

ADRIA DO PRADO BARROS DE SOUZA

Influência da *L*-arginina na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

Brasília, 2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

ADRIA DO PRADO BARROS DE SOUZA

Influência da *L*-arginina na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

Orientadora: Maria de Fátima Borin

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte das exigências para obtenção do título de Doutorado.

Brasília  
2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ADRIA DO PRADO BARROS DE SOUZA

Influência da *L*-arginina na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília como parte das exigências para obtenção do título de Doutorado.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin  
Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni  
Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Michella Soares Coelho Araújo  
Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Bruna Rabelo Amorim  
Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra  
Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Carine Royer (suplente)  
Universidade de Brasília

*Aos meus amados pais, Francisco e Julinda,  
e ao meu amor, Thales Junior*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me guiar e me capacitar para chegar até aqui.

Aos meus queridos pais Francisco e Julinda por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças para correr atrás dos meus sonhos. Pelas infinitas orações e amor incondicional.

Ao meu amor, Thales Junior, por ser o que é. Por me acalmar nos momentos mais angustiantes, por me dar ânimo diante das dificuldades, por compreender a minha ausência, por se preocupar com a minha segurança e meu bem estar e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus sogros, Salomão e Bernardina, por me receberem como filha e me apoiarem nessa conquista.

A toda minha família e amigos que sempre me deram suporte e me apoiaram nessa etapa.

À minha orientadora, Dra. Maria de Fátima Borin, que a universidade me presenteou desde a graduação com seus ensinamentos científicos e de vida. Obrigada pela confiança, paciência, compreensão e principalmente pela sua amizade. Sem você nada disso teria acontecido.

Aos Professores Michella Soares Coelho Araujo, Carine Royer, Bruna Rabelo Amorim e Eliete Neves da Silva Guerra pelo apoio e ajuda na realização da pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica e amigos Rafael Lucas de Assis e Michelly Oliveira que me ofereceram uma ajuda preciosa durante toda a realização do projeto. Por toda dedicação, companheirismo e cumplicidade.

Aos meus amigos do laboratório Pedro Góes Mesquita, Laíza Magalhães, Daniela Gurgel, Natalia Santos e Karina Oliveira que me incentivaram e me deram forças em diferentes momentos da pesquisa.

A todos do Laboratório de Farmacologia Molecular, em especial ao professor Francisco de Assis Rocha Neves.

Aos meus amigos do Hospital Universitário de Brasília pelo incentivo e compreensão.

Ao Laboratório de Histopatologia Bucal, pela realização de algumas etapas da pesquisa. Em especial à professora Eliete Neves da Silva Guerra e Bruna Rabelo Amorim.

Ao Hospital das Forças Armadas pela contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), à Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro a este projeto e pela bolsa de doutorado.

Aos que não mencionei aqui, mas que me ajudaram de alguma forma durante as diferentes fases desse projeto.

Muito obrigada.

“A persistência é o menor caminho do êxito”  
(Charles Chaplin)

## RESUMO

O envelhecimento da pele em humanos é um processo complexo e pode ser induzido por fatores intrínsecos e extrínsecos. Uma das alterações observadas é a redução no número de fibroblastos que além de produzirem componentes da matriz extracelular, como diferentes tipos de colágeno, fibronectina e proteoglicanos, produzem também as metaloproteinases (MMP). No envelhecimento cronológico, o que se observa é um aumento dos níveis de MMP com a idade, uma menor taxa da síntese de colágeno e redução dos inibidores teciduais das MMP (TIMP), o que explica o aspecto flácido da pele envelhecida. Nesse estudo, a influência de diferentes concentrações de *L*-arginina na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos dérmicos humanos e, conseqüentemente, na elasticidade da pele foi avaliada. A *L*-arginina é o substrato da síntese de óxido nítrico, o qual pode estar envolvido na angiogênese, proliferação celular e na síntese de colágeno, uma vez que aumenta a expressão de *COL1A1*. Ao mesmo tempo, ela também pode ser precursora indireta da síntese de colágeno, atuando como fonte de prolina, componente da fibra de pró-colágeno. Para avaliar a influência da *L*-arginina na síntese de colágeno e, conseqüentemente, na elasticidade da pele, foram estudados a citotoxicidade desse ativo, a expressão gênica de *COL1A1*, *MMP-1* e *TIMP-1* por RT-PCRq, a síntese de colágeno, os níveis de glutatona reduzida e oxidada, a atividade da catalase e da superóxido dismutase, os níveis de metabólitos oxidativos gerados após os tratamentos e o efeito estimulante da *L*-arginina na síntese de colágeno via óxido nítrico sintase. Os resultados encontrados mostraram que a *L*-arginina não é citotóxica e que, nas concentrações de 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M e 6000  $\mu$ M, tende a induzir um aumento na expressão gênica e na síntese de colágeno. No entanto, na concentração de 6000  $\mu$ M foi observado um aumento da expressão de *MMP-1* e uma diminuição na expressão de *TIMP-1*. Por ser um doador de NO, o tratamento com a *L*-arginina aumentou os metabólitos oxidativos, mas em contrapartida as células aumentaram a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT), mantendo o estado redox das células, que foi observado através da relação entre glutatona reduzida e glutatona oxidada. Diante desses resultados e da possibilidade de utilizar a *L*-arginina como um ativo cosmético, foi iniciado o estudo de pré-formulação com a avaliação da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ C) e  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ C). No entanto, esses dois sistemas de inclusão aumentaram a atividade de MMP-2 e a HP $\beta$ C diminuiu a expressão de *COL1A1*. Portanto, a *L*-arginina se mostrou um excelente candidato a ativo cosmético, capaz de aumentar a síntese de colágeno em fibroblastos dérmicos humanos.

**Palavras-chave:** arginina, colágeno, metaloproteinases de matriz, inibidores teciduais de metaloproteinase, envelhecimento da pele.

## ABSTRACT

Skin aging in humans is a complex process and can be induced by intrinsic and extrinsic factors. One of the observed changes is a reduction in the number of fibroblasts that not only produce extracellular matrix components, such as different types of collagen, fibronectin and proteoglycans, but also produce metalloproteinases (MMPs). In chronological aging, it is observed an increase in MMP levels with age, a lower rate of collagen synthesis and reduction of tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), which explains the flaccid appearance of aged skin. In this study, it was evaluated the influence of different *L*-arginine concentrations in collagen synthesis, in cultured human dermal fibroblasts, and, consequently, in skin elasticity. *L*-arginine is the substrate for nitric oxide synthesis, which may be involved in angiogenesis, cell proliferation and collagen synthesis, since it increases the expression of *COL1A1*. Also, it can be an indirect precursor of collagen synthesis, acting as a source of proline, pro-collagen fiber component. To evaluate the effect of *L*-arginine on collagen synthesis and, consequently, on skin elasticity, cytotoxicity, *COL1A1*, *MMP-1* and *TIMP-1* gene expression by RT-qPCR, collagen synthesis, levels of reduced and oxidized glutathione, catalase activity and superoxide dismutase activity, levels of oxidative metabolites generated after treatment and the stimulating effect of *L*-arginine in collagen synthesis via nitric oxide synthase were studied. The results showed that *L*-arginine is not cytotoxic and at concentrations of 1000  $\mu\text{M}$ , 2500  $\mu\text{M}$  and 6000  $\mu\text{M}$  tends to lead to an increase in gene expression and synthesis of collagen. However, at concentration of 6000  $\mu\text{M}$  *L*-arginine induced an increase in *MMP-1* expression and a decrease in *TIMP-1* expression. Since it is a NO donor, treatment with *L*-arginine increased oxidative metabolites but, by the other hand, the cells increased the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), maintaining the redox state of cells, what was observed through the rate of reduced and oxidized glutathione. Considering these results, and the possibility of using *L*-arginine as an active cosmetic, the pre-formulation study was started by evaluation of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ C) and  $\beta$ -cyclodextrins ( $\beta$ C). However both the excipients increased MMP-2 activity and HP $\beta$ C promoted a decrease in *COL1A1* expression. In conclusion, *L*-arginine shown to be an excellent candidate to cosmetic active, once it was able to increase collagen synthesis in human dermal fibroblasts.

**Keywords:** arginine, collagen, matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinase, skin aging.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes celulares e extracelulares da pele jovem. ....	2
Figura 2. Fatores extrínsecos responsáveis pelo envelhecimento da pele. ....	6
Figura 3. Alterações observadas nos principais componentes da epiderme e da derme no envelhecimento intrínseco e extrínseco. ....	7
Figura 4. Síntese do colágeno em dois estágios. ....	9
Figura 5. Molécula de <i>L</i> -arginina. ....	19
Figura 6. Metabolismo da arginina no ciclo da ureia e no ciclo da óxido nítrico sintetase. ....	20
Figura 8. Avaliação da integridade do RNA extraído das culturas de fibroblastos tratadas com as soluções de <i>L</i> -arginina a partir das bandas 18S e 28S. ....	43
Figura 9. Curva padrão dos gene $\beta$ -ACTINA. ....	44
Figura 11. Curva padrão do gene <i>MMP-1</i> . ....	45
Figura 12. Curva padrão do gene <i>TIMP-1</i> . ....	46
Figura 13. Verificação da especificidade dos pares de <i>primers</i> a partir da curva de dissociação (curva de <i>melting</i> ) dos produtos de amplificação. ....	48
Figura 14. Expressão relativa do RNAm do <i>COL1A1</i> em fibroblastos dérmicos humanos tratados com <i>L</i> -arginina. ....	50
Figura 15. Expressão relativa do RNAm da <i>MMP-1</i> em fibroblastos humanos tratados com <i>L</i> -arginina. 51	
Figura 16. Expressão relativa do RNAm do <i>TIMP-1</i> em fibroblastos humanos tratados com <i>L</i> -arginina. ....	52
Figura 18. Quantificação de colágeno nas culturas de fibroblastos tratados com <i>L</i> -arginina e azul de metileno. ....	54
Figura 19. Concentração de GSH determinada no lisado dos fibroblastos tratados com diferentes concentrações de <i>L</i> -arginina. ....	55
Figura 20. Concentração de GSSG determinada no lisado de fibroblastos tratados com diferentes concentrações de <i>L</i> -arginina. ....	56

Figura 21. Relação GSH/GSSG nos fibroblastos tratados com as diferentes concentrações de <i>L</i> -arginina. ....	56
Figura 22. Avaliação da atividade da catalase em fibroblastos após o tratamento com as diferentes concentrações de <i>L</i> -arginina.....	57
Figura 23. Avaliação da atividade da superóxido dismutase em fibroblastos após o tratamento com as diferentes soluções de <i>L</i> -arginina. ....	58
Figura 24. Zimografia para avaliação da atividade de metaloproteinase (MMP).....	59
Figura 25. Densidade relativa da banda correspondente à MMP-2 ativa.....	59
Figura 26. Avaliação do estresse oxidativo através da fluorescência da diclorofluoresceína oxidada. ....	61
Figura 29. Avaliação da atividade de metaloproteinase (MMP) por zimografia.....	64
Figura 30. Densidade relativa da banda de pró-MMP-2 e da banda de MMP-2 ativa.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos <i>primers</i> usados na amplificação dos genes, <i>COL1A1</i> , <i>MMP-1</i> e <i>TIMP-1</i> .....	32
Tabela 2. Grau de pureza e concentração final das amostras de RNA extraídas das células tratadas ou não com <i>L</i> -arginina.....	42
Tabela 3. Grau de pureza e concentração final das amostras de RNA extraídas das células tratadas ou não com $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	42
Tabela 4. Parâmetros de validação obtidos no teste de eficiência do <i>primer</i> $\beta$ - <i>ACTINA</i> , <i>COL1A1</i> , <i>MMP-1</i> e <i>TIMP-1</i> . ....	47

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP-1	Proteína ativadora 1
ARG	Arginase
Bp	Pares de base
$\beta$ C	$\beta$ -ciclodextrina
CAT	Catalase
CAV-1	Caveolina 1
CD	Ciclodextrina
cDNA	DNA complementar
CGTase	Amilase ciclodextrina glicosiltransferase
<i>COL1A1</i>	Colágeno tipo I alfa-1
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CTRL	Grupo controle
CuZnSOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DCFoxi	2',7'-diclorofluoresceína oxidada
DEJ	Junções dermo-epidérmicas
DEPC	Solução de dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
E	Eficiência
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
F	<i>Primer forward</i> ( sense)
GPRC6A	Receptor acoplado a proteína G
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada

HFF	Fibroblastos humanos ( <i>Human Foreskin Fibroblast</i> )
HP $\beta$ CD	Hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina
Hsp	Proteína de choque térmico ( <i>Heat shock protein</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
JunK	Jun quinase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
M $\beta$ C	Metil- $\beta$ -ciclodextrina
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
MMP	Metaloproteinase de matriz
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NEM	N-etilmaleimida
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NOHA	N-hidroxi-L-arginina
NOS	Óxido nítrico sintetase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
OH $\cdot$	Radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OPA	Solução de o-ftalaldeído
PBS	Tampão fosfato de sódio e fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PPAR- $\gamma$	Proliferadores de peroxissomas gama
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
R	<i>Primer reverso</i> (antisense)
RER	Retículo endoplasmático rugoso
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR <sub>q</sub>	PCR em tempo real quantitativa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino

SOD	Superóxido dismutase
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tampão Tris/ Borato/ EDTA
TBS-T	Tampão Tris/Tween® 20
TCA	Ácido tricloroacético
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento $\beta$
Th	Linfócitos T auxiliar
TIMP	Inibidores fisiológicos de MMP
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
UV	Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. ENVELHECIMENTO EXTRÍNSECO E INTRÍNSECO DA PELE.....	1
1.2. COLÁGENO.....	8
1.3. SUPERÓXIDO DISMUTASE E CATALASE .....	12
1.4. METALOPROTEINASES DE MATRIZ.....	16
1.5. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	18
1.6. L-ARGININA.....	19
1.7. CICLODEXTRINA .....	23
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>27</b>
3.1. CULTURA DE CÉLULAS.....	27
3.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE L-ARGININA.....	28
3.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE $\beta$ -CICLODEXTRINA E HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA.....	28
3.4. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE DAS SOLUÇÕES DE L-ARGININA EM FIBROBLASTOS HUMANOS.....	29
3.5. EXTRAÇÃO DE RNA E VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>MMP-1</i> , <i>TIMP-1</i> E <i>COL1A1</i> POR RT-PCRq.....	29
3.6. QUANTIFICAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO NA CULTURA DE CÉLULAS.....	34
3.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO ESTIMULANTE DA L-ARGININA NA PRODUÇÃO DE COLÁGENO VIA ÓXIDO NITRICO.....	35
3.8. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA E OXIDADA NA CULTURA DE FIBROBLASTOS.....	35
3.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE .....	36
3.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE .....	37
3.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE METALOPROTEINASES.....	38
3.12. DETECÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR FLUORESCÊNCIA.....	38

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
4.1. ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE, <i>IN VITRO</i> , DAS SOLUÇÕES DE L-ARGININA EM FIBROBLASTOS HUMANOS.....	40
4.2. EXTRAÇÃO DE RNA E VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>COL1A1</i> , <i>MMP-1</i> E <i>TIMP-1</i> POR RT-PCR.....	41
4.3. ANÁLISE DO EFEITO DA SOLUÇÃO DE L-ARGININA, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, NA EXPRESSÃO GÊNICA DO <i>COL1A1</i> , <i>MMP-1</i> E <i>TIMP-1</i> .....	49
4.4. QUANTIFICAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO NA CULTURA DE CÉLULAS.....	52
4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO ESTIMULANTE DA L-ARGININA NA PRODUÇÃO DE COLÁGENO VIA ÓXIDO NITRICO.....	53
4.6. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E OXIDADA (GSSG) NA CULTURA DE FIBROBLASTOS.....	54
4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE.....	57
4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	58
4.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES (MMP) APÓS O TRATAMENTO COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA SOLUÇÃO DE L-ARGININA.....	58
4.10. AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR FLUORESCÊNCIA APÓS O TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA SOLUÇÃO DE L-ARGININA .....	60
4.11. ANÁLISE DO EFEITO DA $\beta$ -CICLODEXTRINA ( $\beta$ C) E HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA (HP $\beta$ C), NA EXPRESSÃO GÊNICA DO <i>COL1A1</i> .....	62
4.12. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES (MMP) APÓS O TRATAMENTO COM $\beta$ -CICLODEXTRINA E HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA.....	63
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>

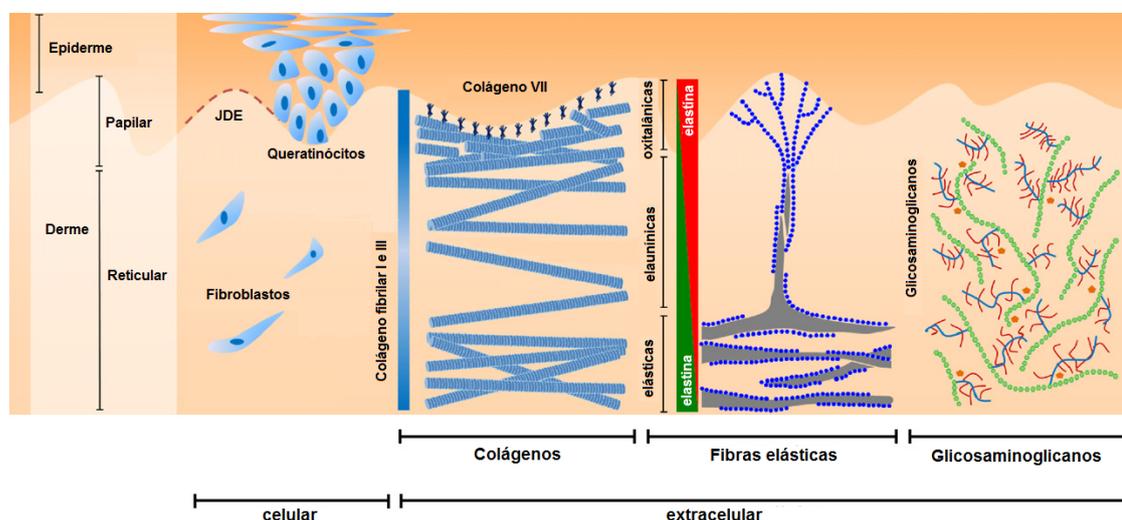
## 1. INTRODUÇÃO.

### 1.1. ENVELHECIMENTO EXTRÍNSECO E INTRÍNSECO DA PELE.

A pele é um órgão complexo e dinâmico que corresponde a 15% do peso total de um adulto, sendo considerada um dos maiores órgãos do corpo humano (EL-DOMYATI; MEDHAT, 2015; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009). Consiste em três camadas, epiderme, derme e hipoderme ou tecido subcutâneo. A epiderme é a camada mais externa da pele, avascularizada e constituída por epitélio estratificado pavimentoso, composto principalmente por queratinócitos (95%) e em menor quantidade por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (5%), e tem aproximadamente 100 µm de espessura (Figura 1). Além disso, a epiderme ainda pode ser dividida em quatro camadas, camada basal, que é a camada mais profunda e fica em contato com a derme, composta por uma única camada de células; a camada espinhosa, onde as junções celulares, desmossomas e junções aderentes começam a se formar; camada granulosa, onde os queratinócitos contêm grânulos com queratina; e por fim o estrato córneo, camada mais externa da epiderme que funciona como barreira ao ambiente externo, constituída por corneócitos, células sem núcleo e organelas citoplasmáticas (AL-NUAIMI; SHERRATT; GRIFFITHS, 2014; EL-DOMYATI; MEDHAT, 2015; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009; TOBIN, 2016; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

A derme é um tecido conjuntivo constituído de componentes intersticiais, como fibras de colágeno (75% do peso seco da derme), fibras elásticas (5% do peso seco da derme) e substância fundamental (proteoglicanos e glicoproteínas), e componentes celulares como fibroblastos, mastócitos, linfócitos, células dendríticas e histiócitos. A rede vascular da derme tem um papel importante na nutrição e termorregulação da epiderme. Sua espessura pode variar de 0,5 mm a 5 mm de acordo com a localização no corpo. Pode ser dividida em derme papilar, camada superior da derme rica em vasos sanguíneos e terminações nervosas sensoriais, e derme reticular, principal parte da derme em contato com o tecido subcutâneo (Figura 1). A hipoderme ou tecido subcutâneo é a camada mais interna da pele,

localizada abaixo da derme, composta por adipócitos que podem variar de acordo com o estado nutricional do indivíduo (EL-DOMYATI; MEDHAT, 2015; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009; VENUS et al., 2010).



**Figura 1. Componentes celulares e extracelulares da pele jovem.**

Epiderme avascular, rica em queratinócitos que são fixados à membrana basal por junções dermo-epidérmicas (DEJ). Derme vascularizada, com fibroblastos esparsos, que são predominantemente responsáveis pela síntese de colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos, componentes da matriz extracelular. Extraído de Naylor e colaboradores (2011).

Assim como os demais órgãos, a pele também sofre envelhecimento, o que resulta em alterações na sua estrutura e função. A idade média da população mundial no século XXI continua crescendo, principalmente nos países industrializados, e, junto com ela, cresce a preocupação em manter a juventude e descobrir novos procedimentos de rejuvenescimento (KAMMEYER; LUITEN, 2015). Os efeitos do envelhecimento na pele não são apenas estéticos, por funcionar como uma barreira entre o organismo e o ambiente e, assim, proteger a superfície corporal contra desidratação, infecções e lesões resultantes de agressões físicas, mecânicas ou químicas, o envelhecimento pode estar associado a diversas doenças dermatológicas, das quais algumas conferem consideráveis morbidade e mortalidade (AL-NUAIMI et al., 2014; GOSAIN; DIPIETRO, 2004; KAMMEYER; LUITEN, 2015; NIKOLAKIS; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2015).

O processo de envelhecimento da pele em humanos é um mecanismo complexo e pode ser induzido tanto por fatores intrínsecos, cronológicos,

consequente da passagem do tempo, como por fatores extrínsecos, ambientais, como exposição à radiação ultravioleta, tabagismo, má nutrição, consumo excessivo de álcool e poluição do ar. Esses dois fatores são separados em termos de etiologia e cada indivíduo apresenta um grau de envelhecimento extrínseco associado ao envelhecimento intrínseco subjacente, que acontece independente dos danos ambientais. Ambos apresentam alterações quantitativas e qualitativas de colágeno e fibras elásticas (AL-NUAIMI et al., 2014; EL-DOMYATI; MEDHAT, 2015; JENKINS, 2002; KAMMEYER; LUITEN, 2015; LEVAKOV et al., 2012; MAKPOL et al., 2011).

A teoria mais aceita para o mecanismo do envelhecimento intrínseco é a *teoria do envelhecimento dos radicais livres* também conhecida como *teoria do envelhecimento dos radicais livres mitocondriais* e *teoria do envelhecimento do estresse oxidativo* (LIOCHEV, 2015). Essa teoria está relacionada com o acúmulo das espécies reativas de oxigênio (ROS) que, nos seres humanos, resultam principalmente da interação das enzimas respiratórias do metabolismo aeróbio nas mitocôndrias e da ação da catalase sobre o peróxido de hidrogênio (KAMMEYER; LUITEN, 2015). Esse metabolismo oxidativo pode causar danos aos carboidratos, lipídeos, DNA e, conseqüentemente, alterações nas proteínas. O alvo mais susceptível à ação das ROS são os ácidos graxos poli-insaturados, e a peroxidação lipídica dos lipídeos da membrana celular pode acarretar na morte celular (CALLEJA-AGIUS; BRINCAT; BORG, 2013; HARMAN, 1955; LIOCHEV, 2015; PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005). Apesar da teoria do envelhecimento dos radicais livres ser uma teoria aceitável ela é apenas uma parte da teoria geral do envelhecimento, o estresse oxidativo causado por fatores ambientais também deve ser considerado no processo de envelhecimento, assim como a predisposição genética, o comprometimento das vias metabólicas celulares e as alterações hormonais qualitativas e quantitativas (LIOCHEV, 2013; NIKOLAKIS et al., 2015).

A geração de espécies reativas de oxigênio estimula a instalação de um processo inflamatório na pele, que desencadeia a ativação de fatores de transcrição que regulam a degradação proteolítica da matriz extracelular (ECM). Apesar de possuir um sistema de defesa antioxidante com enzimas capazes de converter as ROS em água e oxigênio molecular, como superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e catalase, esse sistema não é

totalmente eficiente. Portanto, com o passar do tempo, as células acumulam os danos oxidativos. Além disso, na pele envelhecida ocorre uma redução nos níveis dessas enzimas, o que intensifica o processo inflamatório. As ROS, além de estimular a expressão das metaloproteases de matriz (MMP) também estimulam a ativação da MMP inativa (pró-MMP) através da clivagem do resíduo de cisteína associado com o zinco do grupo ativo (PILLAI et al., 2005; YAAR; ELLER; GILCHREST, 2002).

