

Avaliação *in vitro* do perfil de segurança de cosmecêuticos contendo fatores de crescimento e seus análogos

In vitro evaluation of the safety profile of cosmeceuticals containing growth factors and their analogues

RESUMO

Introdução: Envelhecimento cutâneo é afecção que atinge ou atingirá todas as pessoas, e seu tratamento representa desafio clínico. Os fatores de crescimento e seus análogos surgem como promissora opção terapêutica.

Objetivos: avaliar o perfil de segurança de alguns produtos dermocosméticos à base de fatores de crescimento ou seus análogos destinados a esse fim, utilizando modelos *in vitro* de cultura de células da pele humana.

Métodos: foram estudados dois tipos de culturas celulares, com a avaliação dos efeitos dos produtos teste sobre a proliferação de células tumorais (células de melanoma) e sobre a proliferação de fibroblastos humanos normais.

Resultados: não foram encontradas alterações morfológicas significativas nas culturas de melanoma humano e não houve alterações significativas no número de células saudáveis, pelo menos na cultura de fibroblastos normais, tendo mesmo havido em alguns deles a proliferação dessas células.

Conclusões: Esses dados preliminares demonstram que os produtos cosmecêuticos que contêm fatores de crescimento como ativos principais podem ser considerados seguros para aplicação tópica.

Palavras-chave: peptídeos e proteínas de sinalização intercelular; envelhecimento da pele; pele.

ABSTRACT

Introduction: Aging skin is a condition that affects (or will affect) all people, and its treatment is considered a clinical challenge. Growth factors and their analogues are emerging as a promising therapeutic option.

Objectives: To evaluate the safety profile of some dermocosmetic products with formulations based on growth factors – or their analogs intended for that purpose – using *in vitro* human skin cell culture models.

Methods: Two types of cell cultures were studied, and the effects of the study products on the proliferation of melanoma cells and normal human fibroblasts were evaluated.

Results: No significant morphological alterations were found in the cultured human melanoma, and no significant decrease in the number of healthy cells was verified in the normal fibroblasts culture. In some cases there was even a proliferation of those cells.

Conclusions: These preliminary data demonstrate that cosmeceutical products containing growth factors as an active principle can be considered safe for topical application.

Keywords: intercellular signaling peptides and proteins; skin aging; skin.

Artigo Original

Autores:

Gustavo Dieamant¹
Adilson Costa²
Liliana Bechelli³
Juliana Tibério⁴
Carolina Pereira⁵

¹ Farmacologista/imunotoxicologista, Gerente de Tecnologia, Pesquisa e Desenvolvimento da Chemyunion Química Ltda., Sorocaba/SP, Brasil;

² Dermatologista, Mestre em Dermatologia pela Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (EPM/UNI FESP), São Paulo/SP, Brasil; Doutorando em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo/SP, Brasil; Coordenador dos ambulatórios de acne, cosmia, dermatologia na gravidez, vitiligo e pesquisa clínica em Dermatologia do Serviço de Dermatologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas), Campinas/SP, Brasil;

³ Dermatologista, membro da Sociedade Brasileira de Dermatologia; Pediatra, membro da Sociedade Brasileira de Pediatria; Avaliadora de Segurança de Produtos Cosméticos pela Vrije Universiteit Brussel – Bélgica; Gerente Médica da Linha Skin Care da Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo/SP, Brasil;

⁴ Bióloga, Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu/SP, Brasil; Pesquisadora Pleno do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento na Chemyunion Química Ltda., Sorocaba/SP, Brasil;

⁵ Médica, estagiária de Pesquisa Clínica em Dermatologia da KOLderma Instituto de Pesquisa Clínica Ltda., Campinas/SP, Brasil;

Correspondência para:

Dr. Gustavo Dieamant
Avenida Independência, 1501 – Iporanga
18087101 – Sorocaba – SP
E-mail: gustavo.dieamant@gmail.com

Data de recebimento: 25/03/2012

Data de aprovação: 02/08/2012

Local de realização do estudo: *in vitro*: Chemyunion Química Ltda. – Rua José de Oliveira Cassu, 447, CEP 18103065, Bairro Éden, Sorocaba/SP, Brasil, Tel.: OXX 1521022002;

Conflito de interesses: Trabalho conduzido sob solicitação da Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda - São Paulo (SP), Brasil.

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

INTRODUÇÃO

A pele, o maior órgão do corpo humano, tem participação importante na proteção contra agressões ambientais, impedindo a perda de fluidos corpóreos essenciais, a invasão de agentes tóxicos, microrganismos e quantidades excessivas de radiação ultravioleta, bem como protegendo contra correntes elétricas, forças mecânicas e diferenças de temperaturas.¹

Nas últimas décadas, muitos autores afirmam que a pele, particularmente representada por epiderme e derme, apresenta intensa atividade metabólica e endocrinológica.² Células residentes na pele também sintetizam e liberam grande quantidade de hormônios e neurotransmissores, entre eles hormônio paratireoideano (PTH), peptídeos proopiomelanocortina-derivados (POMCs), hormônio estimulador de melanócitos (MSH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), beta-endorfina e encefalinas, hormônio liberador de corticotropinas (CRH), peptídeos urocortinas, os neurotransmissores catecolaminas e acetilcolina, os precursores das aminas biogênicas e os fatores de crescimento.³⁻¹¹ Todas essas substâncias produzidas local ou sistemicamente atuam em receptores específicos, recentemente descritos na pele.¹²

A regulação dos mecanismos de defesa da pele na homeostasia local e sistêmica desempenha papel fundamental na patogênese e no controle de uma variedade de distúrbios cutâneos, incluindo psoríase, dermatite de contato alérgica e irritativa, líquen plano, alopecia areata e vitiligo, e, mais recentemente, o envelhecimento cutâneo.¹³⁻¹⁹

Durante anos, vêm-se buscando alternativas para interromper, reverter ou controlar as alterações que ocorrem na pele durante o processo de envelhecimento.

