

Eficácia *in vitro* e clínica do uso cosmético tópico de fitoestrógenos em pele fotoenvelhecida

In vitro and clinical efficacy of the use of phytoestrogens-based topical cosmetic use in photoaged skin

RESUMO

Introdução: O tratamento do envelhecimento cutâneo representa um desafio clínico.

Objetivos: Avaliar a eficácia *in vitro* e *in vivo*, e a segurança clínica de cosmético com fitoestrógenos na abordagem do fotoenvelhecimento.

Métodos: A etapa *in vitro* foi realizada pela análise da expressão gênica de fibronectina e pró-colágeno, avaliação da atividade imunomoduladora e análise histoquímica e por imunofluorescência da pele e da junção dermoepidérmica com o produto analisado. No estudo clínico *in vivo* foi 76 mulheres, foram randomizadas em dois grupos: o Grupo A usou creme contendo complexo de fitoestrógenos e FPS 20 duas vezes ao dia, enquanto o Grupo B usou este mesmo creme associado a outro com função de anti-envelhecimento aplicado à noite. O estudo durou 120 dias tendo sido realizadas mensalmente avaliações médicas, da voluntária, ultrassonografia (20MHz), fotografias e biópsias pré e pós-tratamento.

Resultados: No estudo *in vitro* houve aumento na expressão de fibronectina e procógeno, potencial imunomodulador, representado pelo aumento de IL-1 α diminuição de IL-10; melhora da integridade da JDE, aumento da viabilidade e espessura da epiderme, e da síntese de colágeno. *in vivo*: melhora global subjetiva da aparênciada pele da face; redução de manchas, eritema, poros e porfirina cutânea. O ultrassom e a biópsia revelaram aumento da densidade dérmica (52,7%) e de fibras dérmicas (22,25%), respectivamente.

Conclusões: Fitoestrógenos tópicos melhoram a condição geral da pele, avaliada clinicamente, histologicamente e por ultrassonografia; acrescentam-se resultados *in vitro* de aumento da síntese de fibronectina, prócolágeno e colágeno, melhora da integridade da junção dermoepidérmica e restauração da resposta imunológica da pele.

Palavras-chave: colágeno, fotoenvelhecimento, envelhecimento da pele.

ABSTRACT

Introdução: Introduction: Skin aging is a challenge to treat.

Objectives: To evaluate the *in vitro* and *in vivo* efficacy and clinical safety of a phytoestrogens-based cosmetic in the management of photoaging.

Methods: The *in vitro* investigation was performed using the analysis of the genic expression of fibronectin and procollagen, evaluation of the immunomodulatory activity (proinflammatory and anti-inflammatory cytokines synthesis) and histochemistry and immunofluorescence analyses of the skin and the dermoepidermal junction. The *in vivo* investigation – performed in 76 women randomized into Group A (phytoestrogens complex cream and SPF 20 twice daily) or Group B (the same product plus a commercially available anti-aging cream applied overnight). The study lasted for 120 days, with physician- and patient-led evaluations, in addition to monthly ultrasound (20 MHz) and photographic analysis. Skin biopsies of the face were performed before and after treatment.

Results: The study showed *In vitro*: increase in the expression of fibronectin, in procollagen, immunomodulator potential, represented by an increase in IL-1 α and a decrease in IL-10; improvement in the integrity of the dermoepidermal junction; increase in the viability and thickness of the epidermis; increase in collagen synthesis. *In vivo*: subjective global improvement of the skin's appearance; reduction in the count and intensity of spots, erythema, skin pores, and cutaneous porphyrin. The ultrasound and biopsy revealed increased dermal density (52.7%) and dermal fibers (22.3%), respectively.

Conclusions: The topical use of phytoestrogens-based cosmetics improves the overall condition of the skin.

Keywords: collagen, photoaging, skin aging.

Artigo Original

Autores:

Adilson Costa¹
Gustavo Dieamant²
Elisangela Samartin Pegas Pereira³
Raquel Fávoro⁴
Elvira Cancio Assumpção⁵
Fernanda Sayuri Ota⁶
Stephanie Selma Barros Langen¹
Maria Carolina Fidelis⁴
Samara Eberlin²
Liliana Bechelli de Oliveira Torloni⁵

- 1 Dermatologista; mestre em dermatologia pela Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (EPM/Unifesp) – São Paulo (SP); doutor em dermatologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – São Paulo (SP); chefe do Serviço de Dermatologia e coordenador dos ambulatórios de Acne, Cosmiatria, Dermatologia na Gravidez, Vitiligo e Pesquisa Clínica Dermatológica da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas) – Campinas (SP), Brasil.
- 2 Farmacêutico e bioquímico; mestre em farmacologia e doutor em imunotoxicologia e neuroimunoenocrinologia cutânea pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – Campinas (SP); gerente de Tecnologia, Pesquisa e Desenvolvimento da Chemunion Química Ltda. – Sorocaba (SP), Brasil.
- 3 Dermatologista; coordenadora dos ambulatórios de Fototerapia, Urticária e Hanseníase do Serviço de Dermatologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas) – Campinas (SP), Brasil.
- 4 Especializanda em dermatologia do Serviço de Dermatologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas) – Campinas (SP), Brasil.
- 5 Farmacêutica e bioquímica; mestre em fisiopatologia médica e doutora em farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – Campinas (SP); pesquisadora associada do Laboratório de CFU/Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – Campinas (SP), Brasil.
- 6 Dermatologista; gerente médico da Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda. – São Paulo (SP), Brasil.

Correspondência para:

Dr. Adilson Costa
Rua Original, 219 – Vila Madalena
05435-050 - São Paulo -SP,
E-mail: adilson_costa@hotmail.com

Recebido em: 10/04/2012
Aprovado em: 15/05/2012

Trabalho realizado no Chemyunion Química Ltda. – Sorocaba (SP) e na KOLderma Instituto de Pesquisa Clínica Ltda. – Campinas (SP), Brasil.

Suporte financeiro: Todos os gastos referentes ao estudo foram assumidos pela Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda. – São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Todos os gastos referentes ao estudo foram assumidos pela Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda. – São Paulo (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

O envelhecimento cutâneo é um processo degenerativo, insidioso, complexo e multifatorial (com relevância em relação à irradiação UV) que inevitavelmente atinge todos os seres humanos.¹ A grande exposição da pele às agressões externas, associada a fatores genéticos, endócrino-metabólicos, imunológicos e outros elementos intrínsecos, faz com que a suscetibilidade do tecido cutâneo aos eventos relacionados ao envelhecimento seja mais característica e visualmente mais proeminente.²

O envelhecimento cutâneo ocorre devido a dois processos concomitantes: envelhecimento intrínseco ou cronológico, quando acomete áreas protegidas do sol, e fotoenvelhecimento ou extrínseco, quando acomete áreas expostas ao sol.^{3,4}

O envelhecimento cutâneo intrínseco é determinado por fatores genéticos e agravado por fatores neuro-hormonais, portanto independente dos fatores externos ou ambientais.^{1,4,5} Ele reflete o mesmo mecanismo degenerativo visto em outros órgãos, no entanto, a pele é um dos parâmetros mais influenciados pela idade.^{1,5} As mudanças hormonais ocorridas durante o envelhecimento irão ocorrer diretamente relacionadas com o fenótipo da pele (fototipo).⁵ Em áreas protegidas do sol, como ocorre no envelhecimento intrínseco, a pele fica mais fina, há o aparecimento de rugas delicadas, aspereza, perda de elasticidade e gordura subcutânea, contudo é um envelhecimento mais suave que o do fotoenvelhecimento.¹ Quando o envelhecimento é intrínseco, observamos redução no número e função dos fibroblastos e destruição de importantes estruturas – especialmente colágeno, elastina e fibronectina –, e ocorre também alteração na homeostase celular proliferativa, resultando em lesões muitas vezes malignas ou irreversíveis.^{6,7}