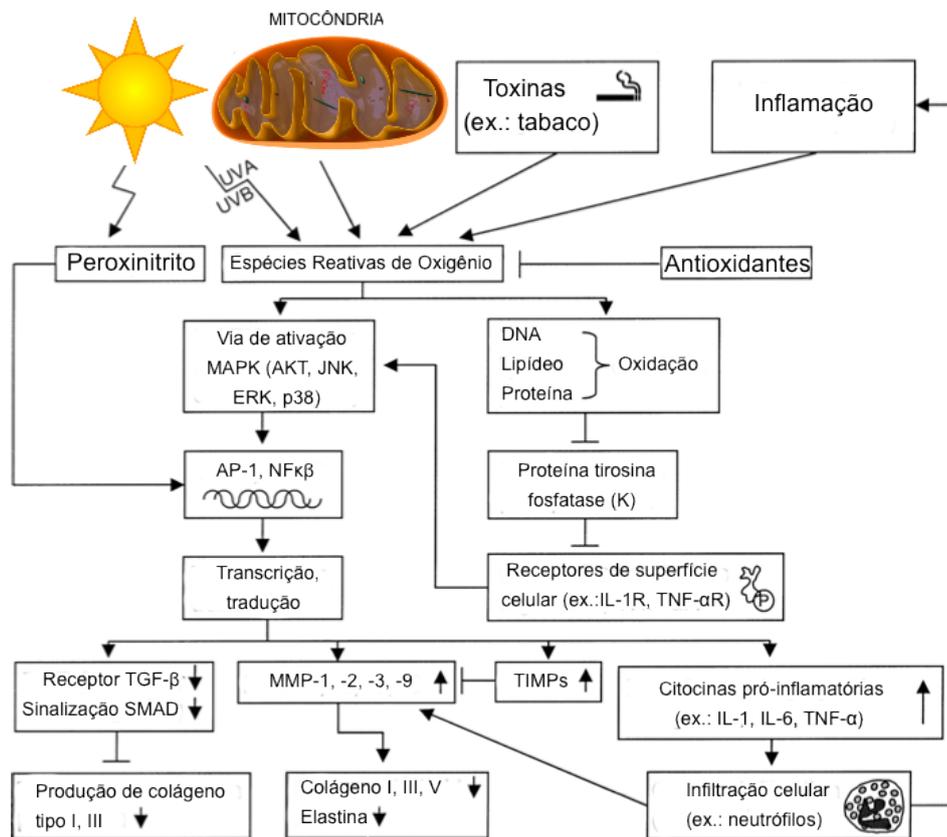
No envelhecimento intrínseco, o estrato córneo permanece relativamente inalterado, mas a epiderme e a derme sofrem uma atrofia resultante do achatamento das junções dermo-epidérmicas, da perda da elasticidade e da hidratação, desaceleração da atividade metabólica, decréscimo da capacidade proliferativa e biossintética das células cutâneas, diminuição da produção de matriz dérmica e aumento da expressão das collagenases, com um conseqüente adelgaçamento do tecido cutâneo, redução da vascularização e do número de fibroblastos (Figura 3) (JENKINS, 2002; LEVAKOV et al., 2012; MAKPOL et al., 2011; TOBIN, 2016).

Além de ser observada uma diminuição do número de fibroblastos, ocorre também uma diminuição na sua capacidade de sintetizar pró-colágeno tipo I quando comparados à pele jovem. A diminuição da tensão mecânica da pele pode aumentar a apoptose das células contribuindo, dessa forma, para a redução do número de fibroblastos. Além disso, tanto na pele envelhecida cronologicamente como na fotoenvelhecida há uma maior quantidade de colágeno parcialmente degradado. Isso sugere que os efeitos inibitórios desses fragmentos de colágeno se sobreponham ao declínio intrínseco da atividade sintética de colágeno. Com o aumento da idade a relação de colágeno tipo I e tipo III sofre modificações, a quantidade de colágeno tipo I é reduzida resultando em um aumento na proporção de colágeno tipo III. Os níveis de colágeno tipo IV e VII também sofrem alterações contribuindo para a formação das rugas (FISHER et al., 2002; TOBIN, 2016).

Os fatores extrínsecos estão relacionados à exposição a raios ultravioletas, traumas e doenças da pele (CHOI et al., 2013). A radiação ultravioleta (UV) e a exposição a poluentes também contribuem para a geração de ROS que estimulam o processo inflamatório na pele (PILLAI et al., 2005). Os efeitos agudos provocados pela radiação ultravioleta são reversíveis, mas as alterações crônicas degenerativas

se acumulam com o passar do tempo (WULF et al., 2004). Mais de 90% do envelhecimento visível da pele é consequência do fotoenvelhecimento e dos fatores extrínsecos responsáveis pelo envelhecimento, dentre eles a radiação UV é o principal fator (Figura 2) (EL-DOMYATI; MEDHAT, 2015; TOBIN, 2016). Uma única exposição à radiação UV provoca uma perda total ou parcial da síntese de pró-colágeno e essa perda permanece por 24 horas, se reestabelecendo apenas após um período de 48 a 72 horas. A radiação UV, além de inibir a síntese de pró-colágeno, também provoca a degradação do colágeno existente, resultando, dessa forma, numa diminuição do teor de colágeno. Na pele fotoenvelhecida, além da perda de colágeno tipo I e II na derme também ocorre uma perda de colágeno tipo VII nas junções dermo-epidérmicas (Figura 3) (AL-NUAIMI et al., 2014; QUAN et al., 2009).

Acredita-se que a radiação UV ative os receptores de membrana estimulando as vias de sinalização da MAP quinase (ERK, junk e p38). Após essa ativação ocorre um aumento da expressão dos fatores de transcrição c-jun e c-fos que, junto com outras proteínas, formam o fator de transcrição AP-1, que, em elevadas doses, induz a expressão das metaloproteinases, responsáveis pela degradação da matriz dérmica (Figura 2). Foi demonstrado que a radiação UVA induz a expressão de MMP-1 em fibroblastos dérmicos *in vivo* e MMP-1, 2 e 3 em cultura de fibroblastos, e que a radiação UVB induz a expressão de MMP-1, 8 e 13 (JENKINS, 2002; PILLAI et al., 2005).



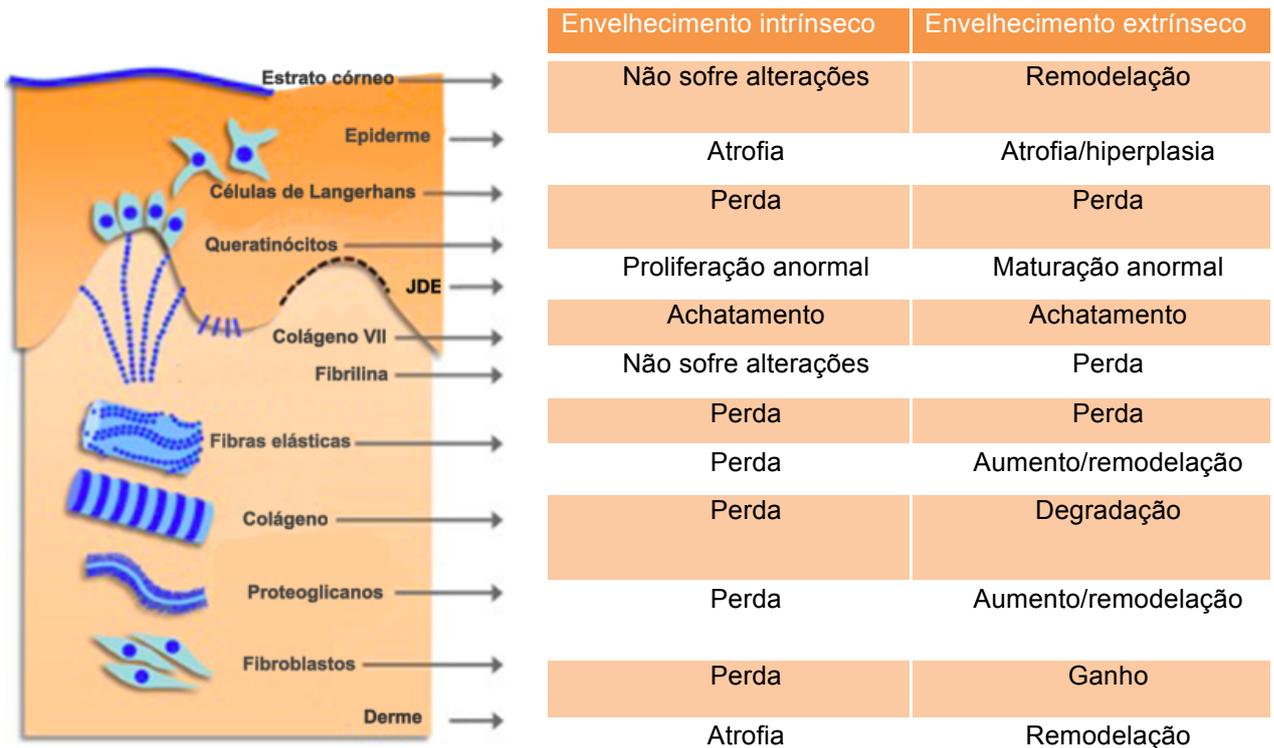
**Figura 2. Fatores extrínsecos responsáveis pelo envelhecimento da pele.**

A radiação UVA e UVB estimulam a produção de peroxinitrito e espécies reativas de oxigênio (ROS) que induzem a via MAPK, a qual promove a transcrição de MMPs ou a liberação de citocinas inflamatórias que ativam ainda mais a produção de MMP e de ROS. Além disso, reduzem a produção de pro-colágeno Tipo I e II. A radiação UV ainda pode provocar danos e alterar a estrutura molecular do DNA, lipídeos e proteínas. Extraído e adaptado de (SÁRDY, 2009).

Os sinais clínicos do fotoenvelhecimento são despigmentação, rugas profundas, alterações crônicas degenerativas incluindo sardas, nevos, queratoses, telangiectasia e neoplasias benignas ou potencialmente malignas (NIKOLAKIS et al., 2015; RHIE et al., 2001; TOBIN, 2016; WULF et al., 2004). Histologicamente, a principal alteração ocorre na derme, com fibras colágenas danificadas e desorganizadas e acúmulo maciço de material elástico amorfo, conhecido como “elastose solar” (EL-DOMYATI; MEDHAT, 2015; QUAN et al., 2009).

O envelhecimento é um fator crucial nas mudanças aparentes, fisiológicas e estruturais da pele, podendo-se observar mudanças quantitativas e qualitativas em relação aos principais componentes da pele, colágeno, que fornece as propriedades de tensão à pele, rede de fibras elásticas, que garante a elasticidade da pele e os

proteoglicanos, que estão relacionados com a hidratação e sinalização biológica. Em geral, o colágeno total da pele diminui com a idade. As principais alterações no envelhecimento extrínseco e intrínseco podem ser observadas na Figura 3 (AL-NUAIMI et al., 2014; JENKINS, 2002; MAKPOL et al., 2011; NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011; PATINO et al., 2002).



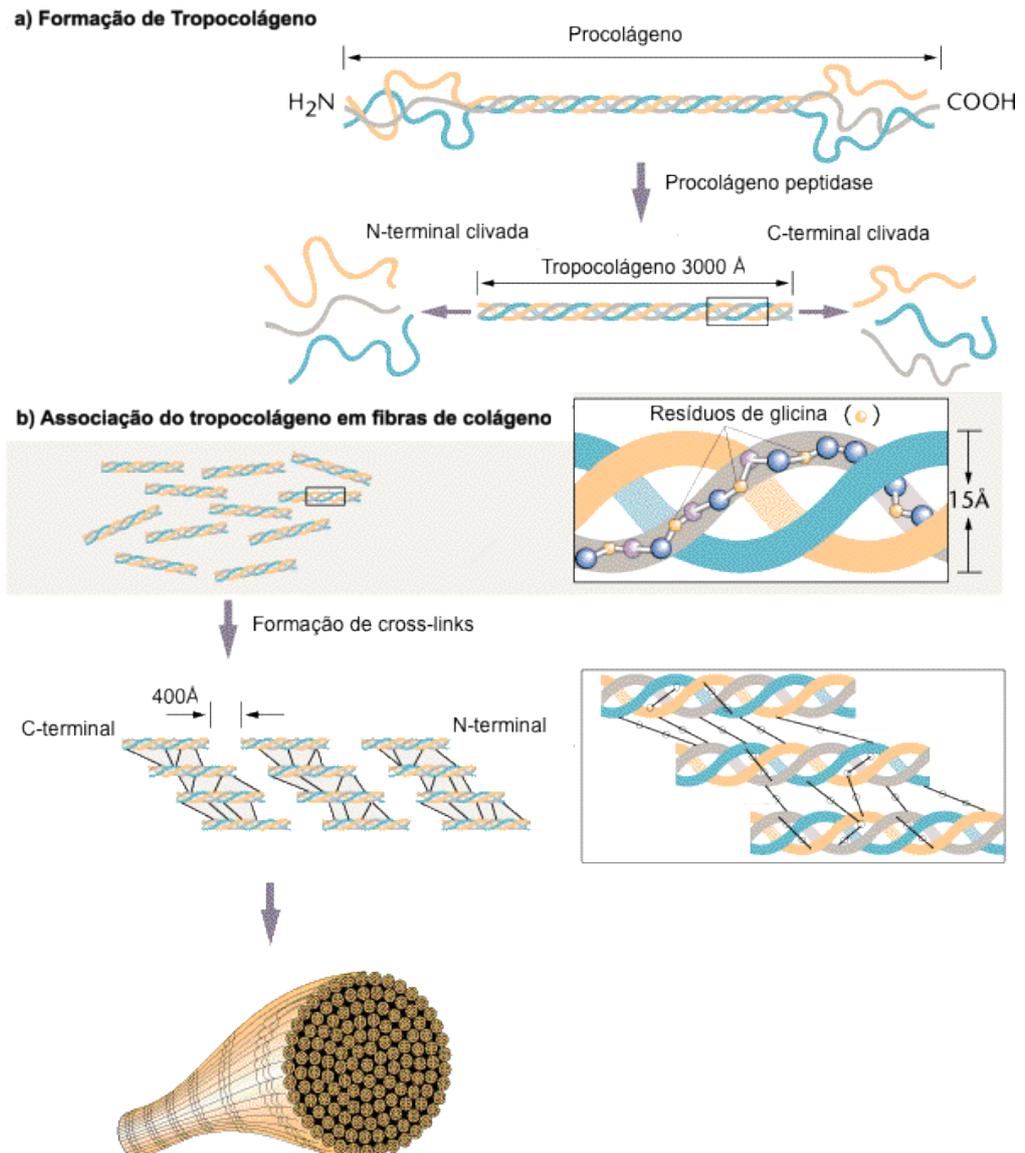
**Figura 3. Alterações observadas nos principais componentes da epiderme e da derme no envelhecimento intrínseco e extrínseco.**  
 Figura extraída de AL-NUAIMI et al. (2014).

Essas alterações explicam as adaptações bioquímicas e biomecânicas da pele com a idade. Para estudar o envelhecimento da pele é necessário, portanto, compreender as alterações estruturais e funcionais da pele com o passar do tempo e levar em consideração as diferenças das alterações do envelhecimento intrínseco e extrínseco e a taxa de envelhecimento entre as diferentes populações e entre as diferentes regiões anatômicas do corpo (KAMMEYER; LUITEN, 2015).

## 1.2. COLÁGENO.

A derme é constituída principalmente por dois tipos de fibras, o colágeno, que é a proteína mais abundante da derme (97,5%), e a elastina (2,5%) (CALLEJA-AGIUS et al., 2013; CHOI et al., 2013). O colágeno tipo I é o principal componente (80-85%), tem a função de garantir a integridade e a função estrutural da derme; o segundo tipo mais abundante é o colágeno tipo III (10-15%), que é responsável pelas propriedades elásticas da pele. Os colágenos tipo IV e VII estão localizados nas junções dermo-epidérmicas, sendo que a principal função do colágeno tipo VII é a ancoragem da epiderme à derme (EL-DOMYATI; MEDHAT, 2015; PHUONG; MAIBACH, 2015). O tamanho e o arranjo dessas fibras de colágeno distinguem as duas principais regiões da derme, a derme papilar, onde prevalece as fibras de colágeno tipo III, que são fibras curtas com diâmetro pequeno, interligadas frouxamente e orientadas de forma aleatória, e a derme reticular, constituída principalmente por fibras de colágeno tipo I, que possuem diâmetros maiores e são agrupadas, formando feixes que se orientam de forma paralela à pele (WULF et al., 2004).

O colágeno tem uma configuração de tripla hélice e quando se associa a pequenos proteoglicanos forma estruturas fibrilares chamadas feixes de colágeno (BAUMANN, 2007; HARRIS, 2009; HWANG; YI; CHOI, 2011). Sua síntese é feita pelos fibroblastos, que também são responsáveis pela produção dos demais principais componentes da matriz extracelular dérmica, fibras elásticas, proteoglicanos e oligossacarídeos. A síntese ocorre em dois estágios, envolvendo eventos intracelulares, que dão origem ao pró-colágeno, e extracelulares, que dão origem ao tropocolágeno, unidade básica do colágeno (Figura 4) (HARRIS, 2009; NAYLOR et al., 2011; PATINO et al., 2002).



**Figura 4. Síntese do colágeno em dois estágios.**

a) Formação do tropocolágeno: o pró-colágeno é formado no retículo endoplasmático rugoso (RER). No meio extracelular o pró-colágeno vai sofrer ação da pró-colágeno peptidase, que cliva os peptídeos de registro, permitindo a associação de várias molécula de pró-colágeno que dão origem ao tropocolágeno; b) Associação do tropocolágeno em fibras de colágeno. Extraído de (KLUG, 1997).

As fibras de colágeno possuem uma meia-vida de 17 anos e com o passar do tempo os fragmentos de colágeno se acumulam no organismo gerando algumas consequências na estrutura e função da pele (QUAN et al., 2009). Com o envelhecimento, o metabolismo dos fibroblastos é alterado, a meia-vida útil da célula é reduzida, bem como a sua capacidade de se dividir e produzir colágeno. Além disso, as fibras de colágeno remanescentes sofrem algumas alterações, apresentando feixes mais desorganizados. A elastina, apesar de permanecer

constante por toda a vida, também apresenta alterações na sua morfologia, o que acaba reduzindo a elasticidade da pele. Na pele fotoenvelhecida é observada uma maior proporção de colágeno tipo III e um material elastótico compacto (GOSAIN; DIPIETRO, 2004; LEVAKOV et al., 2012; WULF et al., 2004).

Atualmente são conhecidos pelo menos 30 genes de colágeno que se combinam para formar vinte e nove tipos de fibrilas de colágeno. Desses, mais de 14 tipos são responsáveis pela resistência da pele. Apesar de cada tipo possuir funções específicas, o colágeno tipo I é considerado o mais importante devido ao fato de ser o mais abundante e amplamente distribuído no organismo (EL-DOMYATI; MEDHAT, 2015; PHUONG; MAIBACH, 2015). Ele, assim como os tipos II, III, V e XI, é classificado dentro do grupo dos colágenos fibrilares, ou seja, formam fibras e fibrilas altamente organizadas que proporcionam um suporte estrutural para o corpo. Esse tipo de colágeno pode ser encontrado nos ossos, tendões, pele, ligamentos, artérias, útero e córnea (MAKPOL et al., 2011; PATINO et al., 2002).

Em cultura de fibroblastos da pele, os colágenos mais sintetizados são o do tipo I e o do tipo III, na razão de 3:1, e em menor quantidade o do tipo IV. Durante o envelhecimento, ocorre uma diminuição no número de fibroblastos da derme, um aumento na população de células senescentes e uma diminuição na expressão do número de genes que codificam proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno. Alguns resultados sugerem que essas mudanças observadas no conteúdo de colágeno extracelular durante o envelhecimento *in vitro* de fibroblastos podem resultar da diminuição da atividade de prolidase nessas células. A prolidase é a enzima que catalisa a etapa final da degradação de colágeno e, aparentemente, tem um papel importante na reciclagem de prolina para síntese de colágeno e para o crescimento celular (PAŁKA et al., 1996; SURAZYNSKI et al., 2008).

Os fibroblastos se ligam às fibras de colágeno intactas através das integrinas que estão acopladas ao citoesqueleto. As fibras de colágeno criam um estado de tensão mecânica com os fibroblastos e a derme. Essa tensão mecânica e a forma da célula são determinantes para a função celular. Na derme jovem de humanos os fibroblastos aparecem achatados e espalhados e estão em contato íntimo com inúmeras fibras de colágeno intacto. Em contraste, na derme envelhecida de humanos os fibroblastos aparecem com o citoplasma colapsado e necessitam de

uma associação direta com as fibras de colágeno fragmentadas. Análises morfológicas quantitativas revelaram que o contato dos fibroblastos com as fibras de colágeno reduzem 80% na derme envelhecida de humanos. O reduzido espalhamento de fibroblastos é indicativo da redução da tensão mecânica (FISHER et al., 2009).

Como dito anteriormente, as moléculas de colágeno são sintetizadas inicialmente como um precursor, o pró-colágeno. Na molécula de pró-colágeno estão os resíduos de prolina que sofrem hidroxilação pós-translacional pela prolil hidroxilase, dando origem aos resíduos de hidroxiprolina, aminoácidos constituintes do colágeno (BELLON et al., 1987). No retículo endoplasmático, a molécula de pró-colágeno tipo I se dobra e sofre modificações, passando à conformação de tripla hélice. A proteína Hsp47, proteína de choque térmico presente no retículo endoplasmático, atua estabilizando essa tripla hélice e direcionando essa molécula para o complexo de Golgi (OBAYASHI et al., 2006; TASAB; BATTEN; BULLEID, 2000; WIDMER et al., 2012).

A Hsp47 é uma chaperona que está presente em todas as células que sintetizam colágeno e seus níveis de expressão constitutiva estão estritamente relacionados com as quantidades de colágeno produzida pela célula. À temperatura fisiológica do corpo humano as moléculas de pró-colágeno e colágeno são termodinamicamente instáveis, logo, o colágeno secretado pelas células que possuem níveis reduzidos de Hsp47 estão mais susceptíveis à ação de proteases na região da tripla hélice (TASAB et al., 2000; WIDMER et al., 2012).

Bioquimicamente, um terço da molécula de colágeno é composto por glicina. Os próximos componentes em maior quantidade são a prolina e seu derivado hidroxiprolina que, juntos, formam 23% da molécula de colágeno. Como 99,8% da hidroxiprolina encontrada no corpo humano se encontra nas fibras de colágeno, esse aminoácido é um importante marcador para a quantificação total de colágeno. A única outra proteína em mamíferos que inclui a hidroxiprolina é a elastina (BARBUL, 2008; PHUONG; MAIBACH, 2015).

A prolina, usada para a biossíntese de colágeno em fibroblastos pode ser derivada de glutamina, glutamato ou ornitina. A ornitina pode ser sintetizada

localmente através do catabolismo da arginina pela arginase (ALBINA; ABATE; MASTROFRANCESCO, 1993; CALLEJA-AGIUS et al., 2013).

A arginase existe em duas isoformas, arginase-1 (ARG1), isoforma citosólica presente no fígado, e arginase-2 (ARG2), isoforma mitocondrial, presente nos rins, próstata, intestino delgado e mama (DEBATS et al., 2009). A fim de investigar o metabolismo da arginina em feridas pós-operatórias em humanos, Debats e colaboradores (2009) quantificaram a concentração de ARG1, por ELISA, e ARG2, por *Western blot*, no plasma e nos fluidos de ferida, além de avaliar a expressão de ARG1 e ARG2 por imunohistoquímica. Eles observaram que ARG1 estava em maiores concentrações nos fluidos de ferida e eram expressas em neutrófilos, enquanto que a ARG2 estava em maiores concentrações no plasma e foi observada em células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, macrófagos e neutrófilos (DEBATS et al., 2009)

Em alguns eventos, como processos de cicatrização de feridas, ocorre um decréscimo significativo no conteúdo de arginina livre no espaço extracelular e concentrações de ornitina seis vezes maiores do que no plasma. O acúmulo de ornitina no espaço da ferida pode ser visto como uma vantagem no processo de cicatrização, isso porque a ornitina é um metabólito precursor para a prolina e, assim, para a síntese de colágeno. Com efeito, foi demonstrado que o tamanho do *pool* de prolina determina a taxa da síntese de colágeno, e que a síntese local de prolina a partir de seus precursores metabólicos, como a ornitina, arginina, glutamato e glutamina, é reforçada em algumas circunstâncias, aparentemente para compensar a deficiência relativa da prolina pré-formada (BARBUL, 2008).

### 1.3. SUPERÓXIDO DISMUTASE E CATALASE

O organismo humano possui um sistema de defesa composto por um grupo de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase, peroxidases, enzimas antioxidantes específicas para tiol, e um grupo de compostos de baixo peso molecular como ácido ascórbico, glutathione,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -tocoferol, ácido úrico e

bilirrubina, que são capazes de eliminar diretamente ou indiretamente oxidantes resultantes de várias reações metabólicas (KOZINA et al., 2013; TURNES, 2014; WARNER, 1994).

Durante o metabolismo intracelular normal em mitocôndrias e peroxissomas, bem como durante a atividade de várias enzimas citosólicas, o metabolismo de xenobióticos e a exposição à radiação ionizante e ultravioleta, são produzidas continuamente várias espécies reativas de oxigênio, como ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH\cdot$ ), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). De todas essas ROS acredita-se que a maior parte da produção intracelular delas é proveniente das mitocôndrias, como produtos secundários da cadeia de transportes de elétrons no metabolismo aeróbio (BICKERS; ATHAR, 2006; FINKEL; HOLBROOK, 2000; KAMMEYER; LUITEN, 2015; KOZINA et al., 2013; WARNER, 1994).

Na pele, os principais produtores de ROS provenientes das mitocôndrias são os fibroblastos e os queratinócitos. Cerca de 1,5 a 5% de oxigênio que é consumido na pele é convertido em ROS (KAMMEYER; LUITEN, 2015). Em níveis adequados as ROS participam de vários processos fisiológicos como moléculas sinalizadoras na proliferação, reparo e diferenciação celular, expressão de metaloproteinases e síntese de pró-colágeno tipo I. No envelhecimento observa-se uma produção excessiva de ROS e, apesar do tecido possuir um sistema de defesa antioxidante eficiente, ele é incapaz de neutralizar os efeitos danosos de ROS e instala-se um desequilíbrio redox, resultando no estresse oxidativo. No envelhecimento extrínseco o equilíbrio redox pode ser afetado por vários fatores como a poluição ambiental, a exposição à radiação ultravioleta, aos conservantes de alimentos, medicamentos, cosméticos e vários outros produtos que desencadeiam uma redução significativa da expressão de enzimas antioxidantes no estrato córneo e na epiderme (Figura 2) (KOZINA et al., 2013).