Envelhecimento cutâneo (EC) representa insidioso, multifatorial e progressivo processo degenerativo, de curso inevitável e praticamente irreversível.²⁰ Caracteriza-se por alterações celulares e moleculares, com diminuição progressiva da capacidade de homeostase do organismo, levando à senescência e morte celular programada (apoptose).²¹

É tido como resultado de dois processos sinérgicos: envelhecimento intrínseco ou cronológico e envelhecimento extrínseco.^{22,23} Envelhecimento intrínseco ou cronológico é definido como sendo um processo geneticamente programado, portanto independente dos fatores externos ou ambientais, podendo ser disparado ou agravado por fatores neuro-hormonais. Por outro lado, o envelhecimento extrínseco corresponde às mudanças ocorridas na pele devido ao estilo de vida, sendo influenciado, sobretudo, pela radiação ultravioleta (UV), seguida por produtos químicos, tabagismo, calor e demais insultos ambientais. Ambos aceleram as alterações sofridas pelo tecido cutâneo durante o processo de envelhecimento, alterando direta ou indiretamente o complexo sistema neuroimunoendocrinológico da pele.²⁴⁻²⁵

Com o passar do tempo, ocorrem alterações moleculares que desencadeiam alterações orgânicas que, em última análise, levam ao envelhecimento. Exemplo de mecanismo resultando em envelhecimento cutâneo é o reparo no DNA telomérico no final dos cromossomos, com seu encurtamento e ruptura.^{26,27} Como a DNA-polimerase não consegue transcreever a sequên-

cia final de bases presentes na fita de DNA durante a replicação, o tamanho telomérico se reduz a cada mitose.²⁸ Essa redução do telômero foi associada ao envelhecimento celular.²⁹⁻³²

Outra alteração importante é a degradação de produtos oxidados, que é função exercida pela proteossoma, protease multicatalítica cuja atividade parece diminuir ao longo da vida, notando-se degradação incompleta de proteínas oxidadas, aumento de agregados proteicos e aceleração da disfunção celular.^{33,34}

O aumento da expectativa de vida populacional, segundo a Organização Mundial de Saúde, tem estimulado tanto o estudo do processo de envelhecimento cutâneo quanto a busca de ferramentas para seu tratamento, controle e prevenção, visando principalmente à qualidade de vida durante esse insidioso e degenerativo processo, com base em mecanismos bioquímicos, moleculares e celulares.³⁵

Muitos ativos ditos anti-envelhecimento são incorporados aos chamados cosmeceúticos, que, apesar de se nomearem por termo ainda não reconhecido pelas agências regulatórias de drogas, constituem uma classe de produtos tópicos situados, segundo seu mecanismo de ação, entre os cosméticos e os medicamentos. São definidos como produtos cosméticos que proporcionam benefícios semelhantes aos dos medicamentos, com segurança e eficácia comprovadas através de métodos validados internacionalmente. Dessa forma, podem ser úteis como coadjuvantes ao tratamento clínico medicamentoso, no preparo da pele para procedimentos e na manutenção de resultados.³⁶

Muitas classes de ativos anti-envelhecimento têm sido desenvolvidas e, com base na pesquisa envolvida, podem ser incorporadas aos cosmeceúticos, com grande possibilidade de benefício clínico. Nesse contexto, os fatores de crescimento ou análogos dessas substâncias vêm-se mostrando substâncias promissoras nas estratégias de rejuvenescimento, participando desse processo em diversos níveis.³⁷⁻⁴⁴

Fatores de crescimento (do inglês *growth factors*) formam um conjunto de substâncias, a maioria de natureza proteica, que juntamente com hormônios, citocinas e neurotransmissores desempenham importante papel na comunicação intercelular.¹¹ A função principal dos fatores de crescimento é o controle externo do ciclo celular, mediante abandono da quiescência celular (fase G0) e entrada da célula na fase G1.³⁸

No entanto, a função dos fatores de crescimento não se limita à estimulação da proliferação celular mediante a regulação de seu ciclo iniciando a mitose, mas é também crucial na manutenção da sobrevivência, na estimulação da migração e na diferenciação celular, bem como na apoptose.⁴⁰ Eles promovem a diferenciação e a maturação das células, dependendo do tipo de fator de crescimento envolvido, bem como de seu local de ação. As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), por exemplo, estimulam a diferenciação óssea, enquanto o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estimula a diferenciação dos vasos sanguíneos.⁴⁵

Outro aspecto de grande importância consiste no fato de que os fatores de crescimento desempenham sua função em muito baixas concentrações nos líquidos ou tecidos corporais,

na maioria das vezes na ordem de picogramas (pg).⁴⁵ De maneira geral, agem como sinalizadores entre as células, unindo-se a receptores celulares específicos situados na membrana celular que transmitem o sinal do exterior para o interior da célula, mediante o acoplamento de diferentes proteocinasas que se fosforilam e ativam uma cascata de sinais que acaba com a ativação de um ou vários genes (transdução de sinal).³⁸