As fibras colagênicas conferem à derme sua integridade estrutural e mecânica e a elastina desempenha importante propriedade elástica da pele.⁸ A fibronectina é capaz de contrair e organizar o tecido conectivo, promover adesão celular em eventual processo de cicatrização, reepitelização e é ainda a principal responsável pela integridade da junção dermoepidérmica.⁹⁻¹¹ Com o envelhecimento, há significativa redução na quantidade e na qualidade da fibronectina, observada na JDE, o que se configura em um dos principais marcadores dermoepidérmicos de envelhecimento.^{10,12} Já foi demonstrado (Rocquet et al. 2002) que a quantidade de fibronectina encontra-se diminuída nas rugas e que sua degradação enzimática é aumentada significativamente com a idade.¹¹

A habilidade de nosso sistema imunológico reduz-se drasticamente com o avançar da idade, o que é considerado uma das maiores causas do aspecto de envelhecimento cutâneo e de suscetibilidade às infecções e ao câncer.¹³ O motivo dessa redução ainda é obscuro, mas sabe-se da importância da diminuição do número de células de Langerhans da pele, defeito das células T de memória, diminuição da resposta proliferativa de linfócitos e redução da capacidade do organismo de produzir anticorpos.^{13,14} No envelhecimento há alteração do padrão do sistema imunológico da pele, que de resposta T h1, se altera para o padrão dominante Th2. A resposta Th1 (T helper 1), com IL1 (interleucina 1), IL8, TNF (fator de necrose tumoral alfa) e INF (Interferon gama), moléculas de adesão, quimiocinas, eicosanói-

des e óxido nítrico, dá início às manifestações fisiológicas que culminam em degradação tecidual, já que esse padrão é de produção de citocinas pró-inflamatórias. O padrão imunológico Th2 é acompanhado pelo aumento de IL4, IL5 e IL10, esta última com a função de conter a resposta inflamatória, favorecendo muito a aceleração do envelhecimento intrínseco.^{13,14}

O envelhecimento extrínseco, ou fotoenvelhecimento, é caracterizado pela soma da contínua exposição às variações ambientais, como radiação solar, térmica, energia mecânica, alterações de umidade e/ou insultos químicos ou biológicos.² Esse envelhecimento é decorrente da irradiação UV que danifica principalmente as estruturas morfológicas dérmicas da pele, afetando sua consistência, resiliência e propiciando o fotoenvelhecimento precoce.^{4,15} É processo cumulativo que ocorre com base no grau de exposição ao sol e no fototipo do paciente.⁵

As irradiações UV e infravermelha (IV) causam alterações nos componentes celulares e ativam as metaloproteinases da matriz (MMPs), que alteram a matriz extracelular (MEC) do colágeno, degradando, assim, sua integridade e consequentemente causando alterações principalmente na derme.^{15,16} A irradiação UV ataca também estruturas epidérmicas, queratinócitos e fibroblastos, resultando na ativação de receptores de superfície que transmitem sinal capaz de causar mudanças moleculares, que levam à destruição de colágeno extracelular e parada da síntese de novo colágeno, como também acúmulo de elastina desorganizada e seu componente, a fibrina, na derme profunda, assim como importante perda de colágeno intersticial.¹⁷

Essa irradiação também leva à formação de agentes patogênicos que produzem radicais livres (reactive oxygen species – ROS), os quais têm papel crucial de degradação e dano dos sistemas antioxidantes não enzimático e enzimático de defesa da pele.^{3,4,17} Eles danificam estruturas nobres da pele, tais como membranas celulares, segmentos de DNA e fibras colágenas e elásticas, que causam envelhecimento cutâneo.^{1,3,6,17} Consequentemente a pele exposta à irradiação UV tem aparência mais grosseira, seca, com rugas profundas e bem demarcadas e com pigmentação mosqueada.¹⁵

A irradiação infravermelha, assim como a UV, está envolvida no fotoenvelhecimento e no fotodano (carcinogênese).¹⁶

Diante dessas circunstâncias o intuito desta pesquisa foi conhecer a possível contribuição desse produto cosmecêutico à base de fitoestrógenos na atenuação e prevenção das manifestações estéticas decorrentes do envelhecimento, observado juntamente com as suas alterações histológicas dermoepidérmicas.

MÉTODOS

O presente estudo foi realizado nas formas *in vitro* e *in vivo*, todas devidamente aprovadas por comitês universitários de ética em pesquisa.

A etapa *in vitro* foi realizada em três modalidades de análise. Os estudos foram compostos pela utilização de células humanas em ótimas condições de cultivo, realizada de acordo com as metodologias atuais aplicadas, aceitas e validadas pela comunidade científica internacional.

A primeira das modalidades *in vitro* foi realizada a fim de se observar como o produto à base de fitoestrógeno se mostrou em relação à expressão gênica de fibronectina e pró-colágeno tipo I. Realizaram-se culturas de queratinócitos (Cascade Biologics, Inc. – Portland/OR, EUA) e fibroblastos humanos (Lonza Walkersville, Walkersville, EUA) em meios de cultura específicos; ambos foram semeados em garrafas de 75cm², cultivados e expandidos em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂. A incubação para queratinócitos e fibronectina foi de seis horas e, de 12 horas, para fibroblastos e pró-colágenos. A viabilidade celular foi determinada pela técnica de MMT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Para avaliar a expressão gênica de fibronectina e pró-colágeno foram utilizados PCR (polymerase chain reaction) de tempo real, e o resultado foi calculado a partir da quantidade de mRNA.

A segunda modalidade foi avaliação da atividade imunomoduladora (síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias) do ativo cosmético. A análise foi feita a partir do isolamento do fitoestrógeno, que é um extrato estabilizado de três algas marinhas vermelhas e marrons, e assim foram analisados seus efeitos na produção da citocina pró-inflamatória (Th1) IL-1 e anti-inflamatória (Th2) IL-10 em cultura de queratinócitos humanos. Esses queratinócitos foram semeados, cultivados e expandidos em estufa úmida a 37°C. As culturas foram incubadas com seis concentrações não citotóxicas do produto, determinadas previamente pela técnica de MMT. As células foram mantidas em contato com o produto teste e lipopolissacarídeo (LPS; serve para estimular cronicamente as células, a fim de simular o envelhecimento cronológico ou microinflamatório, para assim avaliar a possível atividade imunomoduladora *in vitro* do produto teste) durante três dias consecutivos, para posterior coleta do sobrenadante. As citocinas foram quantificadas utilizando kits de ensaio imunoenzimáticos (Elisa) e o anticorpo monoclonal anticitocina de captura foi adicionado na placa.

A terceira modalidade consistiu da análise histoquímica e por imunofluorescência da pele e da JDE (junção dermoepidérmica) com o produto em questão. Foi feita avaliação das características gerais da pele, como condição do estrato córneo, da epiderme viável, do número de microvilosidades, bem como a marcação de fibronectina. A análise foi feita por imunofluorescência a partir da incubação com o produto em fragmentos de pele *ex-vivo* incubados com o anticorpo primário antifibronectina e posteriormente Alexa Flour. A análise histoquímica foi feita com coloração de hematoxilina-eosina (HE), e também foram analisados cortes para histoquímica corados pela técnica de Sirius Red, para visualização de fibras colagênicas.