Dentre os componentes enzimáticos e não enzimáticos que compõem o sistema antioxidante, a superóxido dismutase mitocondrial 2 (SOD2, MnSOD) merece uma atenção especial, uma vez que está localizada na matriz mitocondrial representando, dessa forma, o início da defesa antioxidante contra o superóxido

produzido durante a fosforilação oxidativa (KAMMEYER; LUITEN, 2015; TREIBER et al., 2012). Existem várias isoformas da SOD (EC 1.15.1.1) em toda biosfera, sendo que três delas são encontradas nos mamíferos e codificadas por três genes nucleares diferentes, SOD1, SOD2 e SOD3. A forma da SOD com cobre e zinco (CuZnSOD), que é encontrada no citoplasma celular e no espaço intermembranar da mitocôndria, a forma com manganês (MnSOD), de origem bacteriana encontrada na matriz mitocondrial, e uma forma extracelular que também contém cobre e zinco (SOD-CE). Apesar de serem codificadas por genes diferentes todas as SOD possuem o mesmo mecanismo de ação para converter o íon radical superóxido em peróxido de hidrogênio. Em todos os eventos de conversão, o íon metálico localizado no sítio ativo da enzima catalisa a transferência de elétrons entre as duas moléculas de  $O_2^-$  (KWON et al., 2012; TURNES, 2014).

Apesar do íon superóxido ter curta duração ele pode causar danos ao DNA, lipídeos e proteínas, além de reagir com outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Por isso a importância da SOD em converter o íon superóxido em peróxido de hidrogênio, que é um produto mais estável e que participa como molécula sinalizadora em vários processos e interações da matriz extracelular. Uma super expressão de SOD acaba resultando em um acúmulo de  $H_2O_2$  que, em situações de equilíbrio, é decomposto pela catalase. Em ensaios *in vitro* que super expressaram somente SOD2, observou-se um acúmulo de  $H_2O_2$  e a ativação de várias vias de sinalização e fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1), que aumentam a transcrição e ativação da collagenase intersticial (MMP-1) responsável pela degradação de colágeno, característica marcante do envelhecimento (TREIBER et al., 2012).

A exposição contínua à radiação UV altera a expressão de SOD1 e SOD2, além de diminuir a atividade das SOD. Por outro lado, um estudo mostrou que uma única exposição à radiação UV pode induzir a expressão de SOD2 em fibroblastos. Isso mostra que a intensidade e o tempo de exposição à radiação UV modulam o efeito sobre as SOD. A SOD3, por se localizar principalmente na matriz extracelular, tanto na derme quanto na epiderme e no estrato córneo, pode proteger diretamente

a pele contra a inflamação provocada pela radiação UV. Sendo assim, as três isoformas da SOD são fundamentais no equilíbrio redox do organismo humano.

As catalases (hidroperoxidases; E.C. 1.11.1.6) também fazem parte do sistema antioxidante e são responsáveis pela eliminação do  $H_2O_2$ . Essas enzimas podem ser classificadas em três grupos, o grupo das heme-catalases, também conhecidas como catalases típicas, que são encontradas em várias espécies de procariotos e eucariotos, o grupo das catalases peroxidases que são encontradas em fungos e plantas, e o grupo que está presente em algumas bactérias, neste o grupo heme é substituído por um dímero de manganês. A reação catalisada pela catalase é uma reação de dismutação, o substrato atua tanto como redutor quanto como oxidante. No grupo das heme-catalases, o grupo heme é o responsável pela atividade catalítica da reação (TURNES, 2014).

Nos mamíferos a localização da catalase varia de órgão para órgão, mas ela é encontrada principalmente nos peroxissomas (KAMMEYER; LUITEN, 2015). Diferente das SOD, dificilmente são encontradas nas mitocôndrias com exceção do tecido do coração. Além disso, a atividade dessas enzimas também varia de tecido para tecido. No tecido adiposo, por exemplo, os receptores ativados por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR- $\gamma$ ) induz a atividade de catalase. Já nos músculos de camundongos as catalases são induzidas por fatores nucleares específicos (TURNES, 2014).

No fotoenvelhecimento o equilíbrio redox do organismo pode ser modulado pela radiação UV resultando em uma diminuição significativa da expressão das enzimas antioxidantes na epiderme e no estrato córneo. Dados mostraram que queratinócitos e fibroblastos tratados com radiação UVA e UVB, ou expostos a  $H_2O_2$ , e amostras de pele com elastose, apresentaram um aumento significativo na oxidação de proteínas bem como uma diminuição na atividade da catalase. Isso mostra que no fotoenvelhecimento ocorre uma intensificação do processo oxidativo das proteínas causada por uma diminuição da atividade do sistema antioxidante (KOZINA et al., 2013).

#### 1.4. METALOPROTEINASES DE MATRIZ.

Os fibroblastos produzem também as metaloproteínases de matriz, que são endopeptidases, dependentes de  $Zn^{+2}$  e  $Ca^{+2}$ , que degradam as proteínas da matriz extracelular, sendo capazes de levar à degradação total de colágeno. Atualmente, são conhecidos 25 membros da família das metaloproteínases, sendo 24 expressas em células de mamíferos. São classificadas, de acordo com seu substrato específico, como colagenases, que são ativas contra colágeno fibrilar, gelatinases, específicas para gelatinas, e estromelísina, para os componentes da matriz extracelular não colagênicos (LINDNER et al., 2012; NISSINEN; KÄHÄRI, 2014; PENG et al., 2012; QUAN et al., 2009; VICEDO ORTEGA; VICEDO TOMEY, 2003).

As colagenases clivam o colágeno em locais específicos gerando fragmentos de 25 a 75 kDa, chamados gelatinas, que são degradados em aminoácidos ou oligopeptídeos pelas gelatinases. Um fator que influencia esse catabolismo é a presença de inibidores fisiológicos das MMP (TIMP). No envelhecimento cronológico, o que se observa é um aumento dos níveis de MMP com a idade, uma menor taxa da síntese de colágeno e redução dos TIMP, o que explica o aspecto flácido da pele envelhecida (LINDNER et al., 2012; VICEDO ORTEGA; VICEDO TOMEY, 2003). A fragmentação do colágeno se manifesta clinicamente como atraso da cicatrização, vascularização reduzida, propensão à contusão e pele delgada (FISHER et al., 2009).

Inicialmente as MMP são sintetizadas na forma de pró-enzimas, em níveis muito baixos, e transformadas na forma ativa com a remoção de um pró-peptídeo amino terminal. O pró-peptídeo mantém a enzima na forma latente através da interação do resíduo de cisteína no peptídeo com o zinco no sítio ativo da enzima. Sua ativação pode ser pela ação de agentes caotrópicos, clivagem do pró-peptídeo por outras MMP ou por outros tipos de proteases (PENG et al., 2012; PILLAI et al., 2005; VU; WERB, 2000).

Por serem capazes de degradar os componentes da matriz extracelular, acredita-se que a principal função das MMP esteja relacionada à remodelação da ECM, além de influenciar outras funções celulares. As MMP podem degradar

moléculas da ECM e permitir a migração celular, alterando um fenótipo adesivo para um fenótipo não-adesivo; alterar o microambiente da ECM e, conseqüentemente, alterar um comportamento celular, levando a célula para um processo de apoptose, proliferação ou morfogênese; e modular a atividade de moléculas biologicamente ativas, por clivagem, liberando sítios de ação ou modulando a atividade de seus inibidores (PENG et al., 2012).

Dessa forma, as MMP estão envolvidas em vários processos patológicos e fisiológicos relacionados com a matriz extracelular, como cicatrização, angiogênese e câncer (FISHER et al., 2009). Acredita-se que quatro em particular sejam importantes na degradação da matriz da pele. As ações combinadas da colagenase (MMP-1, 42 kDa e 48 kDa), gelatinase (MMP-2, 72 kDa), gelatinase (MMP-9, 92 kDa) e da estromelina 1 (MMP-3, 57 kDa), são capazes de degradar os colágenos da pele e a rede elástica (CALLEJA-AGIUS et al., 2013; JENKINS, 2002; KAMMEYER; LUITEN, 2015; PILLAI et al., 2005; QUAN et al., 2009; ZAGUE et al., 2011).

As colagenases são as únicas proteases de células de mamíferos capazes de hidrolisar fibras colágenas intactas. Na pele humana são expressas três tipos de colagenases, as MMP-1, 8 e 13. As fibras de colágeno inicialmente clivadas pela colagenase podem ser degradadas por MMP-2 e MMP-9. A atividade simultânea de MMP-2, 3 e 9 pode ainda resultar na degradação de outros componentes da matriz extracelular, como proteoglicanos e glicoproteínas (KAMMEYER; LUITEN, 2015; PILLAI et al., 2005).

Espécies reativas de oxigênio induzidas por UVA e UVB podem induzir o aumento da expressão de MMP e a redução de TIMP (KAMMEYER; LUITEN, 2015). Estudos demonstraram que uma única dose de radiação UV aumenta a atividade das MMP-1, 3 e 9, as quais são reguladas pelo fator de transcrição da proteína ativadora 1 (AP1), que é induzido e ativado por radiação UV. Em experimentos feitos com a pele das nádegas, submetidas à radiação UV, foi possível observar, por radioimunoensaio de telopeptídeos de ligação cruzada, que 24 horas após uma exposição à radiação UV, houve um aumento de 58% de colágeno degradado na pele (JENKINS, 2002). Assim, a radiação UV pode agravar o envelhecimento cronológico, uma vez que aumenta a expressão das MMP na pele

envelhecida, que já apresenta uma menor expressão de TIMP e de genes que codificam componentes da matriz extracelular, como colágeno e elastina (JENKINS, 2002; KAMMEYER; LUITEN, 2015; PILLAI et al., 2005).

## 1.5. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

As citocinas inflamatórias estão diretamente envolvidas na síntese de colágeno e modelação da EMC. Durante a fase proliferativa do processo de cicatrização, por exemplo, os fibroblastos, sob estímulos do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), sintetizam colágeno que é depositado na EMC, super expressam MMP e há uma diminuição na expressão dos TIMP. Em estudos feitos com a suplementação de *L*-arginina, foi demonstrado que a *L*-arginina funciona como um doador de óxido nítrico no processo de cicatrização. Nesse processo a *L*-arginina pode ser metabolizada por duas vias, a via da arginase e a via da óxido nítrico sintetase (NOS). São os fatores de crescimento e as citocinas inflamatórias que determinam qual via prevalece sobre a outra (STECHMILLER; CHILDRESS; COWAN, 2005).

A ativação de iNOS ou arginase reflete no tipo de resposta inflamatória específica para cada processo fisiopatológico. As citocinas inflamatórias, como interleucina 1 e 2 (IL-1 e IL-2), TNF- $\alpha$  e interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), os linfócitos T auxiliar 1 (Th1) e as endotoxinas estimulam a via da iNOS. Já a arginase nas células mielóides é induzida por linfócitos T auxiliar 2 (Th2), citocinas como IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e prostaglandinas. O TGF- $\beta$ , além de estimular a via da arginase, é um potente inibidor da via de iNOS, contribuindo, dessa forma, para uma maior síntese de prolina e, conseqüentemente, de colágeno (OBAYASHI et al., 2006; POPOVIC; ZEH; OCHOA, 2007; STECHMILLER et al., 2005).

As metaloproteinases podem afetar diretamente ou indiretamente a atividade de várias citocinas pró-inflamatórias. A forma latente do TGF- $\beta$  pode ser clivada pelas MMP-3, 9 e 14, resultando no TGF- $\beta$  ativo *in vivo*. O precursor da IL-1 $\beta$  pode ser clivado e ativado por MMP-2, 3 e 9, no entanto, esta forma ativa da IL-1 $\beta$  pode

ser degradada pela MMP-3. O TNF- $\alpha$  é outra citocina pró-inflamatória regulada pelas metaloproteinases, podendo ser ativada *in vitro* pelas MMP-1, 2, 3, 9 e 17 (NISSINEN; KÄHÄRI, 2014).

Como dito anteriormente, a radiação UV, além de inibir a síntese de pró-colágeno, também provoca a degradação do colágeno existente. Um dos mecanismos para esse processo é a indução do fator de transcrição AP-1 pela radiação UV. O fator de transcrição AP-1 bloqueia os efeitos do fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), principal proteína pró-fibrótica (FISHER et al., 2002). O TGF- $\beta$ 1, por sua vez, é estabilizado por NO e super regula a expressão de Hsp47 e colágeno tipo I em fibroblastos e osteoblastos (OBAYASHI et al., 2006).

Dessa forma, as citocinas inflamatórias são importantes determinantes na via predominante de metabolismo da arginina. A maior expressão de determinadas citocinas pode indicar por qual via de metabolismo a arginina foi principalmente metabolizada e as suas consequências na síntese de colágeno.

#### 1.6. L-ARGININA.

A L-arginina (Figura 5) é um aminoácido semi-essencial ou condicionalmente essencial, constituinte de várias proteínas do corpo humano. Além disso, é o substrato da síntese de óxido nítrico e está, portanto, indiretamente envolvido em muitos mecanismos regulatórios importantes, tais como angiogênese, proliferação celular, síntese de colágeno e epitelização (MORRIS, 2004; RAYNAUD-SIMON et al., 2012; SHI et al., 2003).

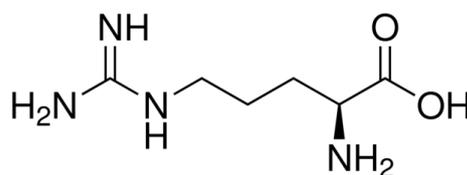


Figura 5. Molécula de L-arginina.

Possui um metabolismo bastante versátil, podendo ser metabolizada pela arginase, formando ureia e ornitina, pela óxido nítrico sintetase (NOS), sendo que um dos produtos desta via metabólica é o óxido nítrico (Figura 6), pela *L*-arginina:glicina amidinotransferase e pela arginina descarboxilase. Além de servir como substrato para as enzimas que participam desses ciclos, a *L*-arginina se auto regula seletivamente, de uma forma dependente da concentração das várias enzimas que participam do seu metabolismo (GREENE et al., 2013; MORRIS, 2004).



**Figura 6. Metabolismo da arginina no ciclo da ureia e no ciclo da óxido nítrico sintetase.**

Enzimas envolvidas em cada ciclo: 1) arginase; 2) ornitina carbamoiltransferase; 3) argininosuccinato sintase; 4) argininosuccinato liase; 5) óxido nítrico sintetase.

Existem três isoformas para a enzima NOS, a NOS endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS), e duas isoformas para a arginase, a tipo I que é citosólica e a tipo II, mitocondrial. Das enzimas que participam do metabolismo da *L*-arginina, as mais estudadas são a iNOS e arginase I. Essas duas enzimas se expressam simultaneamente em várias condições inflamatórias e, por terem o mesmo substrato, pode haver uma competição entre elas. Dessa forma, a atividade da arginase pode limitar a produção de NO pela iNOS. Já no ciclo do NO, ocorre a liberação de N-hidroxi-*L*-arginina (NOHA), que é um potente inibidor natural da arginase. Sendo assim, o efeito inibitório da NOS na atividade da arginase é mais pela ação da NOHA que pela limitação de substrato (MORRIS, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que a arginina pode melhorar a cicatrização, uma vez que ela tem papel na síntese de proteínas, na deposição de colágeno, na proliferação celular e na função dos linfócitos T. Durante a inflamação ou infecção há uma elevada expressão de arginase, que, além de reduzir a síntese de NO, estimula a síntese de prolina através do aumento de ornitina. A ornitina através da ação da ORN- $\gamma$  aminotransferase é convertida para semialdeído  $\gamma$ -glutâmico, que é o *link* para a síntese de prolina, um dos componentes da fibra de colágeno. Já foi demonstrado que pacientes suplementados com arginina apresentaram um aumento significativo no teor de hidroxiprolina, um indicador de acúmulo e deposição de colágeno, quando comparados com os pacientes que não receberam a suplementação de arginina (MORRIS, 2004; RAYNAUD-SIMON et al., 2012; SHI et al., 2003).

Naturalmente, a L-arginina é ingerida em nossas dietas numa taxa de 3 a 6 g/dia. Alguns alimentos são ricas fontes de L-arginina como carnes, nozes e proteínas de soja (GREENE et al., 2013; POPOVIC et al., 2007). Em condições normais o organismo humano sintetiza a arginina em quantidades suficientes para garantir a sustentação da massa muscular e do tecido conjuntivo, mas em condições de estresse ou lesão, maturação de órgãos e desenvolvimento, provavelmente em quantidades insuficientes (BARBUL, 2008; FUJIWARA et al., 2014). Endogenamente, a L-arginina, é a única fonte direta para a síntese de NO, dessa forma uma deficiência desse aminoácido pode resultar em um deficiente processo de angiogênese, proliferação celular e síntese de colágeno (RAYNAUD-SIMON et al., 2012).

Xia e colaboradores (2006) demonstraram que o óxido nítrico pode aumentar a síntese de colágeno em células de tendão humano *in vitro*, e que esses resultados podem explicar, em parte, os efeitos benéficos dos doadores de NO em modelos animais e durante o tratamento de tendinopatias em ensaios clínicos em humanos. Chu e Prasad, 1999, mostraram que havia uma correlação inversa significativa do nível de NO com a produção de colágeno, sugerindo o envolvimento da sinalização de NO na modulação da produção de colágeno. Alguns estudos já demonstraram a contribuição da L-arginina na cicatrização de feridas, via NO, o qual está relacionado à síntese de colágeno nos fibroblastos. No entanto os mecanismos moleculares

envolvidos nesse processo são pouco conhecidos (FUJIWARA et al., 2014). Animais com *diabetes mellitus* que normalmente apresentam uma deficiência no processo de cicatrização e um nível reduzido de NO no local da ferida, ao receberem tratamento com *L*-arginina apresentaram uma melhora no processo de cicatrização, um aumento nos níveis de nitrito e nitrato no fluido da ferida, aumento de RNAm de pró-colágeno I e III e aumento da síntese de colágeno (SCHÄFFER et al., 1996; SHI et al., 2003; WITTE; KIYAMA; BARBUL, 2002). A fim de entender como os doadores de NO aumentam a síntese de colágeno, Obayashi e colaboradores (2006) avaliaram os efeitos desses doadores na expressão da chaperona Hsp47 e os resultados demonstraram um aumento dos níveis dessa proteína, sugerindo um possível mecanismo para o aumento da síntese de colágeno pela ação de NO exógeno (OBAYASHI et al., 2006).

Um dos eventos que envolve o processo de cicatrização é a migração e proliferação de fibroblastos. Várias vias intracelulares e intercelulares são ativadas para coordenar esse evento de migração e proliferação, uma das vias é a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). Fujiwara e colaboradores (2014) mostraram que a suplementação com *L*-arginina estimulou a proliferação de fibroblastos via ativação do GPRC6A, receptor acoplado à proteína G, juntamente com a ativação das vias ERK1/2-CREB e PI3K/Akt. A ERK1/2 é um tipo de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) que tem um importante papel nos processos de proliferação, diferenciação, desenvolvimento, transformação e apoptose celular. Mostraram também que a privação de *L*-arginina favoreceu a apoptose. Esses resultados sugerem que a *L*-arginina, além de estimular a proliferação de fibroblastos, apresenta efeitos anti-apoptóticos (FUJIWARA et al., 2014).

Apesar dos inúmeros estudos nos processos de cicatrização, ainda não há na literatura estudos que demonstrem a utilização via administração tópica de *L*-arginina em pele íntegra para melhorar ou prevenir os efeitos do envelhecimento cutâneo.

## 1.7. CICLODEXTRINA

Uma vez que a proposta era utilizar a *L*-arginina como um ativo cosmético, e diante da dificuldade de se preparar formulações tópicas estáveis com este aminoácido, devido ao seu pH básico e a sua facilidade em sofrer oxidação e hidrólise, foi cogitada a hipótese de produção de complexos de inclusão de *L*-arginina em ciclodextrinas.

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose. O fato de poderem incluir moléculas em sua cavidade e não serem tóxicas aos seres humanos tornou esses compostos altamente interessantes para a química supramolecular. Atualmente as CD são amplamente utilizadas em vários ramos industriais, como a indústria farmacêutica, alimentícia, têxtil, hospitalar e agroquímica. Elas são produzidas em alta escala a partir da degradação enzimática do amido pela amilase ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19), que é naturalmente excretada pelo *Bacillus macerans*. Os produtos desta degradação podem ter seis, sete ou oito moléculas de açúcar formando um anel de,  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina e  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente (CRINI, 2014; DAVIS; BREWSTER, 2004; KURKOV; LOFTSSON, 2013).

As características físico-químicas e biológicas das ciclodextrinas são semelhantes às das dextrinas lineares, mas, por possuírem uma estrutura cíclica, as ciclodextrinas são de 3 a 5 vezes mais resistentes à hidrólise não enzimática. A  $\alpha$ -ciclodextrina é aproximadamente 1,5 vez mais estável e a  $\gamma$ -ciclodextrina é 1,5 vez menos estável que a  $\beta$ -ciclodextrina, no entanto essa estabilidade pode ser significativamente melhorada com a formação de complexos de inclusão. No geral, as formulações farmacêuticas utilizam mais a  $\beta$ -ciclodextrina que, apesar de serem menos solúveis, possuem baixo preço e são facilmente produzidas (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

Embora sejam solúveis em água, as moléculas de CD possuem uma cavidade apolar o que permite a formação de um microambiente hidrofóbico. Essa característica das CD permite que elas incorporem as porções hidrofóbicas de certas substâncias garantindo a solubilidade delas em meio aquoso. Além da capacidade de modificar e melhorar a solubilidade de certas substâncias, a CD também pode

melhorar a estabilidade dessas moléculas (CRINI, 2014; DAVIS; BREWSTER, 2004).

Um grande grupo de CD tem sido sintetizado para ser utilizado em formulações farmacêuticas como sistemas de liberação de fármacos. Essas novas estruturas estão sendo desenvolvidas para melhorar a biodisponibilidade de alguns fármacos (CRINI, 2014).

As  $\beta$ -ciclodextrinas têm alta afinidade por esteróis quando comparada a outros lipídeos e isso pode tornar esses compostos altamente eficazes nas possíveis modificações do metabolismo do colesterol *in vivo*. Vários estudos demonstraram a capacidade das  $\beta$ -ciclodextrina em estimular o efluxo de colesterol em várias culturas celulares. O mecanismo que permite as  $\beta$ -ciclodextrina remover o colesterol das membranas está relacionado com a sua capacidade em reduzir a energia de ativação do efluxo de colesterol pelas moléculas aceptoras ricas em fosfolipídios. Essa redução da energia necessária em estimular o efluxo de colesterol está relacionado com a capacidade da  $\beta$ -ciclodextrina de se incorporar na membrana plasmática e permitir que o colesterol seja introduzido na cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -ciclodextrina sem a necessidade de ser transportada até as partículas de HDL ou lipossomas de fosfolipídios por uma fase aquosa intermediária (CHRISTIAN et al., 1997).

O colesterol regula a flexibilidade e a estabilidade mecânica da membrana plasmática e desempenha um papel importante na montagem dos microdomínios de membrana, como as jangadas lipídicas e as cavéolas. Dessa forma, alterações no teor de colesterol podem afetar a localização e a função de proteínas associadas a esses microdomínios de membrana. A função do colesterol no envelhecimento ainda está sendo estudada mas já se sabe que o nível de colesterol intracelular pode estar relacionado com a expressão da metaloproteinase de matriz. Em estudos realizados por Kim e colaboradores (2010), foi observado que a depleção de colesterol em cultura de fibroblastos tratados com metil- $\beta$ -ciclodextrina ativou ERK1/2 e JNK, aumentou a fosforilação de c-jun e c-fos, estimulou a proteína ativadora 1 (AP-1) e aumentou a expressão de MMP-1, e esta fosforilação foi inibida com a reposição de colesterol. Dessa forma, o colesterol pode ser um importante regulador negativo da expressão de MMP-1 em fibroblastos da derme humana (KIM; HAN; et al., 2010).

Kim e colaboradores também mostraram em outro estudo que a depleção de colesterol pode influenciar na expressão do inibidor de metaloproteinase de matriz 2 (TIMP-2) e na ativação da pró-MMP-2. A ativação da pró-MMP-2 é mediada por TIMP-2 e essa relação é controlada pelos níveis de colesterol na célula. Eles mostraram que a depleção de colesterol em fibroblastos tratados com metil- $\beta$ -ciclodextrina aumentou a fosforilação de MAPK, ERK e JNK que resultou na indução de TIMP-2 que, por sua vez, converteu pró-MMP-2 em MMP-2 ativa (KIM; OH; et al., 2010).

A metil- $\beta$ -ciclodextrina que é sintetizada por uma metilação randômica da  $\beta$ -ciclodextrina, além de deprimir o colesterol também rompe a cavéola devido a sua atividade anti-CAV-1. A caveolina 1 (CAV-1) é uma proteína da membrana plasmática essencial para a formação da cavéola e desempenha um papel importante na senescência celular. Em fibroblastos dérmicos senescentes observa-se um aumento de CAV-1 e a sua super expressão por vez induz o envelhecimento celular prematuro. Existe uma relação conflitante entre a expressão de CAV-1 e a expressão de colágeno, a CAV-1 tem um papel de “freio” na expressão de colágeno na derme ou em fibroblastos dérmicos e um papel acelerador na super regulação de colágeno 1 (COL-1) via TGF- $\beta$  em fibroblastos dérmicos ou camundongos transgênicos. Lee e colaboradores (2015) confirmaram a correlação negativa entre CAV-1 e COL-1 e mostraram que a metil- $\beta$ -ciclodextrina super regula a expressão de COL-1 e inibe a expressão de CAV-1 na pele de camundongos e em fibroblastos humanos (LEE et al., 2015).