Com o intuito de avaliar a importância dos fatores de crescimento no ciclo de vida celular, estudos utilizando modelos de culturas de células (*in vitro*) demonstraram que os fatores de crescimento são transportados pelo soro e são produzidos em grande número de células. Nesses estudos *in vitro*, evidenciou-se que, para que as células proliferem em cultura, é necessária a existência de soro rico em fatores de crescimento e moléculas de adesão, além de outras moléculas nutritivas como lipoproteínas, transferrina, aminoácidos e substratos energético-metabólicos.^{46,47}

Além disso, estudos direcionados ao envolvimento dos fatores de crescimento nos processos cutâneos têm demonstrado seu papel na cicatrização de feridas e remodelação tecidual.^{48,49}

Assim como uma lesão, o envelhecimento cutâneo pode ser considerado injúria de origem aguda e crônica sobre a pele, desencadeando uma cascata de eventos que inclui inflamação, formação de tecido novo e remodelação tecidual, o que finalmente resulta em reconstrução parcial da área afetada. Esse processo de reparação é iniciado imediatamente após a injúria através da liberação de vários fatores de crescimento, citocinas e compostos séricos de baixo peso molecular, originados a partir do rompimento dos vasos ou da degranulação de plaquetas e demais células, incluindo fagócitos, que participam do processo.⁵⁰

Além da importância das interações célula-célula e célula-matriz, todos os estágios do processo de reparação são controlados por uma grande variedade de diferentes fatores de crescimento e citocinas. Muitos estudos têm demonstrado efeito benéfico de muitos destes fatores de crescimento, por exemplo, fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGFs) fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator estimulador de colônia para granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de crescimento transformador (TGF), sobre o processo de cura, tanto em modelos de culturas de células (*in vitro*) e modelos animais, como também em pacientes que sofrem de diferentes tipos de transtornos de cicatrização.⁵¹⁻⁵⁵

Similar à cicatrização de feridas, a maior parte dos danos celulares promovidos pela ação de radicais livres, gerados, por exemplo, pela ação da radiação ultravioleta, é reparada. No entanto o acúmulo de pequenas frações de danos não reparados que ocorre com o passar dos anos resulta em alterações clínicas significativas e é denominado elastose solar.^{11,56}

O fotodano da pele pode ser considerado, portanto, ferida crônica que pode não progredir para a completa cicatrização e remodelamento, em partes, porque o tamanho da superfície agredida é muito maior do que o aceitável para que um reparo eficaz ocorra, além do que a exposição à RUV, direta ou indiretamente, é evento crônico.¹¹

Devido ao forte envolvimento dos fatores de crescimento no processo de regeneração tecidual e, levando em consideração o exposto, o número de pesquisas e desenvolvimento nessa área tem-se multiplicado.

No que tange ao estudo dos fatores de crescimento como agentes de ação antienvhecimento, estudos clínicos demonstraram resultados positivos na aceleração da cicatrização das feridas, enfatizando, portanto, sua importância nos produtos destinados a atenuar os danos do envelhecimento.^{56,57}

Sua aplicação tópica está relacionada ao estímulo de queratinócitos, fibroblastos entre outras células que têm sua capacidade proliferativa reduzida com o envelhecimento. Através de estudo clínico e histopatológico com acompanhamento de voluntários durante seis meses, evidenciaram a proliferação de proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno, com respostas de neocolagênese e aumento da densidade de fibroblastos, especialmente em derme papilar, confirmando as observações *in vitro* da participação de fatores de crescimento e citocinas na atividade mitótica de fibroblastos dérmicos.^{44,58}

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de segurança de alguns produtos dermocosméticos à base de fatores de crescimento ou seus análogos destinados a esse fim, utilizando modelos *in vitro* de cultura de células da pele humana, validados e reconhecidos pela comunidade científica internacional, bem como por órgãos de regulamentação do setor em diferentes países.

MÉTODOS

As condições experimentais adotadas, através da utilização de células humanas em condições ótimas de cultivo, condizem com as metodologias atuais aplicadas, aceitas e validadas pela comunidade científica internacional. As culturas celulares humanas foram adquiridas comercialmente de companhias internacionais qualificadas e certificadas. Os experimentos foram conduzidos mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

As avaliações de segurança descritas nos próximos itens foram realizadas em três cosmecêuticos distintos com fatores de crescimento ou seus análogos em sua formulação (Caregen Co. Ltd., Seoul, Korea). Esses produtos estão descritos adiante, assim como os seus princípios ativos (sob a forma de nome Inci – sigla inglesa para Internacional Nomenclature for Cosmetics Ingredients) e indicação de uso principal (Tabela 1):

1. Avaliação dos efeitos dos produtos teste sobre a proliferação de células tumorais (células de melanoma)

Esse experimento teve como proposta avaliar a possível ação dos produtos contendo fatores de crescimento e/ou seus análogos sobre a proliferação de células tumorais, uma vez que, sendo substâncias com ação biológica conhecida, alguns questionamentos podem surgir nesse sentido.