A etapa *in vivo* foi realizada de forma clínica, aberta, monocêntrica, fase IV, de modo prospectivo, comparativo, envolvendo 76 voluntárias randomizadas e divididas em dois grupos de 38, com idade entre 45 e 70 anos e fototipo de I a III. O estudo teve duração de 120 dias. As voluntárias foram incluídas no estudo após terem lido, concordado e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que foi então conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki, Boas Práticas Clínicas e as diretrizes da International Conference of Harmonization (ICH).

As voluntárias foram submetidas a wash-out com uso exclusivo de fotoprotetor FPS 15 (Episol® FPS 15, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil) durante 30 dias, utilizado duas vezes ao dia (manhã e hora do almoço). Após o uso exclusivo do fotoprotetor, iniciou-se a dispensa dos produtos de acordo com cada Grupo: A) utilizou o produto antienvelhecimento à base de fitoestrógenos e FPS 20 (Age Care FPS 20 e PPD 10, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil) pela manhã e na hora do almoço; B) utilizou os mesmos produtos do Grupo A, nos mesmos regimes posológicos, associados a outro produto cosmético antienvelhecimento de mercado (Epidrat Lift, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil), utilizado à noite. As voluntárias fizeram uso dos produtos que lhes foram indicados durante 90 dias consecutivos.

Para triagem, foi analisado se as voluntárias possuíam todos os critérios de inclusão (idade entre 45 e 70 anos; menopausadas; pele fototipo I a III, segundo a classificação de Fitzpatrick; estar livre de doenças que, a critério do investigador, pudessem interferir na avaliação do envelhecimento cutâneo; capacitadas e habilitadas a seguir e aderir ao esquema de visitas e ao tratamento instituído; não possuir histórico sabido de reação alérgica aos componentes do produto investigacional; estar em uso exclusivo de fotoprotetor facial FPS 15 até, no mínimo, 30 dias anteriores ao início do estudo) e nenhum critério de exclusão (não estar em uso de medicamentos/cosméticos/tratamentos que, segundo o investigador, pudessem interferir na avaliação da resposta do estudo; qualquer outra razão que, a critério do investigador, oferecesse risco ao voluntário ou interferisse nos objetivos do estudo; exposição ao sol de forma intensa até 60 dias antes da triagem; presença de lesões cutâneas na área a ser avaliada; abuso de drogas ilícitas; tabagismo; portadores de endocrinopatias, principalmente gonadais e/ou suprarrenais e/ou tireoide).

A cada 30 dias de estudo, eram avaliados os critérios de exclusão, bem como era verificada a adesão da voluntária (deixar de utilizar qualquer um dos produtos por cinco dias seguidos ou dez dias intercalados, durante todo o estudo), além de submetê-las à realização de ultrassom cutâneo de 20MHz (SkinScanner USB-DUB6100, TPM-Taberna Pro Medicum GmbH, Lüneburg, Alemanha), avaliados eventos adversos e realizada análise fotográfica (Canon™ Power Shot G10, Japan). Além disso, eram avaliadas a tolerabilidade subjetiva quanto ao produto e análise subjetiva da resposta terapêutica tanto por parte do investigador quanto das voluntárias.

A avaliação subjetiva da eficácia foi feita utilizando uma escala para classificar a resposta, que poderia ser: +4: melhora completa; +3: melhora acentuada; +2: melhora moderada; +1: melhora discreta; zero: manutenção; -1: piora discreta; -2: piora moderada; -3: piora acentuada; -4: piora completa. Para avaliação subjetiva da tolerabilidade foram utilizados os critérios: excelente, para ausência total de eventos adversos; boa, para eventos facilmente tolerados; regular, para eventos que podem ser tolerados e que não levam à descontinuação do tratamento; ruim, para eventos cujos efeitos obrigam à interrupção do tratamento.

A ultrassonografia foi utilizada para avaliar a densidade dérmica.

mica, e sua análise foi subjetiva e comparativa com a imagem da ultrassonografia anterior, cujo padrão de resposta foi: aumentou muito; aumentou; inalterado; diminuiu e diminuiu muito. Além disso, realizou-se biópsia cutânea com *punch* n. 2 na face (na região pré-auricular) a fim de avaliar o padrão das fibras colágenas (tricroômio de Masson) e elásticas (Verhoeff).

A fim de avaliar os resultados obtidos através da aplicação de questionários para o médico e voluntário, bem como avaliar os resultados de ultrassom e biópsia cutânea, foi realizado o teste estatístico de igualdade de duas proporções. Esse teste compara se a proporção de respostas de duas determinadas variáveis e/ou seus níveis é estatisticamente significativa. Em todo o estudo, os resultados considerados estatisticamente significativos foram aqueles com valores de “p” inferiores a 0,05.

Na etapa *in vitro* da atividade imunomoduladora, a técnica estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado quando a análise de variância detectava diferenças significativas entre os grupos. Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles com valores de “p” inferiores a 0,05. Para as etapas de expressão gênica de fibronectina e pró-colágeno, foi considerada relevante (ou significativa) quando valores obtidos na expressão foram uma vez e meia superiores ao do controle. Para inibição da expressão, foram considerados relevantes valores meia vez inferiores ao do controle.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise *in vitro* demonstraram mudanças significativas na avaliação do produto em questão.

Em relação à etapa que avaliou a expressão gênica de fibronectina e pró-colágeno tipo I, os valores considerados como aumento relevante foram aqueles uma vez e meia superiores ao do controle. Para inibição da expressão, foram considerados relevantes valores meia vez inferiores ao do controle. A incubação do complexo de fitoestrógenos em culturas de queratinócitos humanos teve a capacidade de produzir importante aumento na expressão relativa de fibronectina (na forma de mRNA) nas concentrações de 0,1; 0,05; 0,025 e 0,012% (Gráfico 1). Em relação à expressão relativa do pró-colágeno tipo I (na forma também de mRNA), o complexo de fitoestrógenos foi capaz de aumentar de maneira significativa sua expressão relativa nas concentrações 0,2; 0,1 e 0,05% (Gráfico 2).

Em relação a avaliação da atividade imunomoduladora, vê-se que, de fato, a incubação crônica das células com LPS simula o envelhecimento cronológico, gerando alteração na resposta imunológica, através de aumento de IL-10 (+ 3,68 vezes) e discreta redução de IL-1 (-1,8 vez). Porém, quando se adicionou o complexo de fitoestrógenos às culturas de células incubadas cronicamente com LPS, o perfil de resposta foi modificado, fazendo com que os níveis basais da citocina pró-inflamatória IL-1 aumentassem e retornassem àqueles do controle. O complexo foi capaz de causar redução dos níveis de IL-10 nas concentrações de 1,6%; 0,8%; 0,4% e 0,2%, em aproximadamente três vezes quando comparado ao grupo-controle, que só recebeu LPS (gráficos 3 e 4).