Diante disso, ao utilizar as ciclodextrinas como meio de inclusão para alguns fármacos, principalmente visando um efeito antienvelhecimento é importante observar os efeitos dela e de seus derivados na expressão de colágeno e de metaloproteinase de matriz.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da *L*-arginina na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos e, conseqüentemente, na elasticidade da pele.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Estabelecer a cultura de fibroblastos humanos provenientes do prepúcio.
- Avaliar a citotoxicidade da *L*-arginina em cultura de fibroblastos por MTT.
- Isolar o RNA total e quantificar a expressão gênica de *COL1A1*, *MMP-1* e *TIMP-1* nas culturas de fibroblastos tratadas ou não com *L*-arginina por RT-PCRq.
- Quantificar a síntese de colágeno na cultura de fibroblastos.
- Avaliar o efeito estimulante da *L*-arginina na produção de colágeno via óxido nítrico.
- Avaliar os níveis de glutathiona reduzida e oxidada nas culturas de fibroblastos tratadas ou não com *L*-arginina.
- Avaliar a atividade de superóxido dismutase e catalase nas culturas de fibroblastos tratadas ou não com *L*-arginina.
- Avaliar a atividade proteolítica de metaloproteinases após o tratamento com as soluções de *L*-arginina ou  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina por zimografia.
- Avaliar a influência da *L*-arginina na geração de espécies reativas de oxigênio.
- Isolar o RNA e quantificar a expressão gênica de *COL1A1* nas culturas de fibroblastos tratadas ou não com  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina por RT-PCRq.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. CULTURA DE CÉLULAS.

##### 3.1.1. Cultura de fibroblastos humanos.

As células utilizadas nos ensaios, fibroblastos dérmicos humanos (HFF), foram cultivados em placas de 40 x 10 mm (TPP®, Sigma-Aldrich) em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 3.1.2. Cultura primária.

O isolamento de fibroblastos foi feito a partir de prepúcio humano (*Human Foreskin Fibroblast* – HFF) de pacientes adultos saudáveis que foram submetidos à cirurgia de postectomia (MORAVVEJ et al., 2009). A cultura de fibroblastos foi estabelecida a partir da morfologia fusiforme característica dessas células que apresentam citoplasma ramificado com núcleo elíptico.

Houve o consentimento dos pacientes através da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, ANEXO 1) em doar a pele que seria descartada após a cirurgia e aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Forças Armadas (CEP/HFA), CAAE: 36534914.0.3001.0025 (ANEXO 2). A postectomia foi realizada no Hospital das Forças Armadas e, logo após o ato cirúrgico, a pele foi armazenada em tubo Falcon estéril contendo meio DMEM, com 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e estreptomicina e 1% de anti-anti (antibiótico e antimicótico, Gibco®). Posteriormente, em condições de esterilidade, a pele foi processada em uma câmara de fluxo laminar e a cultura primária foi estabelecida através da técnica do explante de tecido (COURA, 2004). O tecido foi lavado uma vez com o DMEM acrescido de SFB, antibióticos e anti-anti e, em seguida, duas vezes com uma solução de PBS (tampão fostato de sódio e potássio, 1M, pH 7,4, com 0,8% de NaCl e 0,02% de KCl) acrescido de 1% de anti-anti.

Após as lavagens a pele foi fragmentada, com a ajuda de uma pinça e um bisturi estéril, em pedaços menores e fixados com a ajuda de uma lamínula e meio DMEM acrescido de 20% de SFB em placas de Petri de 40 x 10 mm de diâmetro. O

meio de cultura foi trocado a cada três dias na primeira semana e a cada dois dias na semana seguinte. Com o crescimento das células a partir dos fragmentos de tecido, os fragmentos de pele e a lamínula foram retirados e a placa foi cultivada e replicada. Depois, uma placa de 40 x 10 mm foi tratada com tripsina e as células recolhidas foram inoculadas em uma placa de 100 x 20 mm (TPP®, Sigma-Aldrich) em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e foram incubadas a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C.

Os experimentos foram feitos entre a quarta e a décima passagem das células.

### 3.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE L-ARGININA.

As soluções de *L*-arginina foram preparadas na capela de fluxo laminar, com água destilada e autoclavada, nas concentrações de 800 µM, 1000 µM, 2500 µM e 6000 µM. Essas concentrações foram baseadas na concentração fisiológica de *L*-arginina no organismo de 50 a 200 µM (ZANI; BOHLEN, 2005) e na concentração de *L*-arginina presente no meio de cultura DMEM utilizado para cultivar as células, que é de aproximadamente 400 µM.

### 3.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE β-CICLODEXTRINA E HIDROXIPROPIL-β-CICLODEXTRINA.

As soluções de β-ciclodextrina (Kleptose/Batch: E1048 - βC) e Hidroxipropil-β-ciclodextrina (Kleptose HPB parenteral grade/ E0237 - HPβC) foram preparadas na capela de fluxo laminar com meio DMEM nas concentrações de 1 mM e 2 mM. Essas concentrações foram baseadas nas concentrações de metil-β-ciclodextrina que super regularam a expressão de colágeno e diminuíram a expressão de CAV-1 nos estudos realizados por Lee e colaboradores (LEE et al., 2015).

### 3.4. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DAS SOLUÇÕES DE L-ARGININA EM FIBROBLASTOS HUMANOS.

A viabilidade celular, e a citotoxicidade das soluções de L-arginina, foi determinada segundo o método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). No ensaio de MTT, as desidrogenases presentes nas mitocôndrias das células viáveis são capazes de clivar o anel de tetrazólio presente no sal brometo de MTT, de coloração amarelada, e formar os cristais de formazana, de coloração azulada. Dessa forma, a quantidade de células viáveis é proporcional à quantidade de cristais de formazana produzida (MOSMANN, 1983). Foi utilizada uma placa de 96 poços e, em cada poço, foram semeadas 10 mil células com 50 µL de meio DMEM e 50 µL da solução de L-arginina nas variadas concentrações, exceto nos poços utilizados como controle que continha somente o meio de cultura com as células e, ao invés do tratamento, foi colocado 50 µL de água destilada e autoclavada. Após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato – PBS) em todos os poços e a placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Após o período de incubação foram adicionados, a cada poço, 100 µL de solução de HCl 0,04 M em isopropanol, para a dissolução do sal de formazana (solução reveladora de MTT). A placa foi deixada em agitação por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, a absorbância foi medida a 570 nm. A comparação foi feita entre os valores de absorbância obtidos nos poços do controle e nos poços que receberam o tratamento com L-arginina.

### 3.5. EXTRAÇÃO DE RNA E VALIDAÇÃO DOS *PRIMERS* PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP-1*, *TIMP-1* E *COL1A1* POR RT-PCRq.

#### 3.5.1. Extração de RNA.

Para a extração de RNA total todas as vidrarias foram tratadas com solução de dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% (*overnight*) e depois foram esterilizadas em autoclave. As pipetas e a bancada foram descontaminadas com Rnase-Zap

(*Applied*) e as ponteiras utilizadas eram livres de Rnase e com filtro. Todos esses cuidados foram tomados para evitar a contaminação e degradação do RNA total.

A extração do RNA total das amostras de fibroblastos foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após as 72 h de tratamento das placas incubadas com as soluções de L-arginina nas concentrações de 800 µM, 1000 µM, 2500 µM e 6000 µM, e 24h de tratamento das placas incubadas com as soluções de β-ciclodextrina ou hidroxipropil-β-ciclodextrina a 2 mM ou 1 mM, o meio de cultura foi removido das placas, estas foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e transferidas para um banho de gelo. Foram adicionados 2 mL do reagente TRIzol® em cada placa e as células foram recolhidas com auxílio de um raspador de células em um microtubo. Às células recolhidas, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio, a mistura foi agitada em vórtex e foi mantida por 3 minutos em temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9878 *xg* por 15 minutos a 4°C. Após este processo, a mistura foi separada em três fases: a fase fenólica (inferior), uma interface proteica e uma fase aquosa superior, onde se encontrava o RNA. A fase superior foi transferida para um microtubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol para promover a precipitação do RNA. As amostras foram agitadas em vórtex e mantidas por 10 minutos em TA. Após este período foi realizada uma centrifugação a 9878 *xg* por 10 minutos a 4°C e o isopropanol foi descartado. 1 mL de álcool etílico a 75%, gelado foi adicionado para lavagem do *pellet*, e as amostras foram novamente centrifugadas a 4082 *xg* por 5 minutos a 4°C. A solução de álcool etílico a 75% foi descartada e os microtubos foram mais uma vez centrifugados a 4082 *xg* por 1 minuto a 4°C para a retirada do restante de álcool etílico. O RNA extraído foi dissolvido em água tratada com inibidor de RNase, DEPC a 0,1%.

A concentração e pureza do RNA total extraído foram avaliadas com auxílio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare Life Sciences). A quantificação foi realizada por medida das absorvâncias das amostras obtidas nos comprimentos de onda de 260 nm, específico para quantificação de ácidos ribonucleicos, e 280 nm, específico para quantificação de proteínas, e a contaminação das amostras por proteína foi avaliada através da razão das absorvâncias a 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). As amostras foram consideradas

apropriadas quando o valor obtido para a razão  $A_{260}/A_{280}$  estava entre 1,7 e 2,2.

A integridade do RNA extraído foi avaliada através do ensaio de eletroforese em gel de agarose a 1%, para visualização das bandas 18S e 28S do RNA ribossômico. O tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,1 M, pH 8, foi utilizado na corrida e a tensão aplicada foi de 90 V. Ao término da eletroforese, as bandas do gel foram visualizadas em transiluminador sob luz UV.

### 3.5.2. Tratamento do RNA extraído com a enzima desoxirribonuclease (Dnase) I.

As amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNase I (Sigma-Aldrich) com o objetivo de remover contaminação por DNA genômico. Alíquotas das amostras de RNA total, contendo 0,09 µg de RNA, foram diluídas em um volume final de 8 µL de água deionizada tratada com DEPC, ao qual foram adicionados 1 µL de tampão de reação (Tris/HCl 200 mM, pH 8,3, contendo 20 mM de MgCl<sub>2</sub>) e 1 µL de DNase I. As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. A enzima DNase I foi inativada através da adição de 1 µL de tampão de inativação (50 mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA) e por aquecimento a 70°C por 10 minutos.

### 3.5.3. Desenho dos *primers*.

As sequências dos *primers*, *forward* (F) e *reverse* (R), dos genes do colágeno tipo I, alfa-1 (*COL1A1*), metaloproteinase de matriz tipo 1 (*MMP-1*) e inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz tipo 1 (*TIMP-1*) foram obtidas a partir do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o programa BLAST. Os seguintes critérios foram adotados para a escolha das sequências dos *primers*: i) tamanho em torno de 20 nucleotídeos, ii) conteúdo de guanina e citosina (GC) entre 50 e 60%, iii) temperatura de anelamento dos pares próxima e em torno de 60°C, e iv) tamanho do produto de amplificação menor que 200 pares de base (bp). A especificidade dos *primers* foi avaliada por simulação computacional no site do *UCSC Genome Browser Home* ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)) usando o programa *In-Silico* PCR. Os *primers* foram produzidos pela *Integrated DNA Technologies* (IDT, USA) (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos *primers* usados na amplificação dos genes, *COL1A1*, *MMP-1* e *TIMP-1*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'→3')</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Tamanho (pares de bases)</b>
<b><i>COL1A1_F</i></b>	CCCCGAGGCTCTGAAGGTC	61,73	
<b><i>COL1A1_R</i></b>	GGAGCACCATTGGCACCTTT	61,19	131
<b><i>MMP-1_F</i></b>	AGAAAGAAGACAAAGGCAAGTTGA	59,05	
<b><i>MMP-1_R</i></b>	CTGAGCCACATCAGGCACTC	60,74	166
<b><i>TIMP-1_F</i></b>	GAATGCACAGTGTTTCCCTGTTT	60,18	
<b><i>TIMP-1_R</i></b>	GTCCGTCCACAAGCAATGAG	59,20	72

Legenda: Temperatura de *Melting* (Tm); primer *forward* (F); primer *reverse* (R).

#### 3.5.4. Validação dos *primers*

A curva de eficiência relativa dos *primers* foi construída com o objetivo de validar a eficiência de cada par de *primers* para a reação de RT-PCRq (*Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*), e estabelecer a concentração adequada de RNA total a ser utilizada nas reações. A quantidade inicial de RNA total utilizada foi de 20 ng para os *primers* dos genes de *MMP-1* e *TIMP-1*, e de 10 ng para os *primers* do gene de *COL1A1*. As amostras foram diluídas com fator de diluição 5 para construção da curva dos *primers* dos genes de *MPP-1* e *TIMP-1*; 4,5 µL das diluições foram utilizados nas reações, o que correspondeu a quantidades de RNA de 20 ng; 4 ng; 0,8 ng; 0,16 ng e 0,032 ng. As diluições para construção da curva dos *primers* do *COL1A1* foram realizadas com fator de diluição 2; 4,5 µL das diluições foram utilizados nas reações, o que correspondeu a quantidades de RNA de 10 ng; 5 ng; 2,5 ng; 1,25 ng e 0,625 ng. As amostras foram submetidas ao ensaio de transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativa no equipamento *Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR Systems*.

As eficiências dos *primers* dos genes de *COL1A1*, *MMP-1* e *TIMP-1* foram comparadas com a eficiência dos *primers* do gene constitutivo,  $\beta$ -*ACTINA*, a fim de estabelecer o método adequado de quantificação da expressão gênica. A inclinação angular da reta (*slope*), obtida através da equação de regressão linear, foi utilizada para calcular a eficiência dos *primers*, de acordo com a seguinte equação:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} \times 100$$

A avaliação da especificidade dos *primers* foi feita através da curva de dissociação dos produtos de amplificação de cada par de *primers*.

### 3.5.5. Quantificação relativa

O ensaio de transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativa foi realizado em um único passo com a utilização do kit *Power SYBR®Green RNA-to-CT™1-Step (Applied Biosystems)*, com o objetivo de quantificar a expressão dos genes *COL1A1*, *MMP-1*, *TIMP-1* e  $\beta$ -*ACTINA* nas amostras tratadas ou não com *L*-arginina, e *COL1A1* e  $\beta$ -*ACTINA* nas amostras tratadas ou não com ciclodextrinas.

As reações foram realizadas com volume final de reação de 20  $\mu$ L, sendo 15,5  $\mu$ L de uma mistura composta por *Power SYBR®Green*, enzima transcriptase reversa (RT), *primers forward* e *reverse* (5 pMol. $\mu$ L<sup>-1</sup>), e 4,5  $\mu$ L da amostra de RNA total, que continham 5 ng de amostra. As condições de reação utilizadas nos experimentos foram: 30 minutos a 48°C para realização da reação de transcrição reversa; 10 minutos a 95°C para ativação da enzima DNA polimerase; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento do *primer* e extensão. A curva de dissociação foi construída através de ciclos de dissociação, 15 segundos a 95°C; anelamento, 15 segundos a 60°C; e dissociação, 15 segundos a 95°C.

Os valores de  $C_t$  (*threshold cycle*), ciclo no qual o sinal de fluorescência ultrapassa a linha de base, obtidos ao final da RT-PCRq, foram utilizados no cálculo da quantificação relativa da expressão gênica, utilizando a seguinte fórmula:

$$QR = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Onde:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{amostra}}} - \Delta C_{t_{\text{controle}}}$$

$$\Delta C_{t_{\text{amostra}}} = C_{t_{\text{gene alvo}}^a} - C_{t_{\beta\text{-ACTINA}}}^a$$

$$\Delta C_{t_{\text{controle}}} = C_{t_{\text{gene alvo}}}^c - C_{t_{\beta\text{-ACTINA}}}^c$$

$C_{t_{\text{controle}}}^c$  =  $C_t$  da amostra de RNA extraído das células do controle.

Ct<sup>a</sup> = Ct das amostras de RNA extraídas dos fibroblastos humanos tratadas com as soluções de *L*-arginina, soluções de β-ciclodextrina ou hidroxipropil-β-ciclodextrina.

As amostras de RNA total utilizadas nos ensaios de RT-PCRq foram também submetidas a este ensaio sem utilização da enzima transcriptase reversa com o objetivo de identificar contaminação das amostras por DNA genômico.

### 3.6. QUANTIFICAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO NA CULTURA DE CÉLULAS.

A quantificação da síntese de colágeno foi feita a partir de uma reação de precipitação cromogênica entre o colágeno e o corante *Sirius Red* seguida da mensuração espectrofotométrica da biossíntese dessa proteína. O *Sirius Red* é um corante que se liga especificamente à estrutura helicoidal do colágeno fibrilar (tipo I a V).

O tratamento das células com as soluções de *L*-arginina foi realizado em placas de cultura de 100 x 20 mm com 80 a 90% de confluência. As células foram tratadas por 72 h com soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800 μM, 1000 μM, 2500 μM e 6000 μM. Ao término deste período, o meio de cultura foi recolhido para a quantificação da síntese de colágeno. Uma solução aquosa saturada de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25%) foi adicionada ao meio de cultura recolhido e, após agitação constante por 24h a 4°C, o meio foi centrifugado a 10500 *xg* por 1 h a 4°C. O *pellet* foi ressuscitado em ácido acético 0,5 M e a 100 μL desse sobrenadante foi adicionado 950 μL de *Direct Red*. O volume total foi agitado em vórtex por 5 minutos e depois foi mantido por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período a amostra foi novamente centrifugada 10500 *xg* a 4°C por 10 minutos e o *pellet* foi dissolvido em 1 mL de hidróxido de potássio 0,1 N. Após 15 minutos, a leitura da absorbância da solução foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

### 3.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO ESTIMULANTE DA L-ARGININA NA PRODUÇÃO DE COLÁGENO VIA ÓXIDO NITRICO.

Os fibroblastos foram cultivados em placa de 35 mm de diâmetro, em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, até atingirem uma confluência de 80-90%. Após esse período, as placas foram tratadas com soluções de L-arginina na concentração de 1000  $\mu$ M e ou solução de azul de metileno 12,5 mM por 24h. A concentração do azul de metileno, sequestrante de NO, foi baseado nos estudos de Obayashi e colaboradores (OBAYASHI et al., 2006).

Após o tratamento, o meio de cultura foi recolhido e a quantificação da síntese de colágeno foi feita pela precipitação com o corante *Sirius Red* como descrito anteriormente.

### 3.8. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA E OXIDADA NA CULTURA DE FIBROBLASTOS.

Para avaliação da influência da L-arginina no *status* redox das células (fibroblastos) foi determinada a quantidade relativa das formas de glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG). Os fibroblastos foram cultivados em placa de 35 mm de diâmetro, em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, até atingirem uma confluência de 80-90%. Após esse período, as placas foram tratadas com soluções de L-arginina nas concentrações de 800  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M ou 6000  $\mu$ M. Uma das placas foi tratada com meio DMEM, utilizada como grupo controle (CTRL). Após a incubação por 72 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> as células foram avaliadas quanto ao nível intracelular de GSH, segundo o método descrito por Hissin e Hilf com algumas modificações (HISSIN; HILF, 1976).

As células foram recolhidas em PBS e centrifugadas a 2684 xg por 7 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em água gelada e submetido a 3 ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 0°C para promover a lise das células. Para cada mililitro da solução foi adicionado 200  $\mu$ L de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 30%. As soluções foram submetidas à centrifugação a 2684 xg por 6 minutos a 4°C e depois a 16770 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante

resultante foi utilizado para avaliar os níveis de GSH e GSSG.

Para determinação de GSH, as amostras foram colocadas em uma placa de 96 poços e a elas foram adicionados o tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA, e a solução de o-ftalaldeído (OPA) 1 mg/mL, reagente fluorescente que se liga ao grupo tiol da glutatona livre produzindo um derivado altamente fluorescente. Após 15 minutos de reação foi feita a leitura da fluorescência a 350 nm para excitação e 420 nm para emissão. Para determinação dos níveis de GSH presentes nas amostras foi necessário utilizar a equação de regressão linear da curva de calibração obtida plotando-se concentração de GSH padrão (mM) *versus* unidades de fluorescência.

No caso da GSSG, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos com N-etilmaleimida (NEM). O NEM é um agente capaz de bloquear o grupo tiol da molécula de glutatona impedindo dessa forma que a glutatona endógena oxide durante o ensaio, e para que isso ocorra o pH do meio reacional deve estar alcalino (pH 12) (BANSAL; JASWAL, 2009; HISSIN; HILF, 1976). Após esse tratamento, as amostras foram aliqüotadas em uma placa de 96 poços e a elas foram adicionados NaOH 0,1 N e a solução de o-ftalaldeído 1 mg/mL. Após 15 minutos de reação foi feita a leitura da fluorescência a 350 nm para excitação e 420 nm para emissão. A intensidade de fluorescência produzida pela reação de OPA-GSSG a pH 12 é diretamente relacionada à concentração de GSSG (BANSAL; JASWAL, 2009).

### 3.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE

Os fibroblastos foram inoculados na concentração de  $3 \times 10^5$  células em cada poço de uma placa de 6 poços, que foi incubada por 24 h para permitir a adesão celular. As células foram tratadas por 72 h com soluções de L-arginina nas concentrações de 800  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M ou 6000  $\mu$ M. Ao término deste período, as células foram recolhidas para o ensaio de avaliação da atividade da enzima catalase.

A conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular pela enzima catalase foi medida por acompanhamento da diminuição da absorbância do

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no comprimento de onda de 240 nm (AEBI, 1984).

Os fibroblastos dérmicos humanos tratados como descrito anteriormente, foram recolhidos e submetidos a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 0°C para obtenção do lisado celular. Uma solução 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8. Uma alíquota de 100 µL do lisado celular foi adicionada a uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro, que foi realizada no modo cinético, por 2 minutos, no comprimento de onda de 240 nm.

### 3.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

A avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase, responsável por converter o ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-·</sup>) em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), foi realizada pelo método bioquímico que utiliza o sistema xantina/xantina oxidase como fonte de O<sub>2</sub><sup>-·</sup>. A redução do reagente *Nitroblue Tetrazolium* (NBT), com a consequente formação de cristais de formazan, foi utilizada para medir a formação do ânion radical superóxido. A enzima SOD compete com o NBT pelo O<sub>2</sub><sup>-·</sup>, desta forma, a quantidade de SOD presente na amostra é medida pela porcentagem de inibição da redução do NBT.

O tratamento das células com as soluções de *L*-arginina foi realizado em placas de cultura de 100 x 20 mm com 80 a 90% de confluência. As células foram tratadas por 72 h com soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800 µM, 1000 µM, 2500 µM ou 6000 µM. Ao término deste período, as células foram recolhidas para o ensaio de avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase.

Os fibroblastos dérmicos humanos foram recolhidos e submetidos a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 0°C para obtenção do lisado celular. Uma solução de NBT na concentração de 60 µM e xantina na concentração de 100 µM foi preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo 0,1 mM de EDTA. Foi adicionado 850 µL da solução de NBT 60 µM e xantina 100 µM a 100 µL do lisado celular e da solução de SOD. A enzima xantina oxidase (0,075 U/mL) foi adicionada às amostras no momento imediatamente anterior à

leitura da absorbância em espectrofotômetro, que foi realizada no modo cinético, por 5 minutos, no comprimento de onda de 560 nm.

### 3.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE METALOPROTEINASES.

A avaliação da atividade proteolítica das metaloproteinases foi realizada através do ensaio de zimografia. O meio de cultivo das células tratadas com as diferentes soluções de *L*-arginina,  $\beta$ C 2 mM ou HP $\beta$ C 2 mM foi recolhido e centrifugado por 10 minutos a 3046 *xg* para remoção de restos celulares.

O gel de acrilamida foi composto por 5 cm de gel de separação a 10%, adicionado de 1% de gelatina, e um gel de concentração a 5%.

A eletroforese foi realizada com tampão de corrida Tris/Glicina 25 mM, pH 8,3, contendo 0,1% de SDS. O gel foi submetido a uma pré-corrída de 15 minutos com tensão de 100 V antes da aplicação das amostras. Estas foram diluídas na razão de 1:1 em tampão Tris/HCl 0,1M, pH 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, e 0,001% de azul de bromofenol e foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada com tensão de 100 V até as amostras ultrapassarem o gel de concentração, a tensão foi então alterada para 150 V.

Após a corrida o gel foi lavado com água destilada e incubado com solução de Triton X100 a 2% por 1 hora. Posteriormente, a solução de Triton X100 foi removida, o gel foi lavado com água destilada e incubado com tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, contendo CaCl<sub>2</sub> 10 mM, a 37°C por 24 horas. Ao término do período de incubação, o gel foi corado com o corante *Comassie Blue* R350 diluído em ácido acético 20% na proporção de 1:1. O excesso de corante foi removido por lavagem do gel com solução de ácido acético 20%. O marcador de proteínas de massa molecular conhecidas *SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard* (LifeTechnologies) foi utilizado no ensaio como padrão.

### 3.12. DETECÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR FLUORESCÊNCIA.

A detecção da geração de espécies reativas foi feita por utilização do 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), uma sonda estável lipofílica não-fluorescente que atravessa a membrana das células. No interior das células as enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA e formam a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) que permanece no interior da célula devido a sua polaridade. As espécies reativas de oxigênio geradas durante a respiração celular oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com emissão em 510-530 nm. Essa fluorescência é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Desta forma a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pela célula, em particular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BASS et al., 1983).