A linhagem de melanoma (Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA) foi semeada em garrafas de 75cm², cultivada e

expandida em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂, utilizando meio de cultura específico (soro fetal bovino 10%, extrato de pituitária bovina 1ml, gentamicina 50µg/ml, insulina 2µg/ml, anfotericina B 12,5µg/ml, DMEM 500ml). Ao atingir confluência celular (aproximadamente 80% da superfície ocupada), as células foram tripsinizadas (solução tripsina/EDTA 0,25%) e semeadas em placas de seis poços para posterior incubação com os três produtos teste (Cosmecêutico 1, Cosmecêutico 2 e Cosmecêutico 3) e avaliação da proliferação celular.

As células foram incubadas com concentração não citotóxica dos produtos testados, determinada previamente através do ensaio do MTT (MTT Assay, Invitox n. 17, Ecvam). A verificação da viabilidade e citotoxicidade celular pelo uso do corante vital MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) é um dos parâmetros mais empregados e citados na literatura. Baseia-se na conversão do brometo de tetrazolium amarelo (MTT) para formazan azul pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial nas células viáveis metabolicamente ativas. O estudo de proliferação celular foi mantido por 12 passagens com medidas em seis tempos experimentais, a saber:

- T1 – avaliação após 48 horas de tratamento (2 dias),
- T2 – avaliação após 72 horas de tratamento (3 dias),
- T3 – avaliação após 144 horas de tratamento (6 dias),
- T4 – avaliação após 288 horas de tratamento (12 dias),
- T5 – avaliação após 456 horas de tratamento (19 dias);
- T6 – após 624 horas de tratamento (26 dias).

As células foram mantidas em contato com o produto teste, e o meio trocado a cada dois ou três dias. Ao se atingir confluência celular nos poços, as placas foram tripsinizadas com o intuito de permitir o desprendimento das células das garrafas e então replaqueadas para continuidade da avaliação.

Em cada tempo experimental, as células foram tripsinizadas e semeadas em placa de 96 poços e, após 24 horas, o MTT foi adicionado à cultura, então incubada por mais quatro horas. A absorbância de cada poço foi determinada a 450nm em um leitor de microplacas.

A taxa de viabilidade celular foi expressa em porcentagem, conforme a fórmula:

Além disso, imagens foram obtidas para registro da morfo-

$\% \text{ células viáveis} = 100 \frac{\text{absorbância da amostra (poço tratado)}}{\text{absorbância do controle}} \times 100$

logia das células após cada um dos períodos de contato, a fim de avaliarmos uma possível alteração em células tumorais.

2. Proliferação de fibroblastos humanos normais

Esse experimento teve como proposta avaliar a possível ação dos produtos contendo fatores de crescimento e/ou seus análogos sobre a proliferação de células dérmicas normais, o que permite concluir sobre critérios relacionados à segurança, como, por exemplo, possível ação na alteração da morfologia celular ou possíveis anomalias.

Esse teste foi realizado para os produtos Cosmecêutico 1,

Cosmecêutico 2 e Cosmecêutico 3, os quais, pelas suas composições, teriam real capacidade de proliferação fibroblástica. Para essa avaliação, fibroblastos humanos normais (Clonetics, Cambrex/Lonza Inc., Walkersville, USA) foram semeados em garrafas de 75cm², cultivados e expandidos em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂, utilizando meio de cultura específico (soro fetal bovino 10%, gentamicina 50µg/ml, anfotericina B 12,5µg/ml, RPMI 500ml). Ao atingir confluência, as células foram semeadas em garrafas de 25cm² (em triplicata), para posterior incubação com os produtos teste.

As células foram incubadas com concentração não citotóxica dos produtos Cosmecêutico 1, Cosmecêutico 2 e Cosmecêutico 3 (respectivamente, 0,006%, 0,006% e 0,012%), determinada previamente através da técnica de MTT. O estudo de proliferação celular teve duração de 12 semanas com medidas em três tempos experimentais: 4, 8 e 12 semanas de contato com cada um dos produtos.

As células foram mantidas em contato com os produtos teste, e o meio trocado a cada dois ou três dias. Ao se atingir confluência celular, as garrafas de 25cm² eram tripsinizadas e replaqueadas. A contagem celular foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer.

Além disso, imagens foram obtidas para registro da morfologia das células após cada um dos períodos de contato, a fim de se avaliar possível alteração em células normais.

RESULTADOS

Com relação a todos os resultados, foi utilizado método paramétrico de análise de variância (Anova) para a realização da inferência estatística, seguido do teste de Tukey para comparação múltipla. Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de “p” foram menores ou iguais a 0,05.

1. Avaliação da proliferação de células de melanoma humano

A avaliação do estímulo da proliferação de células de melanoma humano (Figura 1) foi realizada para as três formas cosmeceúticas (Cosmecêutico 1, Cosmecêutico 2 e Cosmecêutico 3), e os resultados obtidos estão relacionados na tabela 2.

Na figura 1, não foram encontradas alterações morfológicas significativas nas culturas de melanoma humano. Em relação à figura 1 (A), considerada controle sem tratamento, os grupos que receberam os tratamentos com os produtos Cosmecêutico 1 (Figura 1 B), Cosmecêutico 2 (Figura 1 C) e Cosmecêutico 3 (Figura 1 D) apresentaram comportamentos similares, tanto para o número de células (avaliação visual) quanto para a morfologia. Dessa forma, podemos concluir que os produtos avaliados neste estudo não promovem alterações significativas quando aplicados sobre células tumorais, representadas aqui por melanoma humano.