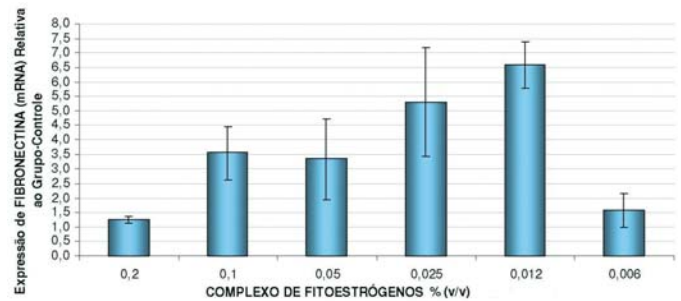


Gráfico 1: Expressão relativa de mRNA para fibronectina em culturas de queratinócitos humanos incubados com complexo de fitoestrógeno

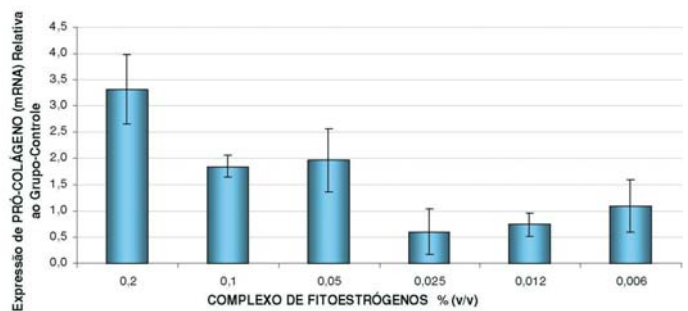


Gráfico 2: Expressão relativa de mRNA para pró-colágeno em culturas de fibroblastos humanos incubados com complexo de fitoestrógeno

Pela análise de imunofluorescência, houve nítido aumento da intensidade fluorescente do sinal antifibronectina na JDE (Figura 1).

Pela técnica de HE, verificou-se melhora nas condições gerais dos fragmentos tratados com o complexo de fitoestrógeno (Figura 2). A comparação com o controle evidenciou aumento da viabilidade e espessura da epiderme, maior coesão e compactação do estrato córneo e aumento das microvilosidades na JDE. A visualização das fibras colágenas pela coloração de Sirius Red evidenciou mais intensidade e homogeneidade da coloração vermelha (fibras de colágeno) em comparação ao controle (Figura 3).

Após o término da etapa *in vitro*, partiu-se para a etapa *in vivo*. Das 76 voluntárias incluídas, 72 concluíram o estudo; as quatro que desistiram, o fizeram por motivos pessoais, sem relação com os produtos-teste.

Através da avaliação subjetiva de eficácia das voluntárias, observou-se bom desempenho tanto do grupo A quanto do B em melhorar principalmente rugas, linhas finas, melanoses solares, outras hiperpigmentações, hidratação, viço, suavidade ao toque e aparência geral. A análise comparativa dos grupos não apontou muitas diferenças entre eles, com exceção ao eritema, que, no grupo B, apresentou aumento da resposta “melhora moderada”, e o grupo A obteve maior porcentagem da resposta “manutenção” (Tabela 1).

Através da avaliação médica subjetiva de eficácia, observou-se, em geral, bom desempenho tanto do grupo A, quanto do B. A análise comparativa dos grupos não apontou

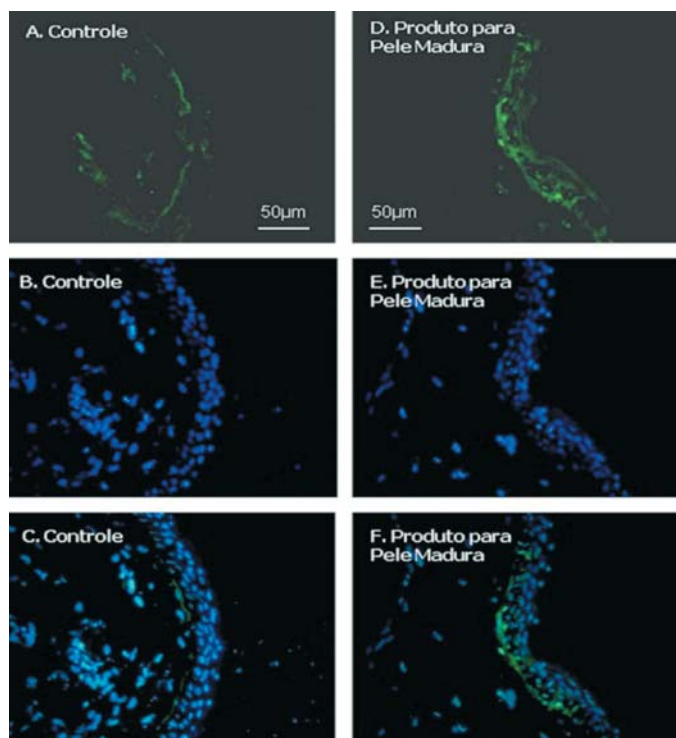


Figura 1: Imunofluorescência para estudo da fibronectina na JDE, a fim de se avaliar sua resposta sob regime *in viro* de uso de complexo de fitoestrógenos

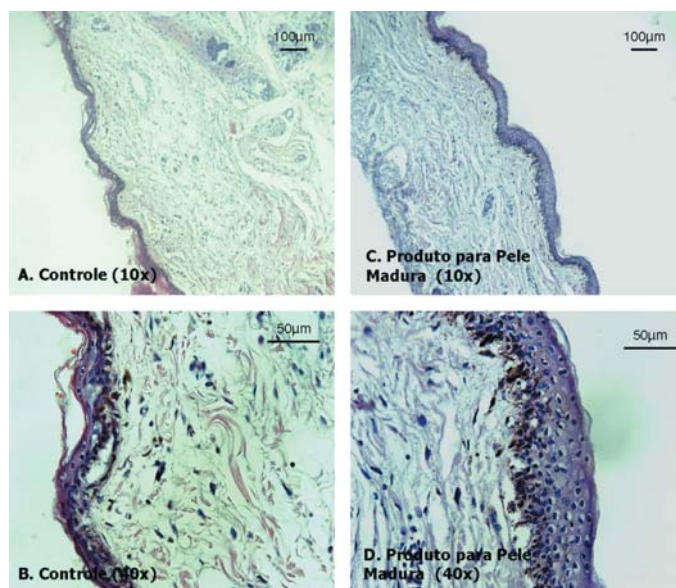


Figura 2: Coloração de HE para mostrar comportamento de redensificação dérmica sob regime *in vitro* de uso de complexo de fitoestrógenos

muitas diferenças entre os mesmos. Apenas para linhas finas eritema, na visita D90, o grupo B apresentou melhor desempenho do que o grupo A (Tabela 2).

Os grupos apresentaram boa tolerabilidade cutânea conforme está ilustrado, não apresentando diferenças estatísticas tanto na avaliação visita a visita de cada grupo, quanto na avalia-

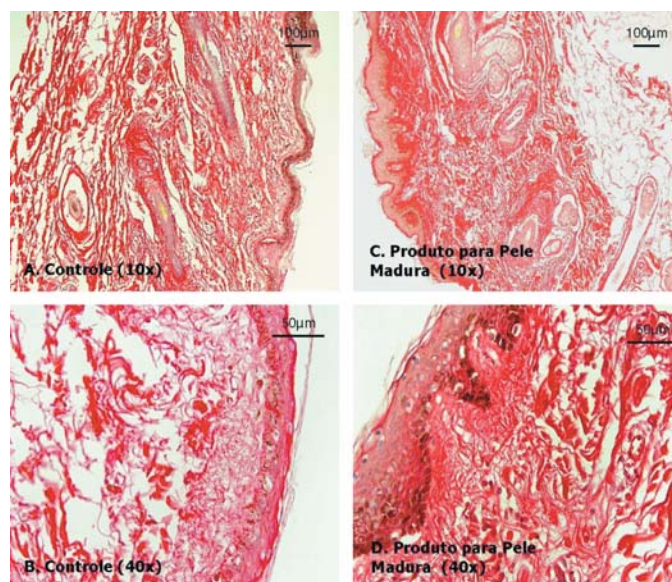


Figura 3: Coloração de Sirius Red (avaliação de colágeno) para mostrar comportamento de redensificação dérmica sob regime *in vitro* de uso de complexo de fitoestrógenos

ção comparativa entre eles. Observou-se, sim, prevalência da resposta “ausência” de eventos adversos para todos os parâmetros da avaliação subjetiva de tolerabilidade (eritema, ressecamento e descamação) (Tabela 3). A respeito da avaliação de segurança dos produtos, entre os eventos adversos a eles relacionados, não foi encontrada diferença estatística entre as visitas para os dois grupos. No grupo A, eles não ocorreram; no B, na visita D60, observou-se apenas um episódio de eritema na região malar, na asa nasal, com provável relação causal com o uso dos produtos, o qual foi resolvido totalmente e de forma espontânea antes do D90, sem suspensão do uso nem exclusão da voluntária do estudo clínico. Em relação aos eventos adversos não relacionados ao uso dos produtos, todos foram resolvidos em ambos os grupos.