Os fibroblastos foram inoculados na concentração de  $2 \times 10^5$  células em cada poço de uma placa de 6 poços, que foi incubada por 24 h para permitir a adesão celular. Após esse período as células foram tratadas por 24 h com soluções de L-arginina nas concentrações de 800 µM, 1000 µM, 2500 µM ou 6000 µM. Ao término deste período, o meio de cultura foi retirado e as placas foram lavadas cuidadosamente com PBS. Foi adicionado às células 20 µM de DCFH-DA e elas foram incubadas a 37° C por 30 minutos. Após os 30 minutos a placa foi lavada 3 vezes com PBS e as lâminas foram montadas para detecção dos níveis de fluorescência, que foi feita no microscópio Zeiss Axion Imager.M2/ AxioCam HRm, no comprimento de onda de detecção de 485 nm e de referência de 535 nm.

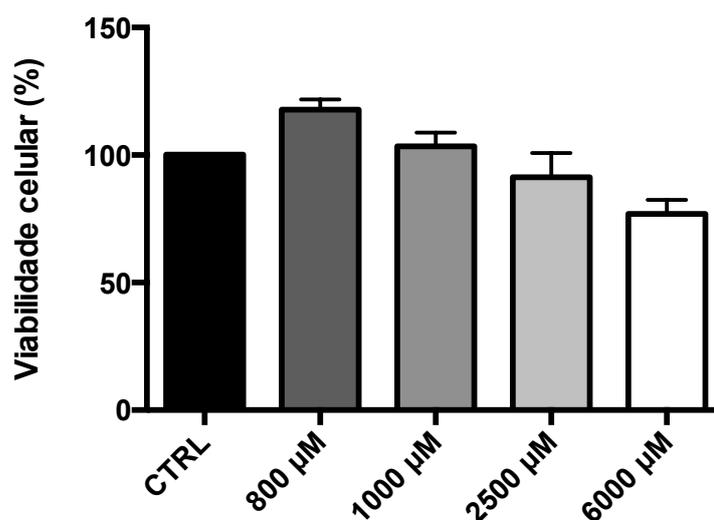
### 3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos ensaios foram avaliados estatisticamente. Para verificar se testes paramétricos ou não-paramétricos deveriam ser empregados, foram realizados testes preliminares de normalidade da distribuição amostral e, quando pertinentes, o teste de variância *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Dunnett para múltiplas comparações foram utilizados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE, *IN VITRO*, DAS SOLUÇÕES DE *L*-ARGININA EM FIBROBLASTOS HUMANOS

Para verificar a viabilidade celular e a citotoxicidade das soluções de *L*-arginina foi realizado o ensaio de MTT. Nesse ensaio as células viáveis são capazes de clivar o anel tetrazólio do sal brometo de MTT, de coloração amarelada, e formar cristais de formazana, de coloração azulada. Após a reação foi feita a leitura da absorbância a 570 nm e a quantidade de células viáveis foi calculada proporcionalmente à quantidade de cristais de formazana produzida. A comparação foi feita entre os valores de absorbância obtidos nos poços do controle e nos poços que receberam o tratamento com *L*-arginina. O grupo do controle (CTRL) foi o grupo em que as células foram cultivadas em meio DMEM sem acréscimo de *L*-arginina e a leitura da absorbância a 570 nm desta cultura foi considerada como referente a 100% de células viáveis. De acordo com os resultados obtidos, Figura 7, não houve diferença significativa entre o número de células viáveis do grupo CTRL e o número de células dos grupos tratados com soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800 µM, 1000 µM, 2500 µM ou 6000 µM. Só houve diferença significativa entre o número de células viáveis dos grupos tratados com solução de *L*-arginina nas concentrações de 800 µM e 6000 µM, sendo que para a concentração de 6000 µM houve uma diminuição da viabilidade celular, 76,55%, enquanto que para a concentração de 800 µM a taxa de células viáveis foi 121,77%. Dessa forma, esses resultados sugerem que o tratamento das células com soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800 µM, 1000 µM, 2500 µM ou 6000 µM por 72h não foi citotóxico (Figura 7).



**Figura 7. Análise da citotoxicidade, *in vitro*, das soluções de L-arginina, nas diferentes concentrações, em cultura de fibroblastos humanos pelo ensaio de MTT.**

O gráfico representa a médias  $\pm$  SEM de três replicatas. CTRL, cultura de células em meio DMEM sem acréscimo de L-arginina. O resultado deste grupo foi considerado como 100% de células viáveis. Teste estatístico: ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.2. EXTRAÇÃO DE RNA E VALIDAÇÃO DOS PRIMERS PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COL1A1, MMP-1 E TIMP-1 POR RT-PCRq.

##### 4.2.1. Análise da pureza e integridade do RNA extraído.

A pureza do RNA extraído das células tratados ou não com L-arginina e tratados ou não com  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas diferentes concentrações foi analisada espectrofotometricamente e por análise do material genético extraído por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8.

A leitura da densidade óptica a 260 nm é utilizada para quantificação de ácidos nucleicos, uma vez que os mesmos absorvem radiação UV a 260 nm, enquanto que a leitura da densidade óptica a 280 nm é utilizada para estimar a contaminação das amostras por proteínas. As amostras de RNA extraídas das células tratadas ou não com as diferentes concentrações de L-arginina mostraram uma razão  $A_{260}/A_{280}$  variando de  $1,78 \pm 0,05$  a  $1,89 \pm 0,01$ , portanto foram consideradas puras. A concentração de RNA das amostras variou entre  $0,92 \pm 0,03$

e  $1,02 \pm 0,10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabela 2). E as amostras de RNA extraídas das células tratadas ou não com as diferentes concentrações de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina mostraram uma razão  $A_{260}/A_{280}$  variando de  $1,91 \pm 0,03$  a  $1,97 \pm 0,01$ , portanto também foram consideradas puras. A concentração de RNA das amostras variou entre  $1,25 \pm 0,08$  e  $2,10 \pm 0,47 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabela 3).

**Tabela 2. Grau de pureza e concentração final das amostras de RNA extraídas das células tratadas ou não com L-arginina.**

Amostra	Leitura da densidade óptica a 260 nm ( $A_{260}$ )	Leitura da densidade óptica a 280 nm ( $A_{280}$ )	Pureza das amostras – razão $A_{260}/A_{280}$	Concentração de RNA das amostras ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
DMEM	$26,65 \pm 8,35$	$15,84 \pm 5,36$	$1,78 \pm 0,05$	$0,99 \pm 0,62$
800 $\mu\text{M}$	$15,12 \pm 4,45$	$14,63 \pm 0,23$	$1,79 \pm 0,07$	$0,96 \pm 0,01$
1000 $\mu\text{M}$	$26,97 \pm 2,76$	$16,24 \pm 1,50$	$1,82 \pm 0,06$	$1,02 \pm 0,10$
2500 $\mu\text{M}$	$24,19 \pm 0,88$	$14,11 \pm 0,11$	$1,80 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,03$
6000 $\mu\text{M}$	$27,65 \pm 0,95$	$15,66 \pm 0,72$	$1,89 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,02$

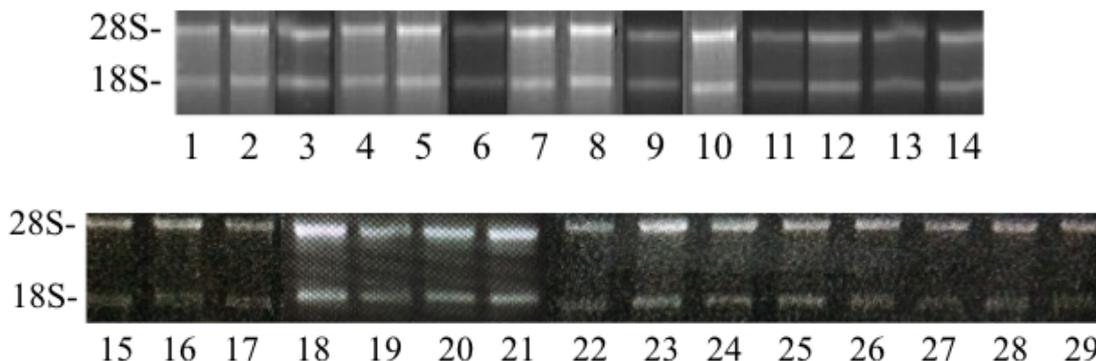
**Tabela 3. Grau de pureza e concentração final das amostras de RNA extraídas das células tratadas ou não com  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.**

Amostra	Leitura da densidade óptica a 260 nm ( $A_{260}$ )	Leitura da densidade óptica a 280 nm ( $A_{280}$ )	Pureza das amostras – razão $A_{260}/A_{280}$	Concentração de RNA das amostras ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
DMEM	$43,03 \pm 8,72$	$22,59 \pm 4,77$	$1,93 \pm 0,01$	$1,69 \pm 0,33$
$\beta\text{C } 2 \text{ mM}$	$53,69 \pm 11,66$	$28,29 \pm 6,20$	$1,94 \pm 0,03$	$2,10 \pm 0,47$
$\beta\text{C } 1 \text{ mM}$	$35,03 \pm 9,39$	$18,12 \pm 5,01$	$1,97 \pm 0,01$	$1,37 \pm 0,36$
HP $\beta\text{C } 2 \text{ mM}$	$38,94 \pm 1,78$	$19,66 \pm 1,39$	$1,96 \pm 0,01$	$1,56 \pm 0,20$
HP $\beta\text{C } 1 \text{ mM}$	$31,53 \pm 2,18$	$16,68 \pm 1,42$	$1,91 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,08$

Legenda:  $\beta\text{C}$ ,  $\beta$ -ciclodextrina e HP $\beta\text{C}$ , hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

A integridade do RNA extraído das culturas de células tratadas ou não com L-arginina nas diferentes concentrações ou com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina foi observada através da análise das amostras em eletroforese em gel de agarose a 1% e observação das bandas 18S e 28S na Figura

8.

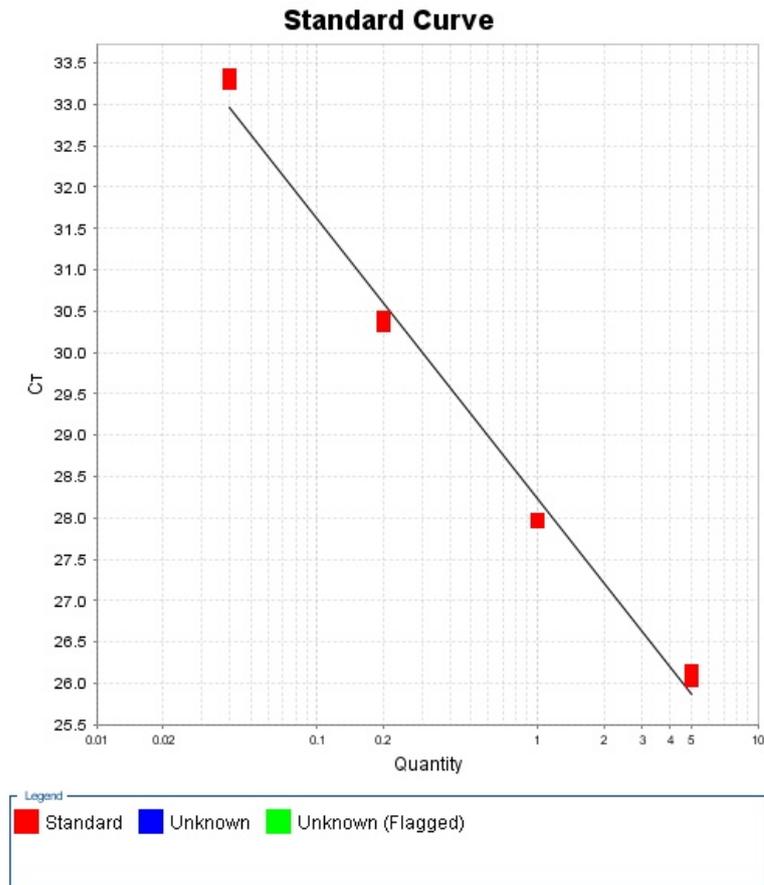


**Figura 8. Avaliação da integridade do RNA extraído das culturas de fibroblastos tratadas com as soluções de *L*-arginina a partir das bandas 18S e 28S.**

As amostras (1 a 29) são amostras de RNA extraído das culturas de fibroblastos sendo, as colunas 1 a 3: cultura de fibroblastos cultivados em DMEM (CTRL); colunas 4 a 6: cultura de fibroblastos tratados com 800  $\mu$ M de *L*-arginina; colunas 7 a 9: cultura de fibroblastos tratados com 1000  $\mu$ M de *L*-arginina; colunas 10 a 11: cultura de fibroblastos tratados com 2500  $\mu$ M de *L*-arginina; colunas 12 a 14: cultura de fibroblastos tratados com 6000  $\mu$ M de *L*-arginina; colunas 15 a 17: cultura de fibroblastos tratados com 2 mM de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ C); colunas 18 a 20: cultura de fibroblastos tratados com 1 mM de  $\beta$ C; colunas 21 a 23: fibroblastos cultura de fibroblastos tratados com 2 mM de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD); colunas 24 a 26: cultura de fibroblastos tratados com 1 mM de HP $\beta$ CD; colunas 27 a 29: cultura de fibroblastos cultivadas em meio DMEM (CTRL).

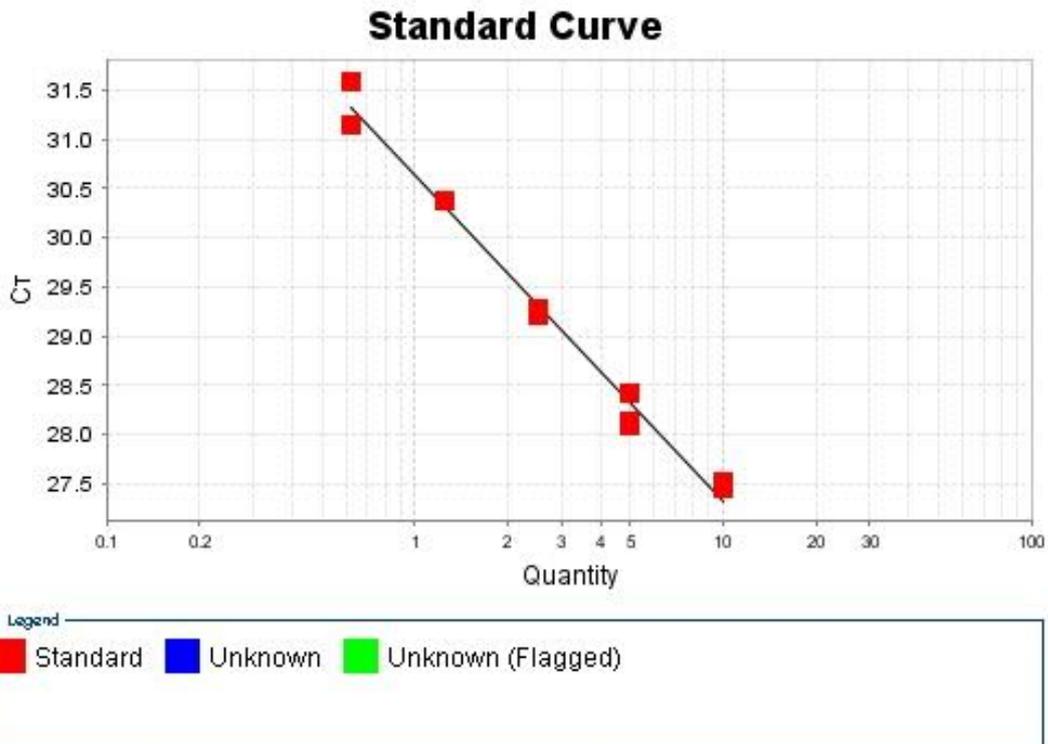
#### 4.2.2. Análise e validação dos *primers* *COL1A1*, *TIMP-1* e *MMP-1*.

Para testar a eficiência dos *primers* *COL1A1*, *TIMP-1* e *MMP-1* foram construídas curvas de diluição em série do RNA total extraído da cultura de fibroblastos humanos. Para a curva do *COL1A1* o fator de diluição foi 2 e a quantidade inicial de RNA foi 10 ng, para os demais *primers* o fator de diluição foi 5 e a quantidade inicial de RNA foi 30 ng. O *primer* da  $\beta$ -*ACTINA* já havia sido validado por outro grupo do Laboratório de Farmacologia Molecular (MARTINI, 2013) (Figura 9). As curvas obtidas para os *primers* de *COL1A1*, *TIMP-1* e *MMP-1* estão representadas nas Figuras 10, 11 e 12.



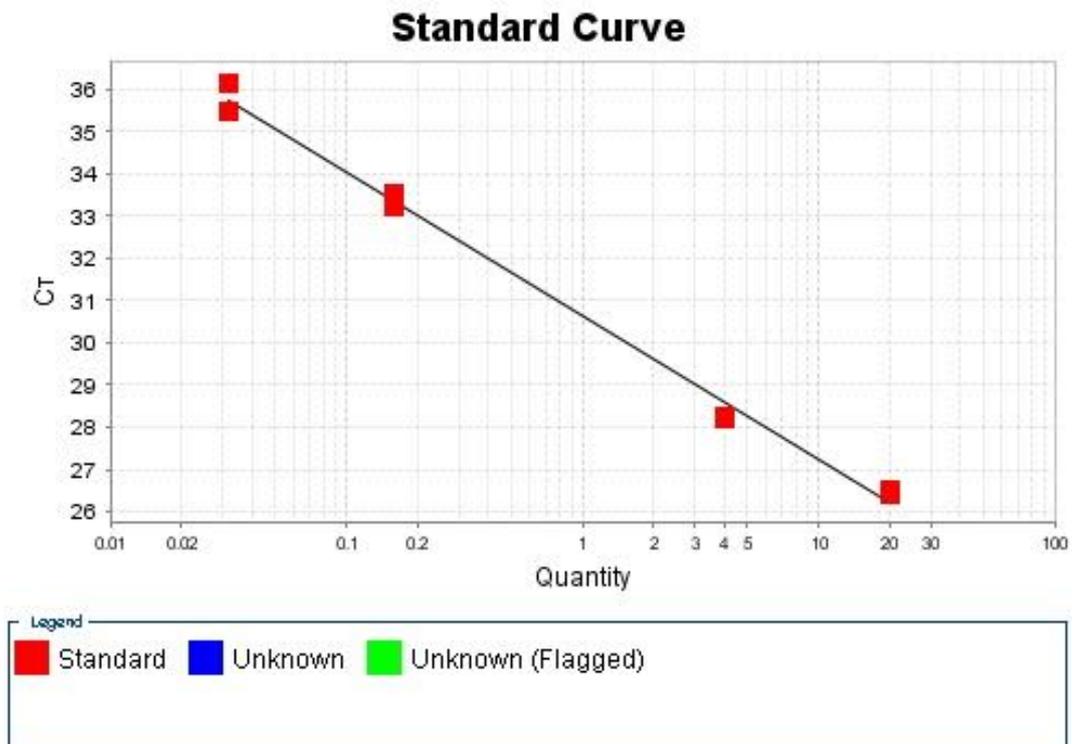
**Figura 9. Curva padrão dos gene  $\beta$ -ACTINA.**

Curva padrão do gene  $\beta$ -ACTINA construída a partir da diluição em série de um pool de RNA total de células mensageiras humanas imortalizadas. Extraído de (MARTINI, 2013).



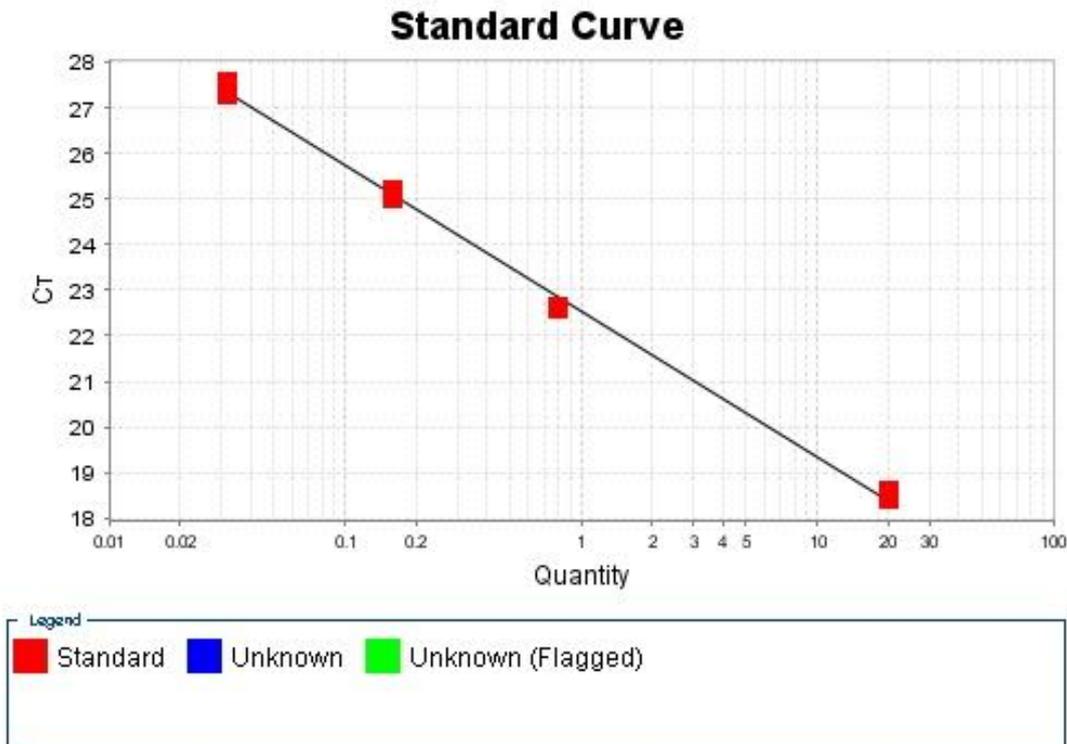
**Figura 10. Curva padrão do gene COL1A1.**

Curva padrão do gene COL1A1 construída a partir da diluição em série de um pool de RNA total de fibroblastos dérmicos humanos.



**Figura 11. Curva padrão do gene MMP-1.**

Curva padrão do gene MMP-1 construída a partir da diluição em série de um pool de RNA total de fibroblastos dérmicos humanos.



**Figura 12. Curva padrão do gene *TIMP-1*.**

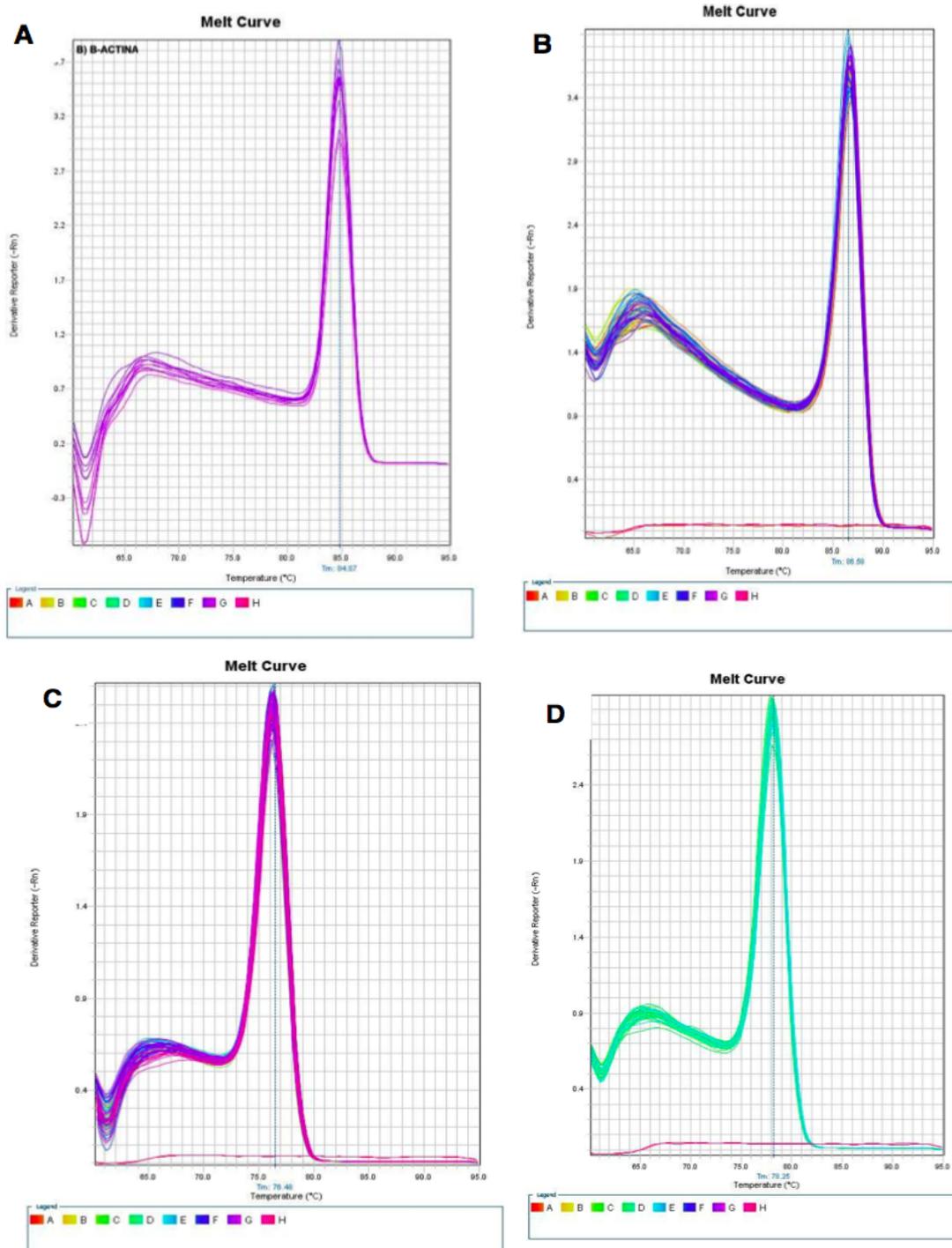
Curva padrão do gene *TIMP-1* construída a partir da diluição em série de um pool de RNA total de fibroblastos dérmicos humanos.