De forma a quantificar o número de células após tratamento com cada um dos produtos avaliados neste estudo, a tabela 2 demonstra os resultados obtidos para cada um deles, após 26 dias de tratamento:

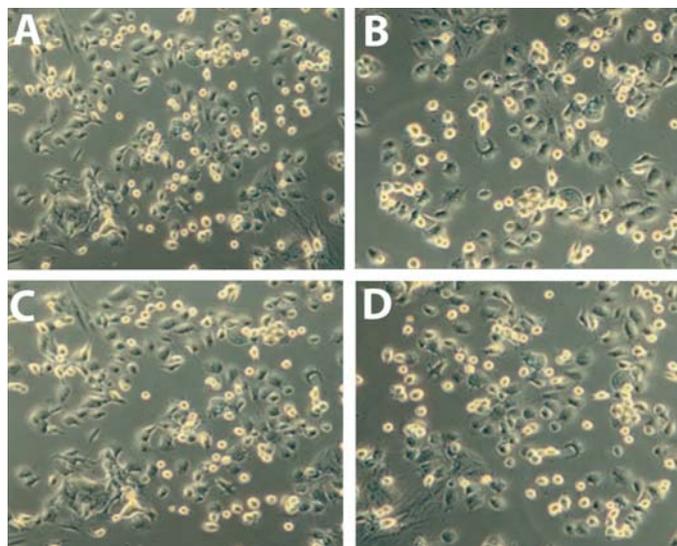


Figura 1 (A, B, C e D): Cultura de melanoma, mantidos em garrafa de 25cm² em incubadora úmida à 37°C, sendo (A) controle sem tratamento, (B) Cosmeceutico 1, (C) Cosmeceutico 2 e (D) Cosmeceutico 3.

2. Avaliação da proliferação de fibroblastos humanos normais

As celularidades das culturas de fibroblastos humanos normais foram avaliadas após quatro, oito e 12 semanas de tratamento com os produtos-alvo (Cosmeceutico 1, Cosmeceutico 2 e Cosmeceutico 3), e os resultados estão expressos na tabela 3.

Conforme podemos observar na tabela 3, os Cosmeceuticos 2 e 3 não promoveram alterações significativas no número de células saudáveis, nem para mais, nem para menos. Esses resultados demonstram que os produtos são seguros devido à não alteração morfológica das células, e a ausência de proliferação não limita a eficácia dos produtos, uma vez que o aumento da síntese de colágeno, por exemplo, não depende do aumento do número de células e sim do aumento de seu metabolismo. O produto Cosmeceutico 1, por sua vez, foi capaz de aumentar o número de fibroblastos de maneira significativa ($P < 0,05$), porém sem alterar a morfologia das células, o que demonstra também a sua segurança.

DISCUSSÃO

Os fatores de crescimento são proteínas reguladoras que agem como mediadores biológicos naturais, atuando sobre os processos de reparo e regeneração, podendo ser encontrados em vários tecidos em fase de cicatrização e/ou renovação celular.⁴⁸

Segundo Fitzpatrick e Rostan (2003), o fotodano – dano gerado à pele em decorrência da fotoexposição – é considerado ferida crônica que pode não progredir para a completa cicatrização e remodelamento.^{11,56}

Assim, levando em consideração o envolvimento dos fatores de crescimento no processo de regeneração tecidual e cicatrização das feridas, fica evidente que o fotoenvelhecimento é evento cicatricial crônico, em que o papel dos fatores de crescimento, bem como o envolvimento de citocinas e neuromediadores, é de grande importância para seu controle e/ou tratamento.

Devido à intensa busca de ferramentas que atuem de forma a retardar, controlar ou reverter os sinais do envelhecimento, independente de sua causa principal, a ação dos fatores de crescimento tem sido muito estudada, o que tem levado a uma nova geração de cosmecêuticos cujas ações se baseiam nos efeitos desses mediadores endógenos de atividade parácrina e endócrina.

Os estudos realizados neste trabalho buscaram, principalmente, a avaliação da segurança de três produtos cosmecêuticos que contêm em suas formulações, como principais ingredientes ativos, os fatores de crescimento ou seus análogos. Os modelos experimentais aqui adotados obedeceram a protocolos reconhecidos e validados internacionalmente, utilizando culturas de células normais e tumorais da pele humana, cultivadas *in vitro*. Para avaliação da ação dos cosmecêuticos contendo os fatores de crescimento ou seus análogos sobre a proliferação de células tumorais (cultura celular de melanoma humano), cada um dos produtos foi mantido em contato com as culturas e as tomadas de medidas ocorreram em seis tempos experimentais distintos, equivalentes aos dias dois, três, seis, 12, 19 e 26. Para medida da viabilidade celular, utilizou-se método colorimétrico que se baseia na medida da função respiratória das células via conversão do brometo de tetrazolium amarelo (MTT) para formazan pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial nas células viáveis metabolicamente ativas.

Tabela 1 – Denominação dos produtos avaliados neste estudo, incluindo indicação principal de uso e seus princípios ativos*

Descrição Produto	Indicação Principal de Uso	Princípios ativos*1 (fatores de crescimento ou seus análogos)
Cosmeceutico 1	Creme anti-rugas	Human Oligopeptide-3 (FGFb) Human Oligopeptide-1 (EGF) Human Oligopeptide-13 (FGFa) Human Oligopeptide-2 (IGF-1)
Cosmeceutico 2	Serum revitalizante facial	Oligopeptide-20 (CG-IPD 5); Oligopeptide-24 (CG-EPD 3)
Cosmeceutico 3	Creme para área dos olhos	Human Oligopeptide-3 (FGFb) Human Oligopeptide-1 (EGF)

*Somente os fatores de crescimento foram listados, porém outros ativos podem estar presentes nas respectivas formulações.