Quanto ao ultrassom, viu-se que ambos os braços do estudo mostraram resposta favorável no tocante à redensificação dérmica (tanto para o grupo A, quanto para o grupo B, em D30, houve prevalência das respostas “aumentou muito” e “aumentou” fazendo alusão à quantidade de colágeno em D0). Comparando-se os grupos, viu-se que, na visita D60, no grupo A, houve queda da resposta “aumentou muito”, mantendo as outras respostas em relação a D0, e, em D90, houve queda da resposta “aumentou” e aumento das respostas “diminuiu” e “diminuiu muito”, em relação a D60; para o grupo B, em D60, houve prevalência da resposta “inalterado” e aumento de “diminuiu”, em relação a D30, e, na D90, houve aumento significativo da resposta “aumentou” e queda das respostas “inalterado” e “diminuiu”, em relação a D60, evidenciando, assim, recuperação do desempenho com o uso dos produtos nesse grupo B (Tabela 4, Figura 4).

Pela análise histológica das biópsias cutâneas, observamos que houve aumento da quantidade de fibras colágenas em 27,80% no grupo A e 19,40% no grupo B com significância estatística para comparação entre os grupos ($p = 0,405$). Para

Tabela 1: Critérios de análise clínica subjetiva de voluntárias antes e após 90 dias de uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmecêutico de mercado (grupo B)

	Grupo A			Grupo B			Significância estatística para comparação entre os grupos	
	D30	D90	Significância estatística grupo A	D30	D90	Significância estatística grupo B	D30	D90
	N. %	N. %		N %	N %			
Rugas								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	12 33	4 11	0,023	6 17	3 8	0,285	0,102	0,691
Melhora discreta	10 28	13 36	0,448	14 39	9 25	0,206	0,317	0,306
Melhora moderada	13 36	11 31	0,617	9 25	12 33	0,437	0,306	0,800
Melhora acentuada	1 3	8 22	0,013	7 19	12 33	0,181	0,024	0,293
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Linhas finas								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	12 33	3 8	0,009	8 22	4 11	0,206	0,293	0,691
Melhora discreta	8 22	14 39	0,125	12 33	6 17	0,102	0,293	0,035
Melhora moderada	15 42	10 28	0,216	9 25	12 33	0,437	0,134	0,609
Melhora acentuada	1 3	9 25	0,006	7 19	14 39	0,070	0,024	0,206
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Melanoses solares								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	10 28	6 17	0,257	9 25	10 28	0,789	0,789	0,257
Melhora discreta	12 33	10 28	0,609	8 22	5 14	0,358	0,293	0,147
Melhora moderada	11 31	6 17	0,165	15 42	7 19	0,041	0,326	0,759
Melhora acentuada	3 8	14 39	0,002	3 8	13 36	0,005	1,000	0,808
Melhora completa	-	-	-	1 3	1 3	1,000	0,314	0,314
Outras hiperpigmentações								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	10 28	7 19	0,405	9 25	10 28	0,789	0,789	0,405
Melhora discreta	12 33	9 25	0,437	8 22	3 8	0,101	0,293	0,058
Melhora moderada	11 31	6 17	0,165	15 42	9 25	0,134	0,326	0,384
Melhora acentuada	3 8	14 39	0,002	3 8	14 39	0,002	1,000	1,000
Melhora completa	-	-	-	1 3	-	0,314	0,314	-
Eritema								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	24 67	26 72	0,609	24 67	11 31	0,002	1,000	<0,001
Melhora discreta	6 17	4 11	0,496	4 11	3 8	0,691	0,496	0,691
Melhora moderada	2 6	3 8	0,643	6 17	13 36	0,061	0,134	0,005
Melhora acentuada	4 11	3 8	0,691	2 6	9 25	0,022	0,394	0,058
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidratação								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua
→

Tabela 1: Critérios de análise clínica subjetiva de voluntárias antes e após 90 dias de uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmeceútico de mercado (grupo B)

	Grupo A			Grupo B			Significância estatística para comparação entre os grupos					
	D30	D90	Significância estatística grupo A	D30	D90	Significância estatística grupo B	D30	D90				
	N.	%		N	%							
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-				
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-				
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-				
Manutenção	1	3	4	11	0,164	-	0,314	0,040				
Melhora discreta	3	8	1	3	0,303	-	0,077	0,314				
Melhora moderada	14	39	6	17	0,035	11	31	5	14	0,089	0,458	0,743
Melhora acentuada	17	47	25	69	0,056	24	67	27	75	0,437	0,096	0,599
Melhora completa	1	3	-	-	0,314	1	3	4	11	0,164	1,000	0,040
Viço												
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	5	14	2	6	0,233	1	3	-	-	0,314	0,088	0,151
Melhora discreta	3	8	7	19	0,173	-	-	3	8	0,077	0,077	0,173
Melhora moderada	12	33	13	36	0,804	16	44	17	47	0,813	0,334	0,339
Melhora acentuada	16	44	14	39	0,633	19	53	15	42	0,345	0,479	0,810
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0,314	-	0,314
Oleosidade												
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0,314	-	0,314
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0,314	0,314	-
Manutenção	20	56	22	61	0,633	9	25	23	64	0,001	0,008	0,808
Melhora discreta	7	19	7	19	1,000	6	17	1	3	0,047	0,759	0,024
Melhora moderada	4	11	4	11	1,000	12	33	5	14	0,052	0,023	0,722
Melhora acentuada	3	8	3	8	1,000	8	22	6	17	0,551	0,101	0,285
Melhora completa	2	6	-	-	0,151	-	-	-	-	-	0,151	-
Suavidade ao toque												
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	-	-	1	3	0,314	-	-	-	-	-	-	0,314
Melhora discreta	2	6	5	14	0,233	4	11	1	3	0,164	0,394	0,088
Melhora moderada	13	36	7	19	0,114	10	28	4	11	0,074	0,448	0,326
Melhora acentuada	20	56	23	64	0,471	21	58	30	83	0,020	0,812	0,061
Melhora completa	1	3	-	-	0,314	1	3	1	3	1,000	1,000	0,314
Aparência geral												
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	1	3	2	6	0,555	-	-	-	-	-	0,314	0,151
Melhora discreta	4	11	2	6	0,394	1	3	3	8	0,303	0,164	0,643
Melhora moderada	15	42	11	31	0,326	15	42	12	33	0,465	1,000	0,800
Melhora acentuada	16	44	21	58	0,238	20	56	21	58	0,812	0,346	1,000
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2: Critérios de análise clínica subjetiva médica antes e após 90 dias de uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmeceútico de mercado (grupo B)