Os valores da inclinação angular da reta (*slope*), do ponto de intersecção no eixo y (*y-intercept*), que reflete o limite de detecção teórica da reação, do coeficiente de correlação linear (*r*) e da eficiência estão representados na Tabela 4. O valor do *slope* foi utilizado para calcular a eficiência dos *primers*. Os *primers* em estudo apresentaram eficiência entre 90 e 110%, adequando-se aos critérios estabelecidos para a qualidade da reação. As eficiências dos *primers* *COL1A1*, *MMP-1* e *TIMP-1* foram comparadas com a eficiência do *primer* da  $\beta$ -*ACTINA* e, como a variação obtida entre as eficiências dos *primers* dos genes alvo e do gene constitutivo foi menor que 10%, o método de quantificação relativa pelo cálculo do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi escolhido para realizar a análise da expressão relativa dos genes em estudo.

**Tabela 4. Parâmetros de validação obtidos no teste de eficiência do primer  $\beta$ -ACTINA, COL1A1, MMP-1 e TIMP-1.**

Parâmetros analisados ( $y = ax + b$ )	Genes alvo			Gene constitutivo
	COL1A1	MMP-1	TIMP-1	$\beta$ -ACTINA (MARTINI, 2013)
Inclinação da reta (slope, x)	-3,330	-3,377	-3,212	-3,384
Y-intercept (b)	30,68	30,60	22,55	28,227
Coefficiente de correlação linear (r)	0,996	0,998	0,999	0,999
Eficiência (%)	99,66	97,75	104,80	97,48

A especificidade da formação do produto de amplificação de cada um dos *primers* foi avaliada através da curva de dissociação (curva de *melting*) destes produtos (Figura 13). A curva de dissociação dos produtos de amplificação reflete a mudança na fluorescência quando há dissociação da dupla fita de DNA devido ao aumento na temperatura. A partir desta curva é determinada a temperatura de *melting* ( $T_m$ ), que é a temperatura na qual 50% do produto de amplificação apresenta-se como fita dupla e os outros 50% apresentam-se como fita simples. Cada produto de amplificação apresenta uma  $T_m$  específica, desta forma, a especificidade dos *primers* para os produtos de amplificação dos genes em estudo é indicada pela formação de um único pico na curva de dissociação, o que pode ser observado para todos os *primers* testados.



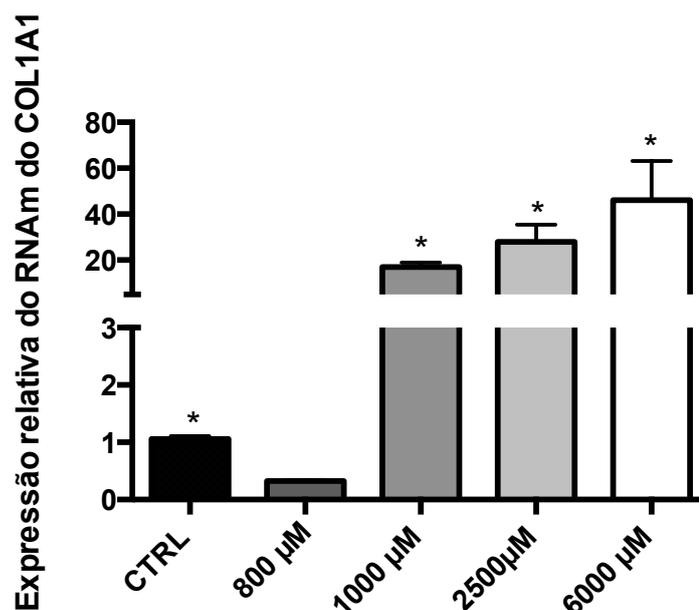
**Figura 13. Verificação da especificidade dos pares de primers a partir da curva de dissociação (curva de *melting*) dos produtos de amplificação.**

A) pares de primers da *β-ACTINA*; B) pares de primers do *COL1A1*; C) pares de primers da *MMP-1* e D) pares de primers do *TIMP-1*.

#### 4.3. ANÁLISE DO EFEITO DA SOLUÇÃO DE L-ARGININA, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, NA EXPRESSÃO GÊNICA DO *COL1A1*, *MMP-1* E *TIMP-1*.

A expressão gênica do colágeno tipo 1 (*COL1A1*), da metaloproteinase de matriz tipo 1 (*MMP-1*) e do inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz tipo 1 (*TIMP-1*) foi avaliada em fibroblastos dérmicos humanos na presença e na ausência de *L*-arginina. O tratamento foi feito por 72 h com as diferentes concentrações das soluções de *L*-arginina. O grupo controle (CTRL) foi apenas cultivado em meio DMEM (Sigma-Aldrich).

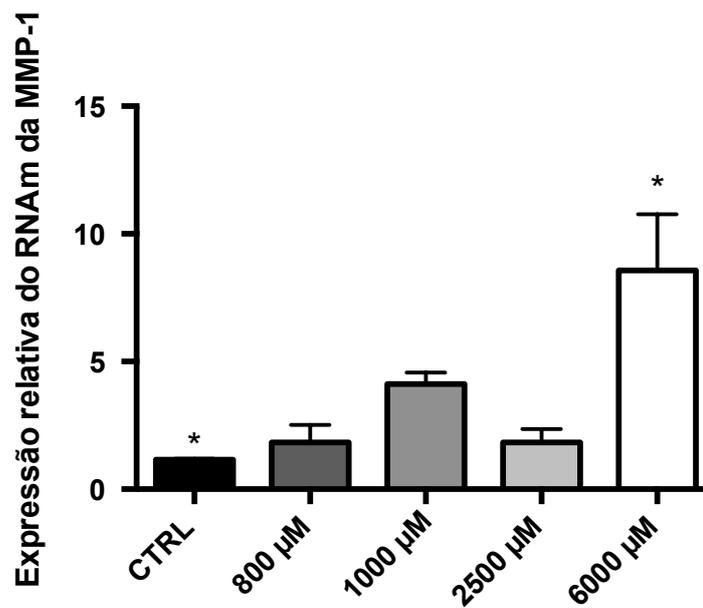
A expressão relativa do *COL1A1* nos fibroblastos tratados com as diferentes concentrações de *L*-arginina foi avaliada com relação a expressão desse gene no grupo CTRL. Após o tratamento com a solução de *L*-arginina na concentração de 800  $\mu$ M houve uma diminuição na expressão relativa do RNA mensageiro (RNAm) do *COL1A1*, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Já os tratamentos com as demais concentrações das soluções de *L*-arginina promoveram um aumento na expressão relativa do RNAm do *COL1A1*. As soluções de *L*-arginina nas concentrações de 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M e 6000  $\mu$ M promoveram um aumento médio na expressão de *COL1A1* de 16 vezes, 27 vezes e 45 vezes, respectivamente (Figura 14).



**Figura 14. Expressão relativa do RNAm do COL1A1 em fibroblastos dérmicos humanos tratados com L-arginina.**

A cultura de fibroblastos humanos foi tratada por 72 h com soluções de L-arginina nas concentrações de 800 μM, 1000 μM, 2500 μM e 6000 μM. A expressão do RNAm do gene do COL1A1 foi normalizada pela expressão do RNAm do gene da β-ACTINA. Os resultados são apresentados como média ± SEM da expressão gênica relativa do RNAm do COL1A1 das amostras tratadas comparadas com a do controle de 3 experimentos distintos. CTRL, células cultivadas somente em meio DMEM. \*p < 0,05; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

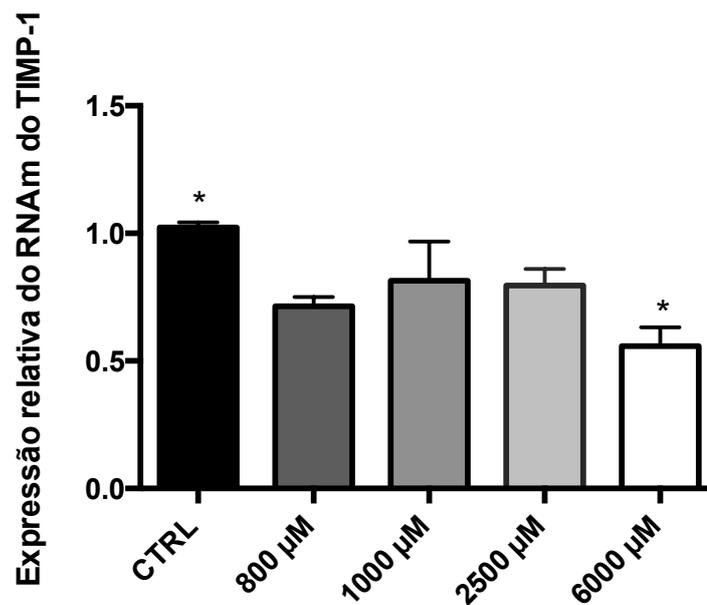
Em relação a expressão relativa da *MMP-1*, houve um aumento médio de 6,7 vezes no grupo tratado com a solução de L-arginina na concentração de 6000 μM em relação a expressão desse gene no grupo CTRL. A expressão relativa da *MMP-1* no grupo tratado com a solução de L-arginina 6000 μM foi significativamente maior comparada a todos os outros grupos, exceto ao grupo tratado com a solução de L-arginina 1000 μM (Figura 15).



**Figura 15. Expressão relativa do RNAm da *MMP-1* em fibroblastos humanos tratados com *L*-arginina.**

A cultura de fibroblastos humanos foi tratada por 72 h com soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800 μM, 1000 μM, 2500 μM e 6000 μM. A expressão do RNAm do gene da *MMP-1* foi normalizada pela expressão do RNAm do gene da *β-ACTINA*. Os resultados são apresentados como média ± SEM da expressão gênica relativa do RNAm da *MMP-1* das amostras tratadas comparada com a do controle (CTRL), células que foram cultivadas somente em meio DMEM. \*p < 0,05; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Os resultados obtidos para a expressão relativa do *TIMP-1* mostraram que houve uma diminuição média de 45% na expressão de *TIMP-1* quando os fibroblastos humanos foram tratados com a solução de *L*-arginina na concentração de 6000 μM em relação ao grupo CTRL. No entanto, não houve diferença significativa entre os demais tratamentos (Figura 16).



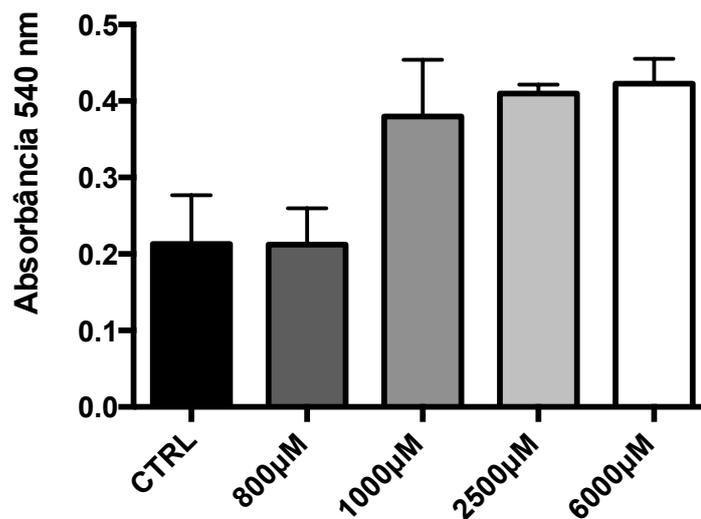
**Figura 16. Expressão relativa do RNAm do *TIMP-1* em fibroblastos humanos tratados com *L*-arginina.**

A cultura de fibroblastos humanos foi tratada por 72 h com soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800 μM, 1000 μM, 2500 μM e 6000 μM. A expressão do RNAm do gene do *TIMP-1* foi normalizada pela expressão do RNAm do gene da *β-ACTINA*. Os resultados são apresentados como média ± SEM da expressão gênica relativa do RNAm do *TIMP-1* das amostras tratadas comparadas com a do controle (CTRL), células que foram cultivadas somente em meio DMEM. \*p < 0,05; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.4. QUANTIFICAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO NA CULTURA DE CÉLULAS.

Após o tratamento por 72 horas com as diferentes concentrações de *L*-arginina o meio de cultura foi recolhido e submetido à reação de precipitação cromogênica com o corante *Sirius Red*, seguida da mensuração fotométrica que é proporcional à quantidade de colágeno fibrilar sintetizado.

Observa-se uma tendência de aumento na síntese de colágeno após o tratamento das células com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 1000 μM, 2500 μM e 6000 μM comparado ao grupo controle (Figura 17).



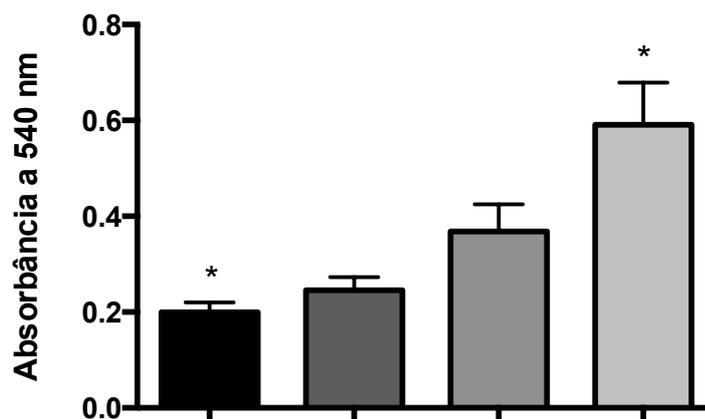
**Figura 17. Quantificação de colágeno nas culturas de fibroblastos tratados com *L*-arginina.**

A cultura de fibroblastos humanos foi tratada por 72 h com soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800 µM, 1000 µM, 2500 µM e 6000 µM. A quantificação de colágeno foi feita pelo método da reação com o corante *Sirius Red*, com leitura da absorbância a 540 nm. Teste estatístico: ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO ESTIMULANTE DA *L*-ARGININA NA PRODUÇÃO DE COLÁGENO VIA ÓXIDO NITRICO.

De acordo com o resultado da quantificação da síntese de colágeno pelo método da reação com o corante *Sirius Red*, o tratamento com soluções de *L*-arginina com concentrações a partir de 1000 µM aumentou a síntese de colágeno. Diante desse resultado a concentração de 1000 µM foi escolhida para a avaliação do efeito estimulante da *L*-arginina na produção de colágeno via óxido nítrico, através do tratamento com o azul de metileno 12,5 mM.

O tratamento com a solução de *L*-arginina 1000 µM e com o azul de metileno 12,5 mM aumentou a síntese de colágeno em aproximadamente 103% comparado ao grupo controle. O tratamento apenas com o azul de metileno 12,5 mM aumentou a síntese de colágeno em aproximadamente 170% comparado ao grupo controle (Figura 18).



1000 $\mu$ M L-arginina	-	+	+	-
Azul de metileno	-	-	+	+

**Figura 18. Quantificação de colágeno nas culturas de fibroblastos tratados com L-arginina e azul de metileno.**

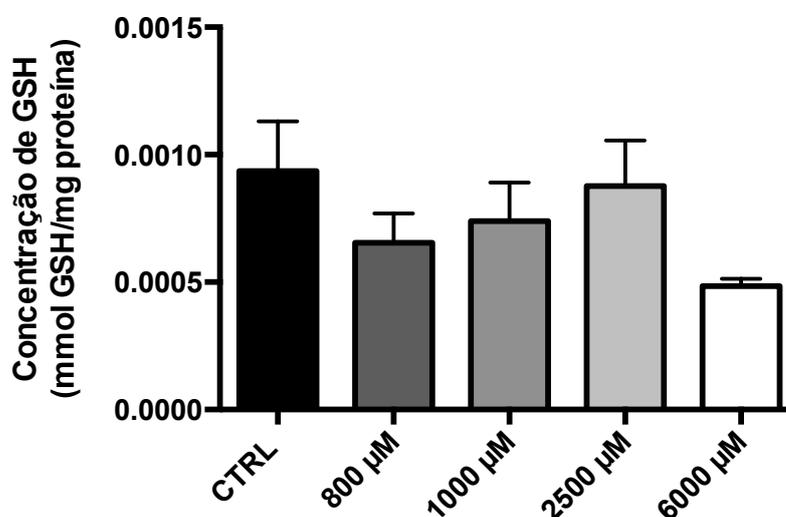
A cultura de fibroblastos humanos foi tratada (+) por 24 h com soluções de L-arginina na concentração de 1000  $\mu$ M e de azul de metileno a 12,5 mM. A quantificação de colágeno foi feita pelo método da reação com o corante *Sirius Red*, com leitura da absorbância a 540 nm. \* $p < 0,05$ ; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.6. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E OXIDADA (GSSG) NA CULTURA DE FIBROBLASTOS.

Uma forma de verificar o *status* redox nas células é através da quantidade relativa das formas de glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG), uma vez que essa relação é um determinante crítico no equilíbrio redox das células. Em condições normais o par redox da glutathiona está presente nas células de mamíferos em concentrações entre 1 e 10 mM, com a forma reduzida (GSH) predominante sobre a forma oxidada (PASTORE et al., 2003).

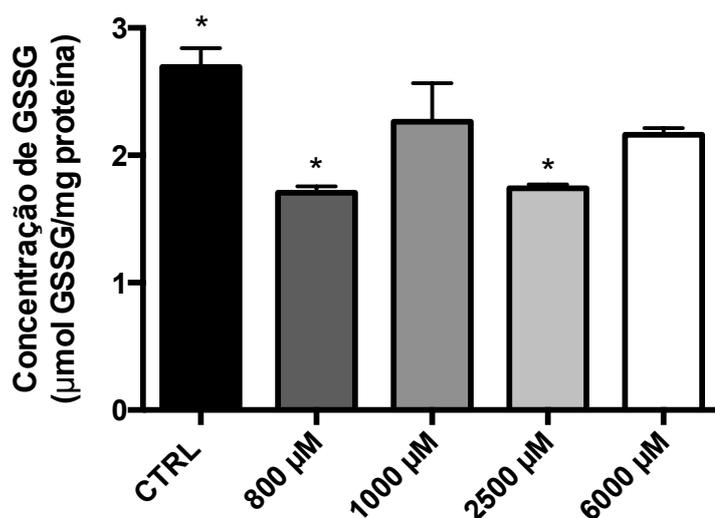
A partir da reação do lisado das células com o reagente *o*-ftaldeído e a leitura da fluorescência a 350 nm para excitação e 420 nm para emissão foi possível determinar os níveis de GSH e GSSG nas células que receberam tratamentos com diferentes concentrações de L-arginina (Figuras 19 e 20 ) e a relação GSH/GSSG (Figura 21).

O tratamento com as diferentes concentrações de *L*-arginina não alterou significativamente a concentração da glutathiona reduzida (GSH) comparado ao controle. No entanto, o tratamento com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800  $\mu$ M e 2500  $\mu$ M diminuiu significativamente a concentração da glutathiona oxidada (GSSG). Quando observamos a relação GSH/GSSG, para todos os tratamentos a relação foi menor que 1, mostrando que a quantidade de GSSG prevalece em relação à quantidade de GSH (Figura 21).



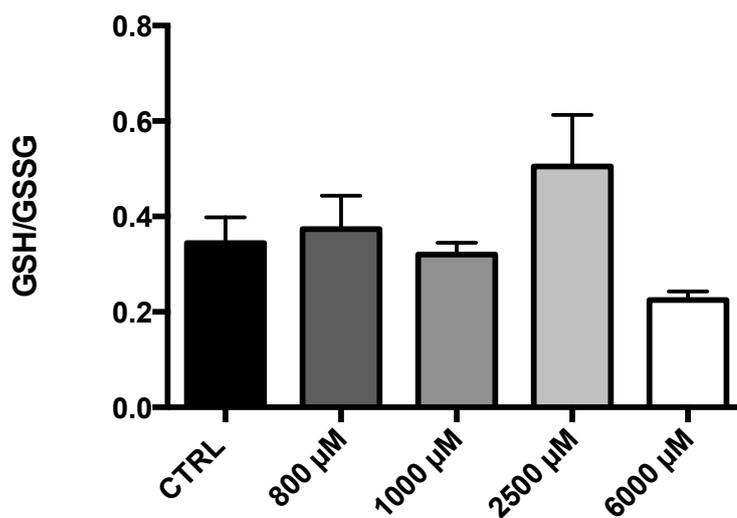
**Figura 19. Concentração de GSH determinada no lisado dos fibroblastos tratados com diferentes concentrações de *L*-arginina.**

Os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações de *L*-arginina e, após a reação com *o*-ftaldeído, a leitura da fluorescência foi feita a 350 nm para excitação e 420 nm para emissão. O gráfico representa média  $\pm$  erro da média,  $n = 3$ . Teste estatístico: ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.



**Figura 20. Concentração de GSSG determinada no lisado de fibroblastos tratados com diferentes concentrações de L-arginina.**

Os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações de L-arginina e, após a reação com o-ftaldeído e leitura da fluorescência a 350 nm para excitação e 420 nm para emissão. O gráfico representa média  $\pm$  erro da média; n = 3. \*p < 0,05; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.



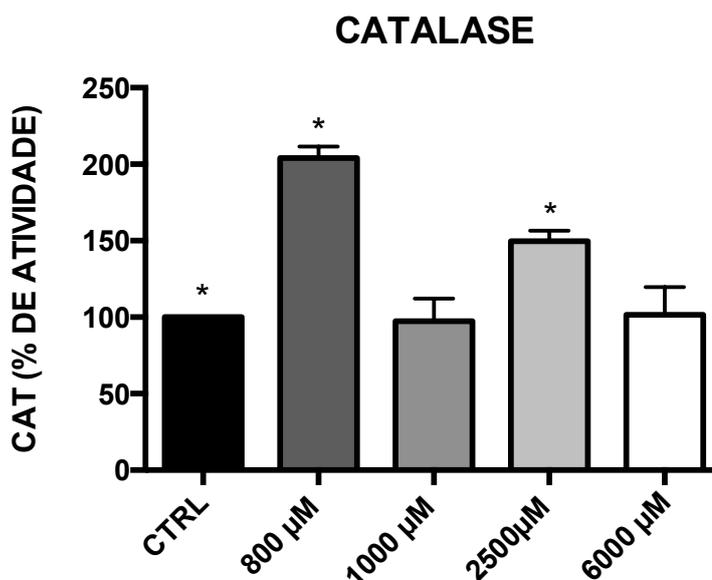
**Figura 21. Relação GSH/GSSG nos fibroblastos tratados com as diferentes concentrações de L-arginina.**

Os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações de L-arginina e, após a reação com o-ftaldeído e leitura da fluorescência a 350 nm para excitação e 420 nm para emissão. O gráfico representa média da relação GSH/GSSG  $\pm$  erro da média; n = 3. Teste estatístico: ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE.

A atividade da catalase, enzima responsável por catalisar o  $H_2O_2$  em oxigênio molecular e água, foi verificada através do monitoramento por espectrofotometria da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio no comprimento de onda de 240 nm (WEYDERT; CULLEN, 2010).

Os resultados apresentados estão em porcentagem de atividade da catalase, sendo que a atividade da enzima no grupo controle (CTRL) foi considerada como 100%. O tratamento com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800  $\mu$ M e 2500  $\mu$ M aumentou a atividade da catalase em aproximadamente 104% e 49%, respectivamente (Figura 22).

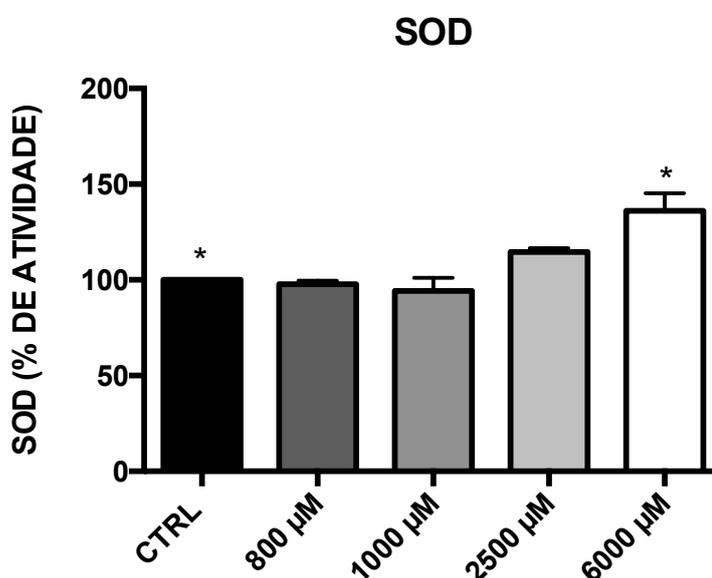


**Figura 22. Avaliação da atividade da catalase em fibroblastos após o tratamento com as diferentes concentrações de *L*-arginina.**

Os fibroblastos foram tratados por 72 h com diferentes concentrações de *L*-arginina e, após o tratamento, o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima catalase através do monitoramento do consumo de  $H_2O_2$  10 mM em espectrofotômetro a 240 nm. O gráfico representa média  $\pm$  erro da média, n = 3. \*p < 0,05; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).

A atividade da superóxido dismutase, enzima responsável por converter o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ), foi determinada pela redução do reagente *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) e pelo uso do sistema xantina/xantina oxidase como fonte de  $O_2^{\cdot-}$ . Os resultados estão representados em porcentagem da atividade da SOD em relação ao grupo controle (CTRL) que teve a atividade da SOD considerada como 100%. O tratamento com a solução de *L*-arginina 6000  $\mu$ M aumentou a atividade da SOD em aproximadamente 36% (Figura 23).