Os resultados obtidos demonstram que os três produtos avaliados, aqui denominados Cosmecêutico 1, Cosmecêutico 2 e Cosmecêutico 3, não apresentaram efeito sobre o número de células malignas, evidenciando sua incapacidade de promover a progressão de possíveis cânceres epidérmicos. Cabe ressaltar ainda que o Cosmecêutico 3 promoveu discretas, porém não significativas, reduções ($P < 0,05$) na celularidade nas cultura de melanoma humano ao longo do tempo, quando comparamos ao respectivo grupo controle não tratado. Isso demonstra, por mais que inexistentem diferenças significativas, efeito contrário à indução da proliferação.

A fim de complementar os estudos realizados com células tumorais, expomos fibroblastos humanos normais aos mesmos três produtos, e a avaliação da proliferação celular foi realizada ao longo de 12 semanas de estudo. Avaliou-se a modificação quantitativa da proliferação celular em três tempos experimentais, ou seja, após quatro, oito e 12 semanas de contato com os produtos teste. Ao término das 12 semanas de avaliação, os fibroblastos humanos cultivados mantiveram-se normais em termos morfológicos, ou seja, os produtos não promoveram mutações celulares. No que diz respeito ao número de células, houve, nos grupos tratados com o Cosmecêutico 2, aumento no número de fibroblastos humanos normais não senescentes nos três tempos avaliados, evidenciando aumento superior a 30% na oitava semana de contato. Os grupos que receberam os produtos Cosmecêutico 1 e Cosmecêutico 3, por sua vez, não apresenta-

ram alteração significativa no número de células em nenhum dos tempos experimentais avaliados. Esses resultados evidenciam que todos os produtos avaliados neste estudo não apresentam potencial citotóxico, ou seja, não causam morte celular, nem em curto e nem a longo prazo, sendo considerados seguros para aplicação cosmética diária.

Os principais fatores de crescimento presentes nas formulações dos três produtos avaliados, e comuns aos três, porém em diferentes concentrações em cada um deles, são: Human Oligopeptide-3 (FGFb, *basic fibroblast growth factor*), Human Oligopeptide-1 (EGF, *epidermal growth factor*), Human Oligopeptide-13 (FGFa, *acid fibroblast growth factor*) e Human Oligopeptide-2 (IGF-1, *insulin growth factor*).

FGFa e FGFb, Human Oligopeptídeo-13 e Human Oligopeptídeo-3, respectivamente, foram considerados fatores de crescimento seguros para aplicação tópica em humanos (estudo clínico), em pacientes com queimaduras graves.⁵⁹

EGF (Human Oligopeptide-1), por sua vez, é um dos peptídeos mais explorados pela área cosmética. Possui a habilidade intrínseca de promover a proliferação de células, estimular o metabolismo e a produção de proteínas de matriz extracelular, como, por exemplo, colágeno e ácido hialurônico. Estudos demonstram que apesar de estimular a proliferação celular, seu uso é seguro, pois sua ação específica em EGF receptores (EGFr) limita sua ação sobre a progressão de tumores.⁶⁰

Tabela 2 – Avaliação com base nos resultados quantitativos dos diferentes tratamentos, obtidos a partir da contagem do número de células ao longo do tempo, em relação ao controle não-tratado

Descrição do produto	Efeito sobre as células de melanoma humano
Cosmecêutico 1 (0,024%)	Promoveu nenhuma alteração significativa ($P > 0,05$) na celularidade em cultura de melanoma humano ao longo do tempo, quando comparamos ao respectivo grupo controle não-tratado
Cosmecêutico 2 (0,024%)	Promoveu nenhuma alteração significativa ($P > 0,05$) na celularidade em cultura de melanoma humano ao longo do tempo, quando comparamos ao respectivo grupo controle não-tratado
Cosmecêutico 3 (0,049%)	Promoveu discretas, porém não significativas, reduções ($P < 0,05$) na celularidade em cultura de melanoma humano ao longo do tempo, quando comparamos ao respectivo grupo controle não-tratado

Tabela 3 – Avaliação com base nos resultados quantitativos dos diferentes tratamentos, obtidos a partir da contagem do número de células ao longo do tempo, em relação ao controle não-tratado, considerando 3 tempos distintos: 4, 8 e 12 semanas

Forma cosmecêutica	Efeito sobre os fibroblastos humanos
Cosmecêutico 1 (0,024%)	Promoveu um aumento no número de células em culturas de fibroblastos humanos normais não-senescentes nos três tempos experimentais avaliados (em 4 semanas, 24,37%; em 8 semanas, 30,27%; em 12 semanas, 18,52%), em relação ao controle não-tratado.
Cosmecêutico 2 (0,024%)	Não promoveu aumento significativo no número de células em culturas de fibroblastos humanos normais nos tempos experimentais avaliados (após 4, 8 e 12 semanas de aplicação)
Cosmecêutico 3 (0,049%)	Não promoveu aumento significativo no número de células em culturas de fibroblastos humanos normais nos tempos experimentais avaliados (após 4, 8 e 12 semanas de aplicação)

IGF-1 (Human Oligopeptide-2) foi considerado importante fator de crescimento com ação terapêutica, seguro e bem tolerado, sendo esses benefícios comprovados em dois estudos clínicos de relevância científica, sendo um deles realizado por Traynor et al., e o outro por Sorenson et al.^{61,62}

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com essas pesquisas anteriores, uma vez que todas elas evidenciam, em áreas diferentes de aplicação e com fatores de crescimento diversos, que essas substâncias são eficazes e bastante seguras para aplicação tópica.