	Grupo A			Grupo B			Significância estatística para comparação entre os grupos	
	D30	D90	Significância estatística grupo A	D30	D90	Significância estatística grupo B	D30	D90
	N. %	N. %		N %	N %			
Rugas								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	13 36	4 11	0,013	13 36	4 11	0,013	1,000	1,000
Melhora discreta	14 39	30 83	<0,001	18 50	28 78	0,014	0,343	0,551
Melhora moderada	9 25	2 6	0,022	5 14	4 11	0,722	0,234	0,394
Melhora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Linhas finas								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	8 22	3 8	0,101	10 28	2 6	0,011	0,586	0,643
Melhora discreta	16 44	27 75	0,008	21 58	13 36	0,059	0,238	0,001
Melhora moderada	12 33	6 17	0,102	5 14	21 58	<0,001	0,052	<0,001
Melhora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Melanoses solares								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	8 22	5 14	0,358	10 28	6 17	0,257	0,586	0,743
Melhora discreta	16 44	16 44	1,000	22 61	16 44	0,157	0,157	1,000
Melhora moderada	12 33	15 42	0,465	3 8	9 25	0,058	0,009	0,134
Melhora acentuada	-	-	-	1 3	4 11	0,164	0,314	0,040
Melhora completa	-	-	-	-	1 3	0,314	-	0,314
Outras hiperpigmentações								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	11 31	5 14	0,089	8 22	9 25	0,781	0,422	0,234
Melhora discreta	14 39	18 50	0,343	26 72	12 33	0,001	0,004	0,151
Melhora moderada	11 31	13 36	0,617	2 6	14 39	0,001	0,006	0,808
Melhora acentuada	-	-	-	-	1 3	0,314	-	0,314
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritema								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	11 31	21 58	0,018	13 36	6 17	0,061	0,617	<0,001
Melhora discreta	14 39	14 39	1,000	16 44	16 44	1,000	0,633	0,633
Melhora moderada	9 25	1 3	0,006	7 19	14 39	0,070	0,571	<0,001
Melhora acentuada	2 6	-	0,151	-	-	-	0,151	-
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidratação								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua
→

Tabela 2: Critérios de análise clínica subjetiva médica antes e após 90 dias de uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmecêutico de mercado (grupo B)

	Grupo A			Grupo B			Significância estatística para comparação entre os grupos	
	D30		D90	D30		D90	Significância estatística grupo B	
	N.	%	N.	%	N.	%	D30	D90
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	-	-	-	-	-	-	-	-
Melhora discreta	4	11	7	19	9	25	-	0,001
Melhora moderada	30	83	28	78	24	67	31	86
Melhora acentuada	2	6	1	3	3	8	5	14
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Viço								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	1	3	1	3	2	6	-	0,151
Melhora discreta	7	19	17	47	12	33	16	44
Melhora moderada	27	75	18	50	20	56	19	53
Melhora acentuada	1	3	-	-	2	6	1	3
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Oleosidade								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	1	3	2	6
Manutenção	5	14	20	56	2	6	22	61
Melhora discreta	14	39	15	42	20	56	11	31
Melhora moderada	17	47	1	3	12	33	1	3
Melhora acentuada	-	-	-	-	1	3	-	-
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Suavidade ao toque								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	-	-	-	-	2	6	-	-
Melhora discreta	10	28	8	22	10	28	-	-
Melhora moderada	23	64	28	78	23	64	32	89
Melhora acentuada	3	8	-	-	1	3	4	11
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Aparência geral								
Piora completa	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora moderada	-	-	-	-	-	-	-	-
Piora discreta	-	-	-	-	-	-	-	-
Manutenção	1	3	-	-	2	6	-	-
Melhora discreta	17	47	12	33	19	53	3	8
Melhora moderada	18	50	24	67	15	42	33	92
Melhora acentuada	-	-	-	-	-	-	-	-
Melhora completa	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3: Perfil de tolerabilidade cutânea do uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmeceútico de mercado (grupo B), por 90 dias

	Grupo A			Grupo B			Significância estatística para comparação entre os grupos	
	D30	D90	Significância estatística grupo A	D30	D90	Significância estatística grupo B	D30	D90
	N. %	N. %		N %	N %			
Eritema								
Ausente	36 100	36 100	1,000	34 94	35 97	0,555	0,151	0,314
Leve	- -	- -	-	2 6	1 3	0,555	0,151	0,314
Moderado	- -	- -	-	- -	- -	-	-	-
Grave	- -	- -	-	- -	- -	-	-	-
Ressecamento								
Ausente	36 100	36 100	1,000	34 94	34 94	1,000	0,151	0,151
Leve	- -	- -	1,000	2 6	2 6	1,000	0,151	0,151
Moderado	- -	- -	-	- -	- -	-	-	-
Grave	- -	- -	-	- -	- -	-	-	-
Descamação								
Ausente	34 94	34 94	1,000	33 92	36 100	0,077	0,643	0,151
Leve	2 6	2 6	1,000	3 8	- -	0,077	0,643	0,151
Moderada	- -	- -	-	- -	- -	-	-	-
Grave	- -	- -	-	- -	- -	-	-	-

Tabela 4: Evolução da densidade ultrassonográfica dérmica antes e após o uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmeceútico de mercado (grupo B), por 90 dias

	Grupo A			Grupo B			Significância estatística para comparação entre os grupos	
	D30	D90	Significância estatística grupo A	D30	D90	Significância estatística grupo B	D30	D90
	N. %	N. %		N %	N %			
Aumentou	24 66,7	19 52,8	0,225	20 60,6	24 72,7	0,292	0,601	0,079
Inalterado	12 33,3	17 47,2	0,225	13 39,4	9 27,3	0,292	0,601	0,079

fibras elásticas, houve aumento de 16,70% para os grupos A e B. Em relação à mucina, o grupo B demonstrou aumento em 2,80% com significância estatística para comparação entre os grupos ($p = 0,314$) (Tabela 5, Figura 5).

DISCUSSÃO

Apesar de o mecanismo exato do envelhecimento cutâneo ainda estar pouco esclarecido, a redução da atividade imunomoduladora da pele com a progressão da idade é uma de suas maiores razões, assim como a redução no número e função dos fibroblastos, e destruição de importantes estruturas, especialmente colágeno, elastina e fibronectina.^{13,14}

As alterações imunológicas ocorridas com a progressão da idade, além de ocasionar o envelhecimento cutâneo, também geram maior suscetibilidade à infecções e ao câncer, já que ocorrem mudanças da atividade imune; uma delas é a alteração da produção de citocinas, que, do padrão de pró-inflamatória (Th1) com produção de IL-1, torna-se predominantemente anti-inflamatória (Th2), com IL 10 como resposta humoral dominante, gerando imunossupressão exacerbada e redução do metabolismo dérmico e epidérmico, e consequente aceleração do processo de envelhecimento.^{13,14}

Nos achados deste estudo, em sua fase *in vitro*, mesmo após a introdução de substância que simula o envelhecimento crono-

Tabela 5: Evolução da histológica dérmica antes e após o uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmecêutico de mercado (grupo B), por 90 dias

	Ultrassom cutâneo		Aumentou	Inalterado	Diminuiu
Fibras colágenas	Grupo A	N	10	24	1
		%	27,80	66,70	2,80
	Grupo B	N	7	27	1
		%	19,40	75	2,80
Fibras elásticas	Grupo A	Significância estatística para comparação entre os grupos	0,405	0,437	1,000
		N	6	21	8
	Grupo B	%	16,70	58,30	22,20
		N	6	18	11
Mucina	Grupo A	%	16,70	50	30,60
		Significância estatística para comparação entre os grupos	1,000	0,478	0,422
	Grupo B	N	-	22	13
		%	-	61,10	36,10
	Grupo B	N	1	22	11
		%	2,80	61,10	30,60
		Significância estatística da comparação entre os grupos	0,314	1,000	0,617

