.
- Addor FAS, Bombarda PCP, Bombarda Júnior MS, Abreu FF. Influence of nutritional supplementation in the treatment of telogen effluvium: clinical assessment and digital phototrichogram in 60 patients. *Surg Cosmet Dermatol.* 2014;6(2):131-6.
- Paladini RD, Saleh J, Qian C, Xu GX, Rubin LL. Modulation of hair growth with small molecule agonists of the Hedgehog Signaling Pathway. *J Invest Dermatol.* 2005;125(4):638-46.
- Okano J, Kojima H, Katagi M, Nakagawa T, Nakae Y, Terashima T, et al. Hyperglycemia Induces Skin Barrier Dysfunctions with Impairment of Epidermal Integrity in Non-Wounded Skin of Type 1 Diabetic Mice. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166215.
- Goluch-Koniuszy ZS. Nutrition of women with hair loss problem during the period of menopause. *Prz Menopauzalny.* 2016; 15(1):56-61.
- Zhu K, Xu C, Liu M, Zhang J. Hairless controls hair fate decision via Wnt/ β -catenin signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;491(3):567-70.
- Yang HL, Tsai YC, Korivi M, Chang CT, Hseu YC. Lucidone Promotes the Cutaneous Wound Healing Process via Activation of the PI(3)K/AKT, Wnt/ β -catenin and NF- κ B Signaling Pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1864(1):151-68.
- Trueb RM, Ralph M. Age related general problems affecting conditions of hair. In: Trueb RM, Tobin J, editores. *Aging Hair.* Berlin: Springer; 2010. p.141-150.

CONCLUSÃO

Os parâmetros avaliados neste estudo permitiram evidenciar o impacto positivo da associação de nutrientes estudada no folículo piloso e derme papilar folicular, que são caracterizadas clinicamente por:

- melhora da estrutura do fio (maior resistência e brilho) e integridade epidérmica preservando a função barreira do couro cabeludo (menor predisposição a irritações e proliferação de micro-organismos), pelas maior expressão das queratinas 10 e 14;
- regulação do ciclo capilar (prevenindo a telogenização) pela expressão de β -catenina;
- preservação do suporte e interação dermoepidérmica no folículo piloso pela preservação do colágeno 17A 1 sob estresse UV
- proteção a estímulo ao metabolismo celular, pela maior produção de ATP. ●

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:

Flávia Alvim Sant'Anna Addor |  ORCID 0000-0003-1851-7342
Concepção, planejamento do estudo, elaboração e redação do manuscrito.