CONCLUSÃO

Levando em consideração a importância dos fatores de crescimento na indústria cosmecêutica e seu crescimento exponencial nas pesquisas relacionadas à área, os resultados aqui obtidos, com base na utilização de modelos de culturas celulares de pele humana *in vitro*, saudáveis e tumorais, podemos concluir que esses dados preliminares demonstram que os produtos cosmecêuticos que contêm fatores de crescimento como ativos principais, podem ser considerados seguros e eficazes para aplicação tópica, uma vez que não promoveram a proliferação de células anômalas, bem como, em alguns casos, estimularam a proliferação de fibroblastos normais, células cruciais no processo de reparação tecidual.●

REFERÊNCIAS

1. Artner J, Gitsch E. Über lokalwirkungen von östriol. Geburtshilfe und Frauenheilkunde. 1959;19:812-9.
2. Grando SA. Physiology of endocrine skin interrelations. J Am Acad Dermatol. 1993;28(6):981-92.
3. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. Physiol Rev. 1996;76(1):127-73.
4. Slominski A, Wortsman J, Paus R, Luger T, Salomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. Physiol Rev. 2000;80(3):979-1020.
5. Slominski A, Mihm MC. Potential mechanism of skin response to stress. Int J Dermatol. 1996;35(12):849-51.
6. Luger T, Paus R, Slominski A, Lipton J. Cutaneous neuromodulation: the proopiomelanocortin system. Ann N Y Acad Sci. 1999;885:1-479.
7. Grando SA, Horton RM. The keratinocyte cholinergic system with acetylcholine as an epidermal cytotransmitter. Curr Opin Dermatol 1997; 4: 462-68.
8. Schallreuter KU, Lemke KR, Pittelkow MR, Wood JM, Korner C, Malik R. Catecholamines in human keratinocyte differentiation. J Invest Dermatol. 1995;104(6):953-57.
9. Slominski A, Pawelek J. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. Clin Dermatol. 1998;16(4):503-15.
10. Slominski A, Paus R. Are L-tyrosine and L-dopa hormone-like bioregulators?. J Theor Biol. 1990;143(1):123-38.
11. Fitzpatrick RE, Rostan EF. Reversal of photodamage with topical *growth factors*: a pilot study. J Cosmetic Laser Ther. 2003;5(1):25-34.
12. Quatresooz P, Pierard-Franchimont C, Kharf M, Rustom KA, Chian CA. Skin in maturity: the endocrine and neuroendocrine Pathways. Int J Cosm Sci. 2007;29(1):1-6.
13. Boh EE, Millikan LE. Vesiculobullous diseases with prominent immunologic features. JAMA. 1992;268(20):2893-98.
14. Kadunce DP, Krueger GG. Pathogenesis of psoriasis. Dermatol Clin. 1995;13(4):723-37.
15. McDonagh AJ, Messenger AG. The pathogenesis of alopecia areata. Dermatol Clin. 1996;14(4):661-70.
16. Porter SR, Kirby A, Olsen I, Barrett W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;83(3):358-66.
17. Galli E, Cicconi R, Rossi P, Casati A, Brunetti E, Mancino G. Atopic dermatitis: molecular mechanisms, clinical aspects and new therapeutical approaches. Curr Mol Med. 2003;3(2):127-38.
18. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. Nat Rev Immunol. 2004;4(3):211-22.
19. mant Gde C, Velazquez Pereda Mdel C, Eberlin S, Nogueira C, Werka RM, Queiroz ML. Neuroimmunomodulatory compound for sensitive skin care: in vitro and clinical assessment. J Cosmet Dermatol. 2008;7(2):112-9.
20. West, MD. The cellular and molecular biology of skin aging. Arch Dermatol. 1994;130(1):87-95.
21. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol. 2002;138(11):1462-70.

22. Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol*. 2001; 26(7): 573-7.
23. 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(7): 592-99.
24. Pigeon H, Asselineau D. An *In Vitro* Approach to the Chronological Aging of Skin by Glycation of the Collagen - The Biological Effect of Glycation on the Reconstructed Skin Model. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043: 529-32.
25. Misery L. The neuro-immuno-cutaneous system and ultraviolet radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2000; 16(2): 78-81.
26. Montagner S, Costa A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. *Ar Bras Dermatol*. 2009; 84(3):263-9.
27. Meyne J, Ratliff R, Moyzis R. Conservation of the human telomere sequence (TTAGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(18):7049-53.
28. Yaar M, Eller MS, Gilchrist BA. Fifty years of skin aging. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2002;7(1):51-8.
29. Kosmadari MG, Gilchrist BA. The role of telomeres in skin aging/photoaging. *Micron*. 2004;35(3):155-9.
30. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(20):9363-7.
31. Yaar M, Gilchrist BA. Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. *Clin Geriatr Med*. 2001;17(4):617-30.
32. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(1):1-19.
33. Widmer R, Ziaja I, Grune T. Protein oxidation and degradation during aging: Role in skin aging and neurodegeneration. *Free Radic Res*. 2006;40(12):1259-68.
34. Kraft DC, Deacaris CC, Rattan SI. Proteasomal oscillation during mild heat shock in aging human skin fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1067:224-7.
35. Pereira S. Dermatoses no idoso. In: Rotta O. *Guia de Dermatologia: clínica, cirúrgica e cosmética*. São Paulo: Manole; 2008. p.567-91.
36. Bagatin E. Envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmecêuticos. *Boletim do Departamento de Dermatologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo. Ano V. Número 17. Jan/fev/mar 2008*.
37. Falanga V. *Growth factors: status and expectations*. In: Leaper DJ, ed. *International Symposium on Wound Management*. Medicom Europe BV, 1991: 87-93.
38. Rothe M, Falanga V. *Growth factors*. Their biology and promise in dermatologic diseases and tissue repair. *Arch Dermatol*. 1989; 125(10): 1390-8.
39. Martin P, Hopkinson-Woolley J, McCluskey J. *Growth factors* and cutaneous wound repair. *Prog Growth Factor Res*. 1992;4(1): 25-44.
40. Mansbridge, JN, Liu, K, Pinney, RE, Patch, R, Ratcliffe, A, Naughton, GK. *Growth factors* secreted by fibroblasts: role in healing diabetic foot ulcers. *Diabetes, Obesity Metab*. 1999, 1(5):265-79.
41. Naughton GK, Pinney E, Mansbridge J, Fitzpatrick RE. Tissue-engineered derived *growth factors* as a topical treatment for rejuvenation of photo-damaged skin. *Soc Invest Dermatol Poster*, 2001.
42. Kiritsy CP, Lynch SE. Role of *growth factors* in cutaneous wound healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4(5): 729-60.
43. Bennett NT, Schultz GS. *Growth factors* and wound healing: biochemical properties of *growth factors* and their receptors. *Am J Surg*. 1993; 165(6): 728-37.
44. Hussain M, Phelps R, Goldberg JD. Clinical, histologic, and ultrastructural changes after use of human growth factor and cytokine skin cream for the treatment of skin rejuvenation. *J Cosmet Laser Ther*. 2008; 10(2): 104-9.
45. Salven P, Orpana A, Teerenhovi L, Joensuu H. Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic *growth factors* VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma: a single-institution study of 200 patients. *Blood*. 2000; 96(12):3712-8.
46. Dawson TP, Wyllie FS, Wynford-Thomas D. *In vitro* responsiveness to serum *growth factors* is inversely related to *in vivo* malignancy in human thyroid epithelial cells. *Br J Cancer*. 1991;63(6):897-900.
47. Nagar D, Purohit GN. Effect of epidermal growth factor on maturation and fertilization *in vitro* of goat follicular oocytes in a serum free or serum supplemented médium. *Vet Archiv*. 2005;75 (6):459-67.
48. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by *Growth Factors* and Cytokines. *Physiol Rev*. 2003, 83(3): 835-70.
49. Yang HS, Shin J, Bhang SH, Shin JY, Park J, Im GI, et al. Enhanced skin wound healing by a sustained release of *growth factors* contained in platelet-rich plasma. *Exp Mol Med*. 2011; 43(11):622-9.
50. Clark RAF. Wound repair. Overview and general considerations. In: Clark RA, editor. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York: Plenum; 1996. p. 3-50.
51. Abraham JA, Klagsbrun M. Modulation of wound repair by members the fibroblast growth factor Family. In: Clark RA, editor. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York: Plenum; 1996. p. 195-248.
52. Edmonds M, Bates M, Doxford M, Gough A, Foster A. New treatments in ulcer healing and wound infection. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000;16 (Suppl 1): S51-S54.
53. Greenhalgh DG. The role of *growth factors* in wound healing. *J Trauma*. 1996; 41(1): 159-67.
54. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ*. 2002; 324(7330): 160-3.
55. Nath C, Gulati SC. Role of cytokines in healing chronic skin wounds. *Acta Haematol*. 1998; 99(3): 175-9.
56. Mehta RC, Fitzpatrick RE. Endogenous *growth factors* as cosmeceuticals. *Dermatol Ther*. 2007;20(5):350-9.
57. Fitzpatrick RE. Endogenous *Growth Factors* as Cosmeceuticals. In: Draelos DD, Dover JS, Alam M. *Cosmeceuticals*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.133-8.
58. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligel SE, Kang S, Fisher GJ, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol*. 2006;168(6):1861-8.
59. Ma B, Cheng DS, Xia ZF, Ben DF, Lu W, Cao ZF, et al. Randomized, multicenter, double-blind, and placebocontrolled trial using topical recombinant human acidic fibroblast growth factor for deep partial-thickness burns and skin graft donor site. *Wound Repair Regen*. 2007; 15(6):795-9.
60. Hong JP, Lee SW, Song SY, Ahn SD, Shin SS, Choi EK, et al. Recombinant human epidermal growth factor treatment of radiation-induced severe oral mucositis in patients with head and neck malignancies. *Eur J Cancer Care*. 2009;18(6): 636-41.
61. Traynor BJ, Buijn L, Conwit R, Beal F, O'Neill G, Fagan SC, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: systemic assessment. *Neurology*. 2006; 67(1): 20-7.
62. Sorenson EJ, Windbank AJ, Mandrekar JN, Bamlet WR, Appel SH, Armon C, et al. Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology*. 2008; 71(22):1770-5.