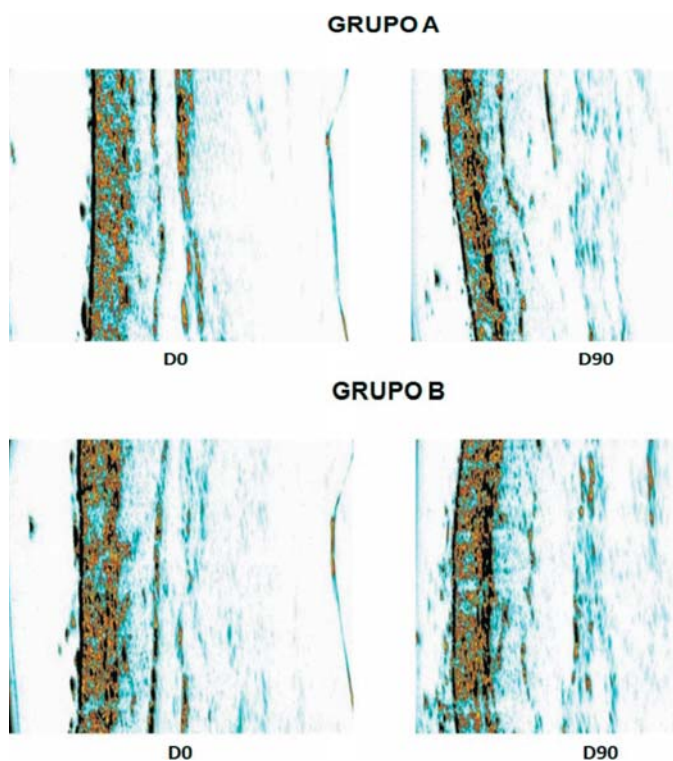


Figura 4: Evolução da densidade ultrassonográfica dérmica antes e após o uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmecêutico de mercado (grupo B), por 90 dias

lógico (LPS), viu-se que o complexo de fitoestrógenos favoreceu aumento da IL-1, fazendo com que os níveis basais dessa citocina pró-inflamatória retornassem àqueles do controle, ou seja, iguais àqueles sem a introdução do simulador do envelhe-

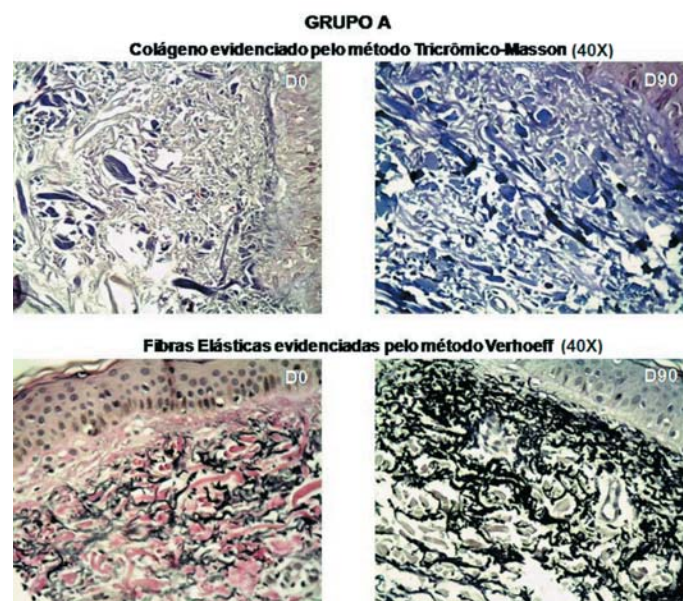


Figura 5: Evolução histológica dérmica antes e após o uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmecêutico de mercado (grupo B), por 90 dias

cimento (Gráfico 3). Além do mais, o composto também reduziu significativamente os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 nas culturas de queratinócitos humanos, mantendo com as concentrações de 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6% valores similares aos do grupo-controle basal (redução de aproximadamente três vezes em relação ao LPS) (Gráfico 4). Isso demonstra potencial estímulo imunomodulador do complexo, o que favorece a homeostasia cutânea, a qual é fisiologicamente perturbada com o envelhecimento.

As fibras colagênicas que propiciam à derme estrutura ínte-

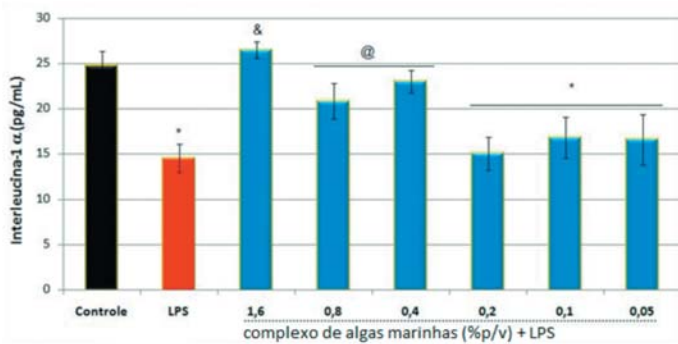


Gráfico 3: Efeitos do complexo de fitoestrógeno sobre a síntese de IL-1 em cultura de queratinócitos humanos estimulados cronicamente com LPS

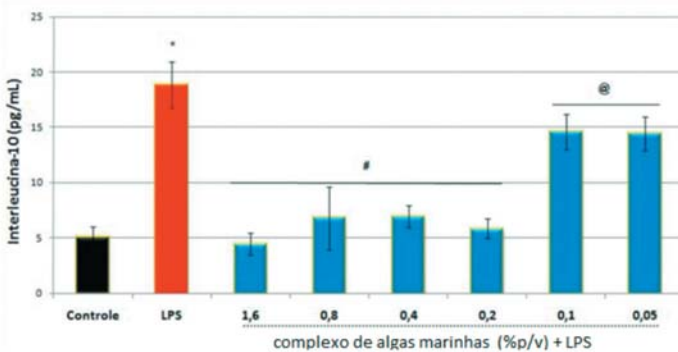


Gráfico 4: Efeitos do complexo de fitoestrógeno sobre a síntese de IL-10 em cultura de queratinócitos humanos estimulados cronicamente com LPS

gra e propriedade mecânica estão evidentemente diminuídas no envelhecimento.⁸ O aumento de pró-colágeno, causado pelo fitoestrógenos em questão, aponta para valia na reconstituição de pele envelhecida. Na análise histológica do estudo *in vitro* com coloração Sirius Red observou-se aumento na síntese de colágeno, melhores redensificação dérmica, preenchimento e organização da derme (Figura 3). O composto demonstrou capacidade de aumentar, de maneira significativa, a expressão relativa de mRNA para pró-colágeno nas concentrações de 0,2; 0,1 e 0,05%, tendo a maior concentração sido capaz de aumentar três vezes e meia a expressão do pró-colágeno (Gráfico 2).

Como se sabe, a capacidade de aumentar a expressão relativa de mRNA para pró-colágeno gera mais produção de colágeno funcional “de novo” através de reação enzimática: o pró-colágeno é clivado na pele pela enzima pró-colágeno peptidase, convertendo-se em colágeno funcional de maneira diretamente proporcional.¹⁸ Os dados obtidos neste estudo clínico, demonstram que o uso de cosmecêuticos à base de complexos de fitoestrógenos podem contribuir fortemente na prevenção e reversão dos sinais do envelhecimento cutâneo, atuando de maneira direta e efetiva nesse ciclo enzimático.