**Figura 23.** Avaliação da atividade da superóxido dismutase em fibroblastos após o tratamento com as diferentes soluções de *L*-arginina.

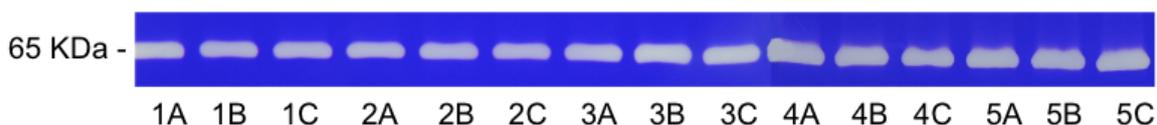
Os fibroblastos foram tratados por 72 h com diferentes concentrações de *L*-arginina e, após o tratamento, o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima SOD através da redução do NBT. O gráfico representa média  $\pm$  erro da média,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$ ; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES (MMP) APÓS O TRATAMENTO COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA SOLUÇÃO DE L-ARGININA.

A atividade da metaloproteinase foi avaliada a partir da visualização da atividade proteolítica dessas enzimas no gel de poliacrilamida acrescido de gelatina

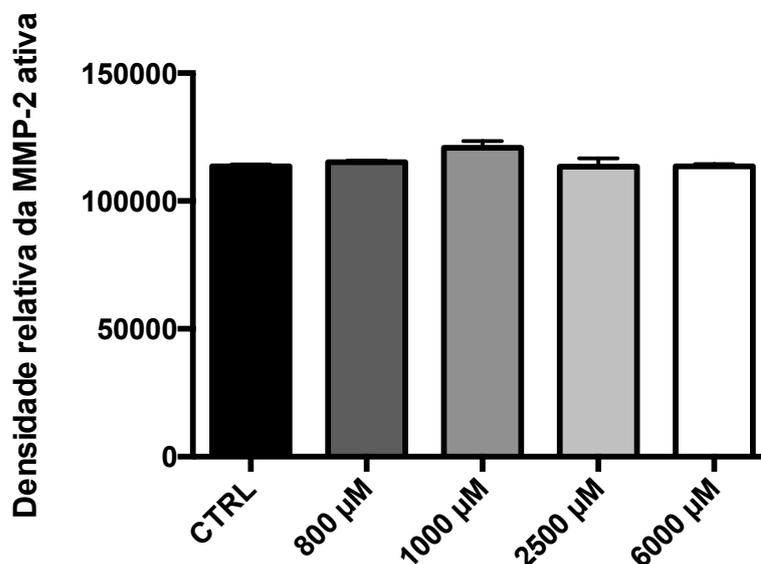
a 1%. Esse ensaio de zimografia que utiliza a gelatina como substrato é utilizado para avaliação da atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9.

O tratamento com as diferentes concentrações das soluções de *L*-arginina não alterou a atividade da forma ativa da MMP-2 comparado ao grupo controle (Figuras 24 e 25).



**Figura 24. Zimografia para avaliação da atividade de metaloproteinase (MMP).**

Os meios de cultivo dos fibroblastos tratados com as diferentes concentrações das soluções *L*-arginina foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com 1% de gelatina. 1A, 1B, 1C correspondem às amostras de controle; 2A, 2B, 2C às amostras tratadas com 800  $\mu$ M de *L*-arginina; 3A, 3B, 3C às amostras tratadas com 1000  $\mu$ M de *L*-arginina; 4A, 4B, 4C às amostras tratadas com 2500  $\mu$ M de *L*-arginina e 5A, 5B, 5C às amostras tratadas com 6000  $\mu$ M de *L*-arginina. A banda de 65 KDa corresponde a MMP-2 ativa.



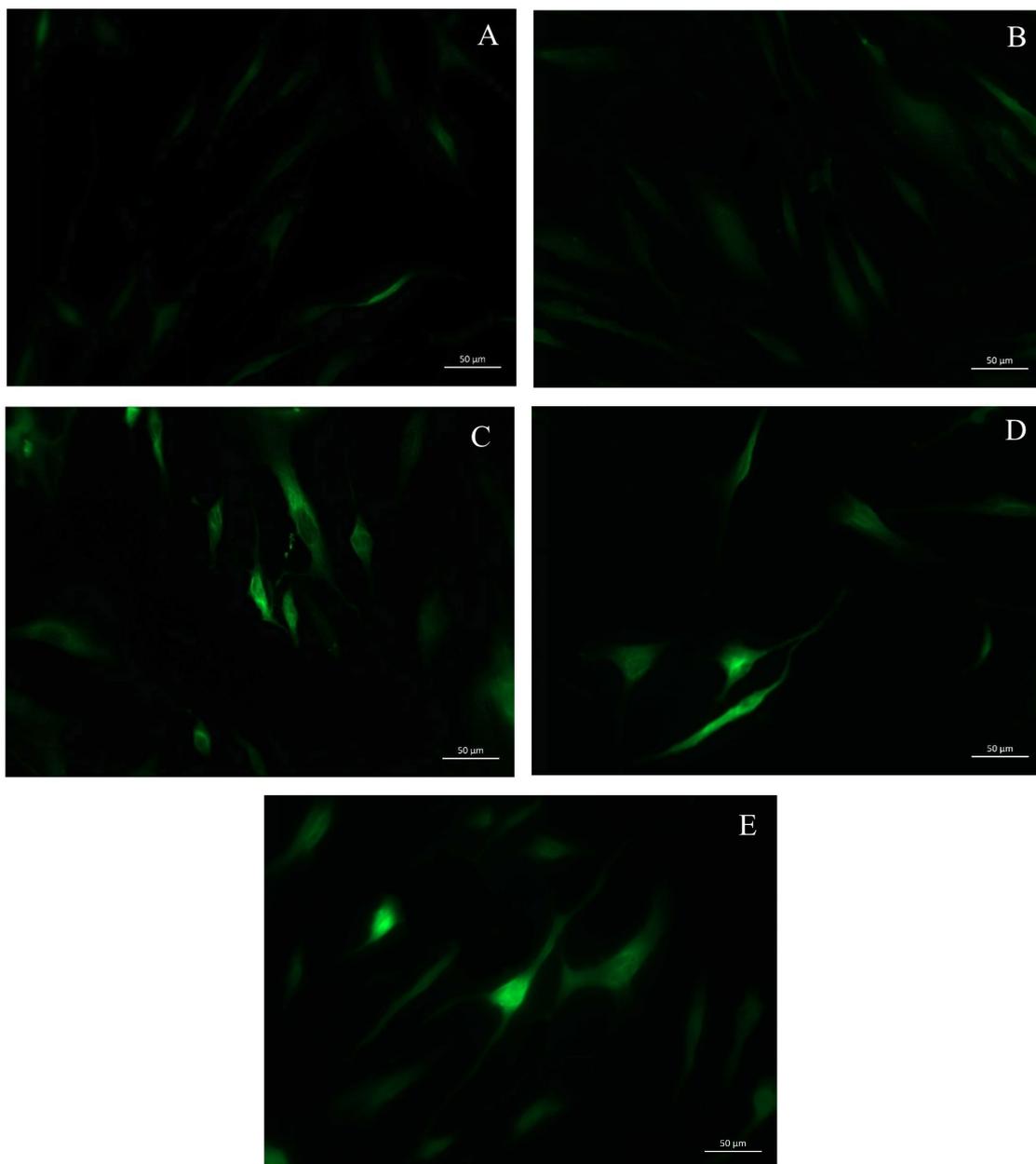
**Figura 25. Densidade relativa da banda correspondente à MMP-2 ativa.**

Densidade relativa das bandas da MMP-2 ativa no gel de zimografia. A intensidade das bandas do gel de zimografia foram quantificadas pelo programa ImageJ através da ferramenta *integrated density*. O gráfico representa média  $\pm$  erro da média. Teste estatístico: ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.10. AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR FLUORESCÊNCIA APÓS O TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA SOLUÇÃO DE *L*-ARGININA .

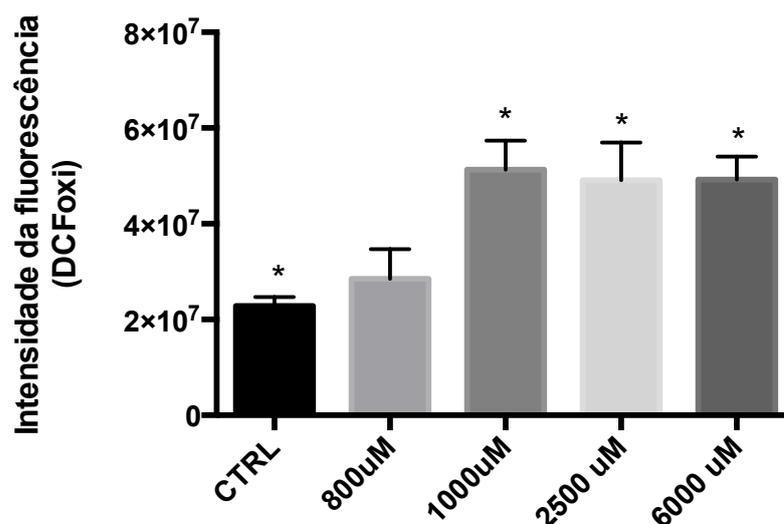
Após o tratamento das células com as diferentes soluções de *L*-arginina, a geração de espécies reativas de oxigênio foi determinada pela detecção dos níveis de fluorescência da diclorofluoresceína oxidada no comprimento de onda de detecção de 485 nm e de referência de 535 nm.

Foi possível observar um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio após o tratamento das células com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M e 6000 $\mu$ M, sugerindo um aumento do estresse oxidativo com esses tratamentos (Figuras 26 e 27).



**Figura 26. Avaliação do estresse oxidativo através da fluorescência da diclorofluoresceína oxidada.**

As espécies reativas de oxigênio oxidam a DCFH em DCFoxi, que possui fluorescência verde. Essa fluorescência foi detectada no comprimento de onda de detecção de 485 nm e é proporcional à capacidade oxidativa da célula. (A) amostra controle, (B) células tratadas com 800  $\mu\text{M}$  de *L*-arginina, (C) células tratadas com 1000  $\mu\text{M}$  de *L*-arginina, (D) células tratadas com 2500  $\mu\text{M}$  e (E) células tratadas com 6000  $\mu\text{M}$  *L*-arginina. Objetiva de 20x.



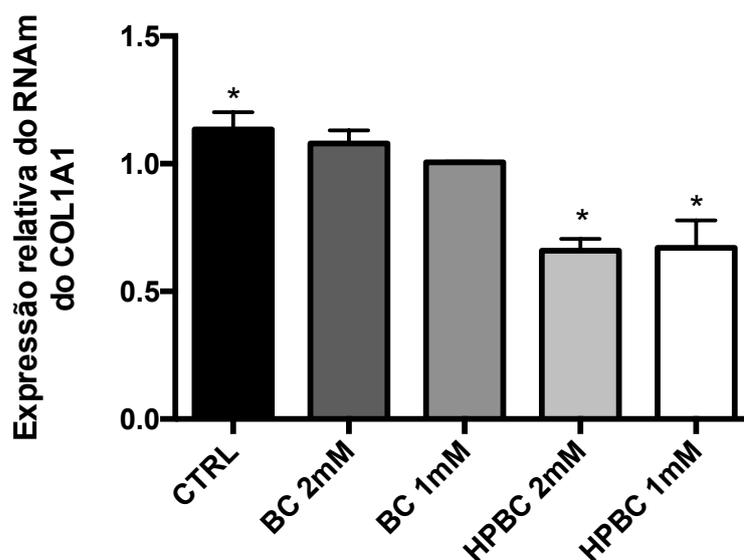
**Figura 27. Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio por fluorescência após o tratamento com diferentes concentrações da solução de L-arginina.**

Os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações de L-arginina e, após 24 h foram tratadas com DCFH que é oxidada pelas espécies reativas de oxigênio a DCFoxi. A fluorescência deste composto foi detectada no comprimento de onda de detecção de 485 nm e é proporcional à capacidade oxidativa da célula. A intensidade da fluorescência foi medida pelo programa ImageJ através da *integrated density*. O gráfico representa média  $\pm$  desvio padrão da média. \*p < 0,05; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.11. ANÁLISE DO EFEITO DA $\beta$ -CICLODEXTRINA ( $\beta$ C) E HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA (HP $\beta$ C), NA EXPRESSÃO GÊNICA DO *COL1A1*.

A expressão relativa do *COL1A1* nos fibroblastos tratados por 24 horas com meio DMEM acrescido de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 1 mM e 2 mM foi avaliada com relação ao grupo controle (CTRL) que foi incubado apenas com meio DMEM.

O tratamento dos fibroblastos humanos com  $\beta$ -ciclodextrina 1 mM e 2 mM não alterou a expressão relativa do *COL1A1*. Já o tratamento com a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 1 mM ou 2 mM reduziu a expressão relativa do *COL1A1* em aproximadamente 44% comparado ao grupo controle (Figura 28).

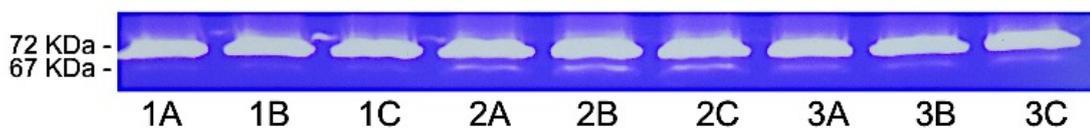


**Figura 28. Expressão relativa do RNAm do COL1A1 em fibroblastos humanos tratados com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ C) ou hidroxipropil- $\beta$ -betaciclodextrina (HP $\beta$ CD).**

A cultura de fibroblastos humanos foi tratada por 24 h com meio DMEM acrescido de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ C) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) nas concentrações de 2 mM e 1 mM. A expressão do RNAm do gene do COL1A1 foi normalizada pela expressão do RNAm do gene da  $\beta$ -ACTINA. Os resultados são apresentados como expressão gênica relativa do RNAm do COL1A1 das amostras tratadas comparada com a do controle (CTRL), células que foram cultivadas somente em meio DMEM. \*p < 0,05; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

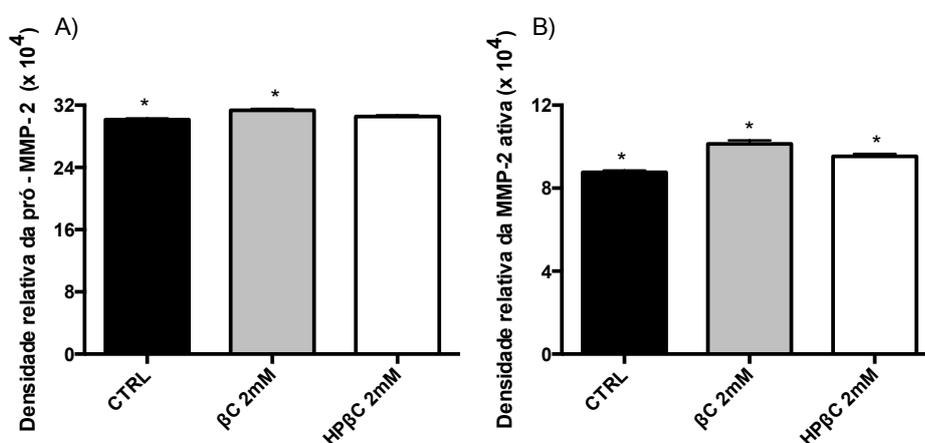
#### 4.12. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES (MMP) APÓS O TRATAMENTO COM $\beta$ -CICLODEXTRINA E HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA.

Após o tratamento com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina 2 mM ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 2 mM foi possível observar a atividade da forma pró-ativa da metaloproteinase 2 (pró-MMP-2) em todos os grupos, inclusive no grupo controle. Sendo que o grupo tratado com a solução de  $\beta$ -ciclodextrina 2 mM apresentou uma maior atividade da pró-MMP-2. Em relação à atividade da forma ativa da metaloproteinase 2 (MMP-2), foi possível observar uma maior banda para os grupos tratado com a  $\beta$ -ciclodextrina 2 mM e com a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 2 mM (Figuras 29 e 30).



**Figura 29. Avaliação da atividade de metaloproteinase (MMP) por zimografia.**

Os meios de cultivo dos fibroblastos tratados com as soluções de  $\beta$ C a 2 mM ou HP $\beta$ C a 2 mM foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com 1% de gelatina. Na figura, 1A, 1B e 1C correspondem ao grupo controle; 2A, 2B e 2C correspondem ao grupo tratado com  $\beta$ C a 2 mM; e 3A, 3B e 3C correspondem ao grupo tratado com HP $\beta$ C a 2 mM. A banda de 72 KDa corresponde à pró-MMP-2 e a banda de 67 KDa à MMP-2 ativa.



**Figura 30. Densidade relativa da banda de pró-MMP-2 e da banda de MMP-2 ativa.**

A) densidade relativa das bandas da pró-MMP-2 no gel de zimografia; B) densidade relativa das bandas da MMP-2 ativa no gel de zimografia. A intensidade das bandas do gel de zimografia foram quantificadas pelo programa ImageJ através da *integrated density*. O gráfico representa média  $\pm$  erro da média. \* $p < 0,05$ ; ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

## 5. DISCUSSÃO

O colágeno é a proteína mais abundante da pele, correspondendo a 85-90% do peso seco da pele, sendo o colágeno fibrilar tipo I o mais proeminente da derme (EGBERT et al., 2014; TANG et al., 2013). Junto com o colágeno fibrilar tipo I estão os colágenos fibrilares tipo III e V, que formam as fibras maiores de colágeno e a rede fibrilar, garantindo a resistência e tração da derme (TANG et al., 2013). A homeostase do colágeno, processo complexo composto por várias etapas como síntese, degradação e absorção do colágeno celular é regulada principalmente pelos fibroblastos (EGBERT et al., 2014). Durante o envelhecimento, ocorre uma diminuição do número de fibroblastos e, conseqüentemente, da quantidade do colágeno dérmico, que diminui numa taxa de 1% ao ano (TANG et al., 2013). Além disso, as fibras remanescentes de colágeno ficam desorganizadas e fragmentadas, o que prejudica a produtividade e funcionalidade dos fibroblastos (EGBERT et al., 2014; TANG et al., 2013).

Por ser o principal constituinte do tecido conjuntivo e, assim, estar relacionado a funções de resistência e proteção do corpo, é importante estudar as alterações do colágeno com o passar dos anos de vida. A molécula de colágeno tem em sua estrutura alguns aminoácidos que estão presentes em todos os subtipos, como glicina, que corresponde a um terço da molécula de colágeno, e prolina e hidroxiprolina, que são os segundos maiores componentes, correspondendo a 23% da molécula de colágeno. A hidroxiprolina é resultante da hidroxilação translacional da prolina pela prolil hidroxilase (BARBUL, 2008; IGNAT'EVA et al., 2007; SIDDIQI; ZARGAR, 2014).

O precursor para a síntese de prolina pode ser proveniente do ciclo da ureia, onde a arginina é convertida em ornitina pela ação da arginase, e a ornitina, por sua vez, é transformada em semialdeído  $\gamma$ -glutâmico, pela ação da ORN- $\gamma$  aminotransferase. A partir do semialdeído  $\gamma$ - glutâmico ocorre a produção de prolina que, junto com seu derivado, correspondem a segunda maior parte da molécula de colágeno (BARBUL, 2008). A arginina, além de poder ser metabolizada pelo ciclo da ureia, também pode ser metabolizada pelo ciclo da óxido nítrico sintetase, funcionando como precursora de óxido nítrico. O NO também pode estar relacionado

com a síntese de colágeno e uma possível via para isso é o aumento da expressão da chaperona Hsp47, que interage com a molécula de pró-colágeno, participando do seu processo de dobramento, montagem e transporte (OBAYASHI et al., 2006). As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – Hsp) são chaperonas super-reguladas em situações de estresse celular e atuam mantendo a homeostase e integridade proteica das células. A Hsp47 é uma chaperona molecular específica de colágeno que se liga de forma transitória à molécula de pró-colágeno sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e à tripla hélice de colágeno, sendo indispensável para a secreção, processamento e formação das fibras de colágeno (KAWASAKI et al., 2015; MALA; ROSE, 2010).

Ham e colaboradores mostraram que a aplicação tópica de NO incorporado em nanopartículas aumentou a cicatrização de feridas em camundongos através da migração celular e da deposição de colágeno. Após o tratamento com nanopartículas de NO eles observaram um aumento significativo no número de fibroblastos e na expressão gênica de *COL1A1* e *COL3A1*. Esses dados mostram que o NO pode estar envolvido tanto no recrutamento de fibroblastos quanto na produção de colágeno, através de mecanismos interligados que resultam numa melhora da cicatrização de feridas. Além disso, o NO pode contribuir para o recrutamento de fatores de angiogênese, como TGF- $\beta$  e fator de crescimento endotelial vascular. O TGF- $\beta$  por sua vez está envolvido na produção de colágeno, principalmente tipos I e III, e é um potente inibidor de MMP-1, 3 e 9 e promotor da síntese de TIMP-1, inibindo dessa forma a degradação do colágeno (HAN et al., 2012).

Dessa forma, a arginina pode contribuir para o aumento da produção de colágeno por duas possíveis vias. A fim de verificar a influência da *L*-arginina na síntese de colágeno, as culturas de fibroblastos humanos foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de *L*-arginina por 72 h. Inicialmente foi verificada a citotoxicidade das soluções de *L*-arginina através do ensaio de MTT. Como observado na Figura 7, não houve diferença significativa entre o número de células viáveis quando estas foram cultivadas somente em meio DMEM e de culturas onde as células foram tratadas com as diferentes concentrações da solução de *L*-arginina. No entanto, a cultura tratada com solução de *L*-arginina a 800  $\mu$ M

apresentou um aumento significativo do número de células viáveis quando comparada com a cultura que recebeu tratamento com a solução de *L*-arginina de 6000  $\mu$ M. Fujiwara e colaboradores (2014) mostraram que o tratamento com *L*-arginina na concentração de 6000  $\mu$ M por 12 e 24 horas aumentou a proliferação de fibroblastos e que a privação de *L*-arginina aumentou a apoptose (FUJIWARA et al., 2014). Os resultados deste trabalho sugerem que o tratamento por 72 h com solução de *L*-arginina a 6000  $\mu$ M já começa a se tornar tóxica para os fibroblastos.

Após a avaliação da citotoxicidade das soluções de *L*-arginina o próximo passo foi observar a influência da *L*-arginina na expressão do RNAm do *COL1A1*, *MMP-1* e *TIMP-1* por RT-PCRq. O que se observou foi um aumento significativo na expressão do RNAm do *COL1A1* em todos os tratamentos com as soluções de *L*-arginina, exceto na concentração de 800  $\mu$ M. Somado a isso, quando da análise da influência da *L*-arginina na produção de colágeno, os resultados mostraram que houve uma tendência de aumento na quantidade de colágeno sintetizada pelas células quando estas foram tratadas com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M e 6000  $\mu$ M, o que corrobora com os resultados observados na expressão do RNAm de *COL1A1* após o tratamento com as soluções de *L*-arginina nas mesmas concentrações. O tratamento com *L*-arginina pode ter aumentado os níveis de NO nos fibroblastos, uma vez que a *L*-arginina é uma molécula doadora de NO. Ham e colaboradores mostraram que o NO pode aumentar a expressão de *COL1A1* e, conseqüentemente, a deposição de colágeno (HAN et al., 2012).

Em relação à expressão do RNAm de *MMP-1* e *TIMP-1*, apenas o tratamento com a solução de *L*-arginina na concentração de 6000  $\mu$ M resultou em um aumento significativo na expressão do RNAm de *MMP-1* e uma diminuição significativa na expressão do RNAm de *TIMP-1*. Os demais tratamentos não provocaram alterações significativas na expressão do RNAm de *MMP-1* e *TIMP-1* em relação à cultura de células cultivadas somente em DMEM. Esses dados sugerem que a tendência de aumento na síntese de colágeno não foi causada pela diminuição da expressão da *MMP-1* e pelo aumento da expressão de *TIMP-1*. Apesar de haver um aumento na expressão do RNAm de *MMP-1* e uma diminuição do RNAm de *TIMP-1* com o tratamento na concentração de 6000  $\mu$ M, a expressão do RNAm de *COL1A1* ainda

foi maior nesse grupo e nos outros grupos que receberam o tratamento nas concentrações de 1000  $\mu\text{M}$  e 2500  $\mu\text{M}$  quando comparada à cultura que não recebeu suplementação de *L*-arginina. Não foram encontrados dados na literatura para comparação desse efeito. O que já foi demonstrado é que em casos de fibrose renal ocorre uma diminuição na expressão de MMP e aumento de TIMP quando há aumento da expressão de colágeno (WANG et al., 2013), o que não foi observado neste estudo.

A atividade enzimática da MMP-2, gelatinase envolvida no processo de degradação do colágeno, também foi avaliada pelo ensaio de zimografia. O tratamento com as diferentes concentrações de *L*-arginina não promoveu nenhuma alteração na atividade da MMP-2 ativa (Figuras 24 e 25). Esses resultados sugerem que o aumento na expressão do RNAm de *COL1A1* após o tratamento com as soluções de *L*-arginina não foi acompanhado pela inibição ou exacerbação da degradação de colágeno.

A *L*-arginina pode ser um precursor necessário para a síntese de *L*-prolina e *L*-ornitina e também substrato exclusivo para a óxido nítrico sintetase (NOS) (DURANTE; JOHNSON; JOHNSON, 2007; RAYNAUD-SIMON et al., 2012). Dessa forma, pode estar envolvida no aumento da produção de colágeno por uma dessas duas vias. Como a arginase, enzima central do ciclo da ureia, pode ser expressa em tecidos extra-hepáticos, pode haver uma competição pelo substrato da *L*-arginina entre a arginase e a NOS (DURANTE et al., 2007; RAYNAUD-SIMON et al., 2012; WIJNANDS et al., 2014).