A fibronectina além de exercer a capacidade de contrair e organizar o tecido conectivo, promove adesão celular na cicatrização, reepitelização e é ainda a principal responsável pela integridade da junção dermoepidérmica.⁹⁻¹¹ Ela é um dos princi-

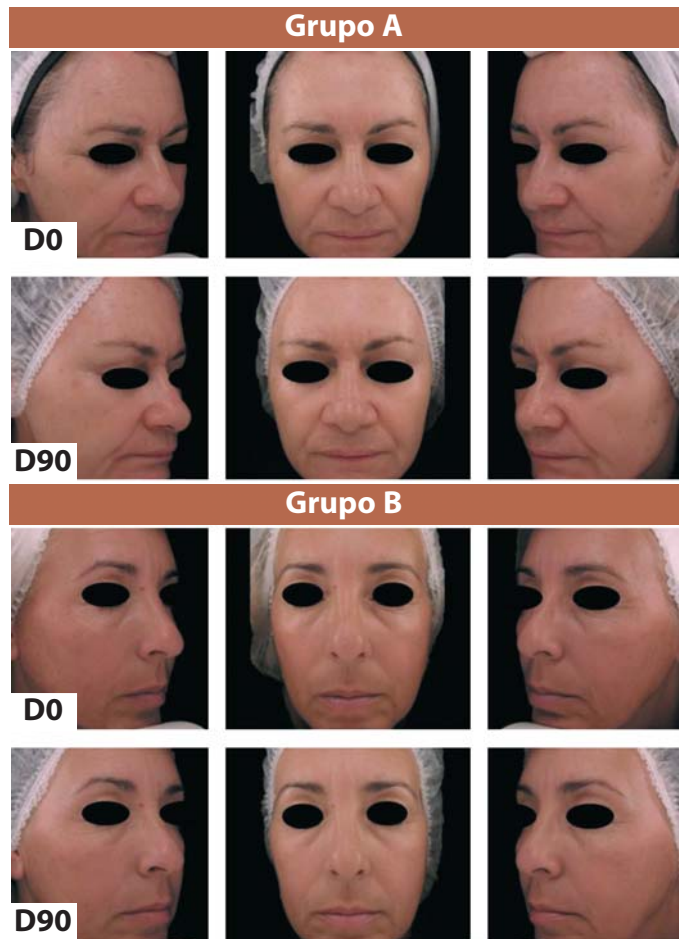


Figura 6: Evolução clínica antes e após o uso de produto à base de fitoestrógenos em pele de voluntárias com sinais de fotoenvelhecimento, isoladamente (grupo A) ou associado a produto cosmecêutico de mercado (grupo B), por 90 dias

pais marcadores do envelhecimento, quando há aumento da degradação enzimática e redução significativa de sua quantidade e qualidade.^{10,12}

O complexo de fitoestrógenos foi capaz de aumentar de maneira significativa a expressão de mRNA para fibronectina, em relação ao grupo-controle (Figura 1). Pela imunofluorescência, obteve-se aumento da intensidade fluorescente do sinal anti-fibronectina na JDE, mostrando efeito positivo do complexo sobre a restauração da integridade da JDE (Figura 1), alterada durante o envelhecimento cutâneo.

A expressão de fibronectina (na forma de mRNA), foi vista na incubação de queratinócitos humanos com o complexo de fitoestrógenos nas concentrações de 0,1%; 0,05%; 0,025% e 0,012%, tendo as duas últimas concentrações promovido a melhor resposta (aumento, aproximadamente, de 5,5 e sete vezes) (Gráfico 1).

Do ponto de vista clínico, observou-se resposta clínica favorável com o uso do produto, seja isoladamente, seja associada a outro cosmecêutico. (Figura 6)

Com o aumento da expectativa de vida, o envelhecimento cutâneo torna-se mais evidente, o que ainda é agravado pela exposição solar que danifica vários componentes das células com mudanças moleculares e morfológicas desses componentes. Isso gera a necessidade de condutas que possam minimizar esses efeitos indesejáveis, assim como sua prevenção.¹⁹

No estudo aqui conduzido, a reposta clínica favorável com o uso de fitoestrógenos na abordagem cutânea foi comprovada não só do ponto de vista *in vitro*, mas *in vivo*, através de técnicas clínicas, laboratoriais e instrumentais.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, concluímos que o complexo em questão pode contribuir fortemente no tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo, uma vez que reúne qualidades essenciais para a manutenção da qualidade da pele. Suas benesses não se restringiram aos achados *in vitro*, mas também extrapolaram para os clínicos, apoiados nas confirmações laboratoriais de complementação. Os achados histopatológicos das biópsias de pele de voluntárias que se submeteram ao regime terapêutico proposto são a comprovação cabal de que os resultados *in vitro* atingidos com o referido complexo são possíveis, obviamente respeitando as limitações fisiológicas próprias da capacidade de resposta clínica do corpo humano frente a qualquer terapêutica. ●

REFERÊNCIAS

1. Makrantonaki E, Zouboulis CC. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1119:40-50.
2. Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the Skin. *Endocrine Rev* 2000;21:457-87.
3. Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol.* 2001;26:573-77.
4. Ma W, Wlaschek M, Tancheva-Poor I, Schneider LA, Naderi L, Razi-Wolf Z, et al. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clin Exp Dermatol.* 2001;26:592-99.
5. Zouboulis ChC. Intrinsic skin aging. A critical appraisal of the role of hormones. *Hautarzt.* 2003;54(9):825-32.
6. Robert L, Fodil-Bourahla I, Bizbiz L, Robert AM. Effect of L-fucose and fucose-rich polysaccharides on elastin biosynthesis, *in vivo* and *in vitro*. *Biomed Pharmacother.* 2004;58:123-28.
7. Robert L, Fodil-Bourahla I, Bizbiz L, Robert AM. Effects of L-fucose and fucose-rich oligo and polysaccharides (FROP-s) on collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. Modulation of the effect of retinol, ascorbate and alfa-tocopherol. *Biomed Pharmacother.* 2004;58:65-70.
8. Tzaphlidou, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. *Micron.* 2004;35:173-77.
9. Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci.* 2003;116(16):3269-76.
10. Ruoslahti E. Proteoglycans in cell regulation, *J Biol Chem.* 1989;264(23):13369-72.
11. Rocquet C, Bonte F. Molecular aspects of skin ageing - recent data. *Acta APA.* 2002;11(3): 71-94.
12. Pieraggi MT, Julian M, Bouissou H, Stocker S, Grimaud JA. Dermal aging. Immunofluorescence study of collagens I and III and fibronectin. *Ann Pathol.* 1984;4(3):185-94.
13. Agius E, Lacy KE, Vukmanovic-Stejic M, Jagger AL, Papageorgiou AP, Hall S, et al. Decreased TNF-alpha synthesis by macrophages restricts cutaneous immunosurveillance by memory CD4+ T cells during aging. *J Exp Med.* 2009;206(9):1929-40
14. Assaf H, Adly MA, Hussein MR. Aging and Intrinsic Aging: Pathogenesis and Manifestations. In: Farage MA, Miller KW, Maibach HI. *Textbook of Skin Aging.* Berlin: Springer-Verlag; 2010. p. 130-132.
15. Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol.* 1999;69(2):154-57.
16. Schieke SM. Photoaging and infrared radiation. Novel aspects of molecular mechanisms. *Hautarzt.* 2003;54(9):822-24.
17. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol.* 2000;35(3):307-16.
18. Miller EJ, Gay S. The collagens: Na overview and update. *Methods Enzymol.* 1987;144:3-41.
19. Montagner S, Costa A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. *An Bras Dermatol.* 2009;84(3): 263-69.