Para avaliar se o aumento na síntese de colágeno após o tratamento com a *L*-arginina, doador de óxido nítrico, ocorreu via NOS, o efeito estimulante da *L*-arginina foi avaliado na presença do azul de metileno, um sequestrante de NO. Após o tratamento por 24 h com a solução de *L*-arginina na concentração de 1000  $\mu\text{M}$ , concentração em que já havia sido observado um aumento na síntese de colágeno, na presença ou ausência de 12,5 mM de azul de metileno, o colágeno foi quantificado pelo método com o corante *Sirius Red*. Tratamentos por mais de 24 h com o azul de metileno 12,5 mM deixavam as células inviáveis, não sendo, portanto, possível reproduzir o ensaio de 72 h. Não houve diferença significativa na expressão

de colágeno após o tratamento por 24 h só com a solução de *L*-arginina na concentração de 1000  $\mu$ M, diferente do mesmo tratamento feito por 72 h (Figura 17).

O resultado mostra que o tempo de 24h foi insuficiente para promover ou para observar o aumento na síntese de colágeno. Em contrapartida, houve uma tendência de aumento na expressão de colágeno quando os fibroblastos foram tratados com a solução de *L*-arginina na concentração de 1000  $\mu$ M e o azul de metileno 12,5 mM. O grupo que foi cultivado em meio DMEM com uma concentração basal de *L*-arginina e tratado somente com o azul de metileno 12,5 mM apresentou um aumento significativo na produção de colágeno. De acordo com esses resultados, quando houve o sequestro de NO houve um aumento na síntese de colágeno. Provavelmente a concentração de azul de metileno 12,5 mM foi capaz de sequestrar todo o NO produzido pela concentração basal de *L*-arginina presente no meio DMEM e incapaz de sequestrar todo o NO que pode ter sido produzido a partir da *L*-arginina na concentração de 1000  $\mu$ M acrescida ao meio DMEM do outro grupo.

Isso sugere que esse aumento na síntese de colágeno promovido pelo tratamento das células com *L*-arginina em concentrações mais altas pode ter sido por uma prevalência na via da arginase. Ao limitar a síntese de NO, a arginase, enzima responsável por catalisar a hidrólise da *L*-arginina em *L*-ornitina e ureia, favorece a formação de *L*-ornitina que é substrato para duas vias importantes, a síntese de poliaminas que estão envolvidas na proliferação e diferenciação celular e a síntese de *L*-prolina, precursor essencial para a síntese de colágeno (RATH et al., 2015; WARNKEN et al., 2010).

A fim de verificar se a *L*-arginina, um possível doador de óxido nítrico, alterava o *status* redox das células, foram avaliados os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) nas mesmas. A relação de GSH e GSSG em todas as culturas, tratadas ou não, foi menor que 1, o que mostra que o nível de GSSG prevaleceu sobre o nível de GSH, inclusive nas células cultivadas somente em DMEM (Figura 21). Analisando separadamente, o tratamento com as diferentes concentrações de *L*-arginina não alterou os níveis de GSH (Figura 19), e o tratamento com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800  $\mu$ M e 2500  $\mu$ M diminuiu significativamente

os níveis de GSSG (Figura 20), mas mesmo assim a relação GSH/GSSG nesses grupos que receberam o tratamento de 800  $\mu$ M e 2500  $\mu$ M ainda foi menor que 1.

Nas células, a glutathiona pode ser encontrada na forma livre ou ligada a proteínas. Na porção que permanece livre prevalece a forma reduzida, mas essa pode ser facilmente convertida à forma oxidada durante o estresse oxidativo. A quantidade relativa de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada (GSH/GSSG) determina o *status* redox da célula (ENNS et al., 2014; PASTORE et al., 2003). De acordo com a "teoria do radical livre" o envelhecimento resulta do acúmulo de danos irreparáveis mediados principalmente por espécies reativas de oxigênio e por uma deficiência no sistema de defesa antioxidante relacionado a uma perda progressiva de GSH intracelular (AOYAMA; NAKAKI, 2015; PASTORE et al., 2003). Dessa forma, a glutathiona é fundamental na resistência celular contra danos oxidativos, pois além de eliminar as espécies reativas ela também atua como ligante de proteínas evitando a oxidação destas (AOYAMA; NAKAKI, 2015; MAHER, 2005; PASTORE et al., 2003).

Em um estudo feito em cultura de fibroblastos humanos foi observado que o conteúdo de glutathiona pode estar relacionado com o potencial de proliferação das células. Quando as células estavam em crescimento logarítmico os níveis de glutathiona total encontrados foram maiores do que os níveis encontrados nas células que estavam com crescimento estacionário. Essa diminuição nos níveis de GSH pode ocorrer por vários fatores, como a diminuição da síntese, aumento da degradação, aumento do efluxo para o espaço extracelular ou formação de complexo que não pode ser detectado pelo método utilizado nesse estudo (CERESER et al., 2001).

Alguns estudos sugerem uma associação entre um ambiente mais redutor e a proliferação de células e um ambiente mais oxidante e a diferenciação celular (MAHER, 2005). Apesar de ter sido observada uma prevalência dos níveis de GSSG em todas as culturas celulares neste trabalho, o que pode estar relacionado com a presença da *L*-arginina, doador de NO, inclusive na cultura controle, que foi cultivada em meio DMEM mas que possuía uma concentração basal de *L*-arginina (400  $\mu$ M), o tratamento com as diferentes concentrações de *L*-arginina não alterou a relação GSH/GSSG nas células em relação à cultura controle. Esses resultados sugerem

que a *L*-arginina, apesar de ser um doador de NO, não alterou o *status* redox dos fibroblastos humanos em um nível capaz de causar um desequilíbrio que resultasse em danos para as células.

Outros antioxidantes importantes que fazem parte do sistema de defesa do organismo humano também foram avaliados após o tratamento dos fibroblastos com as diferentes concentrações de *L*-arginina. Foram eles, a superóxido dismutase, enzima responsável pela conversão do íon superóxido em peróxido de hidrogênio, e a catalase, que por sua vez decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (TREIBER et al., 2012).

Após o tratamento dos fibroblastos com a solução de *L*-arginina na concentração de 6000  $\mu$ M foi possível observar um aumento na atividade de SOD nas células. Em relação à catalase, os tratamentos das células com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800  $\mu$ M e 2500  $\mu$ M promoveram um aumento significativo na atividade dessa enzima.

Como a *L*-arginina é um doador de óxido nítrico, o tratamento das células com este aminoácido pode ter aumentado o estresse oxidativo nas mesmas e, em resposta a isso, o sistema de defesa antioxidante das células promoveu um aumento nos níveis de CAT e SOD. O NO pode reagir com o ânion superóxido e formar o peroxinitrito, mas em contrapartida a SOD pode dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular garantindo a biodisponibilidade do NO (CHAVEZ; LAKSHMANAN; KAVDIA, 2007). Em condições de estresse oxidativo a atividade de SOD funciona como uma defesa eficaz e os seus níveis afetam significativamente os níveis de óxido nítrico e peroxinitrito (CHAVEZ et al., 2007; WEIDINGER; KOZLOV, 2015).

Não se sabe porque houve o aumento de atividade de CAT somente após o tratamento das células com *L*-arginina nas concentrações de 800  $\mu$ M e 2500  $\mu$ M, porém estes resultados estão de acordo com aqueles observados no ensaio de quantificação de glutathiona oxidada, que mostrou uma diminuição dos níveis de GSSG para as células tratadas com *L*-arginina nessas mesmas concentrações.

Uma outra forma de avaliar a influência da *L*-arginina na geração de espécies reativas de oxigênio foi através do ensaio de fluorescência da 2',7'-diclorofluoresceína oxidada. A intensidade da fluorescência é proporcional aos

metabólitos oxidativos produzidos pelas células, em especial o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nesse ensaio foi possível observar um aumento de fluorescência para os fibroblastos após o tratamento com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 1000 µM, 2500 µM e 6000 µM comparados aos cultivados somente em DMEM. Isso sugere que houve um aumento no estresse oxidativo após o tratamento com a solução de *L*-arginina, o que já era esperado, uma vez que ela é um doador de NO. Esses resultados estão de acordo com o *status* redox observados pela relação GSH/GSSG nos fibroblastos humanos após o tratamento com as soluções de *L*-arginina. O NO é sintetizado a partir da ação da óxido nítrico sintetase na *L*-arginina, e a concentração intracelular de GSH é um importante determinante na superação do estresse nitrosativo (AQUILANO et al., 2011; AQUILANO; BALDELLI; CIRIOLO, 2015). O NO pode reagir com a cisteína da GSH e formar o GSNO (S-nitrosoglutathione), que é considerado um reservatório endógeno de NO que o libera no local onde ele é necessário para as vias de sinalização. Um desequilíbrio nos níveis de GSH pode estar associado aos efeitos nocivos do NO (AQUILANO et al., 2011).

Dessa forma, apesar dos resultados sugerirem haver um aumento do estresse oxidativo nos fibroblastos promovido pelo tratamento com a *L*-arginina, o sistema de defesa antioxidante das células foi capaz de manter um *status* redox viável e a *L*-arginina ainda foi capaz de promover o aumento na síntese de colágeno, provavelmente pela via do metabolismo da arginase.

Assim, pensando na possibilidade de utilizar a *L*-arginina como um ativo cosmético, e diante da dificuldade encontrada em outros estudos (dados não mostrados) em obter uma formulação tópica com boa estabilidade, devido ao seu pH básico e à alta suscetibilidade da molécula à oxidação e à hidrólise, foi cogitada a hipótese de formar complexos de inclusão da *L*-arginina com ciclodextrinas. As ciclodextrinas são oligossacarídeos que possuem o exterior hidrofílico e uma cavidade hidrofóbica, e sua propriedade mais importante é a capacidade de acomodar em seu interior algumas moléculas, formando dessa forma um complexo de inclusão que pode alterar as características físico-químicas e biológicas de substâncias (MIRANDA et al., 2011).

Diante dessa hipótese de utilização das ciclodextrinas como possíveis excipientes para inclusão da *L*-arginina, foi avaliado se a β-ciclodextrina (βC) e a

hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ C) tinham alguma influência na síntese de colágeno e na atividade da MMP-2. Após o tratamento das células com as soluções de  $\beta$ C e HP $\beta$ C nas concentrações de 1 mM e 2 mM foi observada uma diminuição significativa na expressão do RNAm de *COL1A1* com as soluções de HP $\beta$ C nas duas concentrações testadas. Em relação à atividade da MMP-2, tanto a  $\beta$ C quanto a HP $\beta$ C na concentração de 2 mM aumentaram a atividade desta enzima.

As ciclodextrinas, por apresentarem baixa toxicidade para os seres humanos, são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica a fim de melhorar a estabilidade, solubilidade, biodisponibilidade e mascarar odores e sabores desagradáveis de alguns medicamentos (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2009; VARCA et al., 2010). Em contrapartida, vários estudos de vias de sinalização celular e permeabilidade de membrana manipulam a depleção de colesterol celular com a utilização de metil- $\beta$ -ciclodextrina (MAHAMMAD; PARMRYD, 2015).

Furuchi e Anderson (1998) mostraram que a depleção de colesterol após o tratamento com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina provocou uma ruptura na organização molecular do complexo de sinalização MAPK, resultando em uma hiperfosforilação de ERK. As MMP têm sua expressão regulada por MAPK, dessa forma, por alterar o complexo de sinalização MAPK, as ciclodextrinas podem influenciar na expressão das MMP. Em estudos feitos com células de fibrossarcoma foi observado que diferentes doses de metil- $\beta$ -ciclodextrina aumentaram a expressão de MMP-2 (ATKINSON et al., 2004). Em queratinócitos, a metil- $\beta$ -ciclodextrina também aumentou a expressão de MMP-9 (KIM et al., 2007). Assim, os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os achados da literatura. Porém, novos ensaios devem ser feitos a fim de verificar se a ciclodextrina complexada com a *L*-arginina promove os mesmos efeitos na expressão das metaloproteinases e do colágeno.

Dessa forma, os resultados mostraram que a *L*-arginina é um potente ativo cosmético capaz de aumentar a síntese de colágeno. No entanto, o mecanismo pelo qual ela promove esse aumento ainda não está bem elucidado. As duas vias de metabolismo da *L*-arginina, tanto a via da iNOS quanto a via da ARG2 podem contribuir para a deposição de colágeno. Estudos complementares devem ser feitos

a fim de confirmar qual via prevalece na contribuição da síntese de colágeno após o tratamento com a *L*-arginina.

## 6. CONCLUSÃO

- A cultura primária de fibroblastos humanos foi estabelecida a partir da técnica de explante e das características morfológicas das células.
- As soluções de *L*-arginina nas concentrações de 800  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M e 6000  $\mu$ M não foram citotóxicas para a cultura de fibroblastos humanos.
- O tratamento com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M e 6000  $\mu$ M aumentou significativamente a expressão do RNAm de *COL1A1*.
- O tratamento com as soluções de *L*-arginina na concentração de 6000  $\mu$ M aumentou a expressão do RNAm de *MMP-1* e diminuiu a expressão de *TIMP-1*.
- Não houve alteração na atividade de MMP-2 após o tratamento com as diferentes concentrações de *L*-arginina.
- Houve uma tendência de aumento na síntese de colágeno com o tratamento das células com a solução de *L*-arginina a partir da concentração de 1000  $\mu$ M.
- Os resultados sugerem que o aumento na quantidade de colágeno no meio ocorre por um aumento na síntese de colágeno e não pela inibição de sua degradação pelas metaloproteinases.
- Os resultados sugerem que o aumento na síntese de colágeno ocorre por uma prevalência do metabolismo da *L*-arginina pela arginase.
- O tratamento com as soluções de *L*-arginina nas concentrações de 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M e 6000  $\mu$ M aumentou o estresse oxidativo nos fibroblastos, mas em contrapartida as células aumentaram a atividade de SOD e CAT mantendo o equilíbrio redox viável para as células.
- O tratamento com a solução de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina diminuiu significativamente a expressão do RNAm de *COL1A1*.
- Os tratamentos de fibroblatos com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e  $\beta$ -ciclodextrina aumentaram a atividade de MMP-2.
- Novos estudos devem ser feitos para confirmar por qual via a *L*-arginina aumenta a síntese de colágeno.

Portanto, a *L*-arginina se mostrou um excelente candidato a ativo cosmético, capaz de aumentar a síntese de colágeno em fibroblastos dérmicos humanos e, conseqüentemente, de retardar ou converter a perda de colágeno observada no envelhecimento da pele. No entanto, novos estudos devem ser feitos para esclarecer exatamente o mecanismo pelo qual ela promove esse efeito.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AL-NUAIMI, Y.; SHERRATT, M. J.; GRIFFITHS, C. E. Skin health in older age. **Maturitas**, 2014.
- ALBINA, J. E.; ABATE, J. A.; MASTROFRANCESCO, B. Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. **Journal of Surgical Research**, v. 55, n. 1, p. 97-102, 1993.
- AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Glutathione in cellular redox homeostasis: Association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8742-8758, 2015.
- AQUILANO, K. et al. Nitric oxide is the primary mediator of cytotoxicity induced by GSH depletion in neuronal cells. **J Cell Sci**, v. 124, n. 7, p. 1043-1054, 2011.
- AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M. R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **The Changing Faces of Glutathione, a Cellular Protagonist**, p. 84, 2015.
- ATKINSON, S. J. et al. Cellular cholesterol regulates MT1 MMP dependent activation of MMP 2 via MEK-1 in HT1080 fibrosarcoma cells. **FEBS letters**, v. 566, n. 1-3, p. 65-70, 2004.
- BANSAL, M.; JASWAL, S. Hypercholesterolemia induced oxidative stress is reduced in rats with diets enriched with supplement from Dunaliella salina algae. **Am. J. Biomed. Sci**, v. 1, n. 3, p. 196-204, 2009.
- BARBUL, A. Proline precursors to sustain mammalian collagen synthesis. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 10, p. 2021S-2024S, 2008.
- BASS, D. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology**, v. 130, n. 4, p. 1910-1917, 1983.
- BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **The Journal of pathology**, v. 211, n. 2, p. 241-251, 2007.
- BELLON, G. et al. Effects of preformed proline and proline amino acid precursors (including glutamine) on collagen synthesis in human fibroblast cultures. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 930, n. 1, p. 39-47, 1987.
- BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 12, p. 2565-2575, 2006.
- CALLEJA-AGIUS, J.; BRINCAT, M.; BORG, M. Skin connective tissue and ageing. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 27, n. 5, p. 727-740, 2013.
- CERESER, C. et al. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 752, n. 1, p. 123-132, 2001.

CHAVEZ, M. D.; LAKSHMANAN, N.; KAVDIA, M. Impact of superoxide dismutase on nitric oxide and peroxynitrite levels in the microcirculation-a computational model. 2007 29th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. IEEE. p.1022-1026.

CHOI, J. W. et al. The influences of skin visco-elasticity, hydration level and aging on the formation of wrinkles: a comprehensive and objective approach. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 1, p. e349-e355, 2013.

CHRISTIAN, A. et al. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. **Journal of lipid research**, v. 38, n. 11, p. 2264-2272, 1997.

COURA, G. D. S. Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana: avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA. 2004.

CRINI, G. Review: a history of cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 114, n. 21, p. 10940-10975, 2014.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2009.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1023-1035, 2004.

DEBATS, I. et al. Role of arginine in superficial wound healing in man. **Nitric Oxide**, v. 21, n. 3, p. 175-183, 2009.

DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 9, p. 906-911, 2007.

EGBERT, M. et al. The matricellular protein periostin contributes to proper collagen function and is downregulated during skin aging. **Journal of dermatological science**, v. 73, n. 1, p. 40-48, 2014.

EL-DOMYATI, M.; MEDHAT, W. Skin Aging: An Immunohistochemical Evaluation. **skin**, v. 3, p. 4, 2015.

ENNS, G. M. et al. Degree of glutathione deficiency and redox imbalance depend on subtype of mitochondrial disease and clinical status. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100001, 2014.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FISHER, G. J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of dermatology**, v. 138, n. 11, p. 1462-1470, 2002.

FISHER, G. J. et al. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 1, p. 101-114, 2009.

FUJIWARA, T. et al. L-Arginine Stimulates Fibroblast Proliferation through the GPRC6A-ERK1/2 and PI3K/Akt Pathway. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92168, 2014.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. Aging and wound healing. **World journal of surgery**, v. 28, n. 3, p. 321-326, 2004.

GREENE, J. M. et al. L-arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, p. 15, 2013.

HAN, G. et al. Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition. **The American journal of pathology**, v. 180, n. 4, p. 1465-1473, 2012.

HARMAN, D. **Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry**. University of California Radiation Laboratory Berkeley, CA, 1955.

HARRIS, M. I. N. D. C. **Pele-Estrutura, Propriedades E Envelhecimento**. Senac, 2009. ISBN 8573598689.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214-226, 1976.

HWANG, K.-A.; YI, B.-R.; CHOI, K.-C. Molecular mechanisms and in vivo mouse models of skin aging associated with dermal matrix alterations. **Laboratory animal research**, v. 27, n. 1, p. 1-8, 2011.

IGNAT'EVA, N. Y. et al. Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 51-57, 2007.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanisms of ageing and development**, v. 123, n. 7, p. 801-810, 2002.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. Oxidation events and skin aging. **Ageing research reviews**, v. 21, p. 16-29, 2015.

KAWASAKI, K. et al. Deletion of the collagen-specific molecular chaperone Hsp47 causes endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of hepatic stellate cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 6, p. 3639-3646, 2015.

KIM, S. et al. Cholesterol, a major component of caveolae, down-regulates matrix metalloproteinase-1 expression through ERK/JNK pathway in cultured human dermal fibroblasts. **Annals of dermatology**, v. 22, n. 4, p. 379-388, 2010.

KIM, S. et al. Cholesterol inhibits MMP-9 expression in human epidermal keratinocytes and HaCaT cells. **FEBS letters**, v. 581, n. 20, p. 3869-3874, 2007.

KIM, S. et al. Induction of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 by cholesterol depletion leads to the conversion of proMMP-2 into active MMP-2 in human dermal fibroblasts. **Experimental & molecular medicine**, v. 42, n. 1, p. 38-46, 2010.

KLUG, W. S., AND CUMMINGS, M. R. GENES AND PROTEINS. IN CONCEPTS OF GENETICS, 5TH ED. 1997;PRENTICE-HALL, UPPER SADDLE RIVER, NEW JERSEY. **Genes and proteins.** 1997.

KOZINA, L. et al. Role of oxidative stress in skin aging. **Advances in Gerontology**, v. 3, n. 1, p. 18-22, 2013.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International journal of pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167-180, 2013.

KWON, M.-J. et al. Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. **Journal of dermatological science**, v. 67, n. 2, p. 81-87, 2012.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 37, n. 5, p. 223-226, 2009.

LEE, J.-A. et al. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin up-regulates collagen I expression in chronologically-aged skin via its anti-caveolin-1 activity. **Oncotarget**, v. 6, n. 4, p. 1942, 2015.

LEVAKOV, A. et al. Age-related skin changes. **Medicinski pregled**, v. 65, n. 5-6, p. 191-195, 2012.

LINDNER, D. et al. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. **Biochemistry research international**, v. 2012, 2012.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

\_\_\_\_\_. Reflections on the theories of aging, of oxidative stress, and of science in general. is it time to abandon the free radical (oxidative stress) theory of aging? **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 3, p. 187-207, 2015.

MAHAMMAD, S.; PARMRYD, I. Cholesterol depletion using methyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Methods in Membrane Lipids**, p. 91-102, 2015.

MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. **Ageing research reviews**, v. 4, n. 2, p. 288-314, 2005.

MAKPOL, S. et al. Modulation of collagen synthesis and its gene expression in human skin fibroblasts by tocotrienol-rich fraction. **Arch Med Sci**, v. 7, n. 5, p. 889-895, 2011.

MALA, J. G. S.; ROSE, C. Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: an unconventional chaperone model? **Life sciences**, v. 87, n. 19, p. 579-586, 2010.

MARTINI, A. G. GQ-16, agonista parcial de PPAR $\gamma$ , diminui proliferação de células mesangiais humanas. 2013.

MIRANDA, J. C. D. et al. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 665-681, 2011.

- MORAVVEJ, H. et al. Establishment of a primary cell culture of human fibroblast in Iran. **Iranian Journal of Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 4-8, 2009.
- MORRIS, S. M. Enzymes of arginine metabolism. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 10, p. 2743S-2747S, 2004.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.
- NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, v. 69, n. 3, p. 249-256, 2011.
- NIKOLAKIS, G.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. Aging Skin as a Diagnostic Tool for Internal Diseases: A Chance for Dermatology. 2015.
- NISSINEN, L.; KÄHÄRI, V.-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 2014.
- OBYASHI, K. et al. Exogenous nitric oxide enhances the synthesis of type I collagen and heat shock protein 47 by normal human dermal fibroblasts. **Journal of dermatological science**, v. 41, n. 2, p. 121-126, 2006.
- PAŁKA, J. et al. Modulation of prolidase activity during in vitro aging of human skin fibroblasts the role of extracellular matrix collagen. **The Tokai journal of experimental and clinical medicine**, v. 21, n. 4-6, p. 207-213, 1996.
- PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.
- PATINO, M. G. et al. Collagen: an overview. **Implant dentistry**, v. 11, n. 3, p. 280-285, 2002.
- PENG, W.-J. et al. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. **Journal of clinical immunology**, v. 32, n. 6, p. 1409-1414, 2012.
- PHUONG, C.; MAIBACH, H. I. Biological Effects of Estrogen on Skin. 2015.
- PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation—a review. **International journal of cosmetic science**, v. 27, n. 1, p. 17-34, 2005.
- POPOVIC, P. J.; ZEH, H. J.; OCHOA, J. B. Arginine and immunity. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1681S-1686S, 2007.
- QUAN, T. et al. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2009. Nature Publishing Group. p.20-24.

RATH, M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease**, p. 13, 2015.

RAYNAUD-SIMON, A. et al. Arginine plus proline supplementation elicits metabolic adaptation that favors wound healing in diabetic rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 303, n. 10, p. R1053-R1061, 2012.

RHIE, G.-E. et al. Aging-and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 5, p. 1212-1217, 2001.

SÁRDY, M. Role of matrix metalloproteinases in skin ageing. **Connective tissue research**, v. 50, n. 2, p. 132-138, 2009.

SCHÄFFER, M. R. et al. Nitric oxide regulates wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 63, n. 1, p. 237-240, 1996.

SHI, H. P. et al. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. **Wound repair and regeneration**, v. 11, n. 3, p. 198-203, 2003.

SIDDIQI, N. J.; ZARGAR, S. Effect of quercetin on cadmium fluoride-induced alterations in hydroxyproline/collagen content in mice liver. **Connective tissue research**, v. 55, n. 3, p. 234-238, 2014.

STECHMILLER, J. K.; CHILDRESS, B.; COWAN, L. Arginine supplementation and wound healing. **Nutrition in clinical practice**, v. 20, n. 1, p. 52-61, 2005.

SURAZYNSKI, A. et al. Prolidase-dependent regulation of collagen biosynthesis. **Amino acids**, v. 35, n. 4, p. 731-738, 2008.

TANG, S. et al. UV-mediated downregulation of the endocytic collagen receptor, Endo180, contributes to accumulation of extracellular collagen fragments in photoaged skin. **Journal of dermatological science**, v. 70, n. 1, p. 42-48, 2013.

TASAB, M.; BATTEN, M. R.; BULLEID, N. J. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. **The EMBO journal**, v. 19, n. 10, p. 2204-2211, 2000.

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **Journal of Tissue Viability**, 2016.

TREIBER, N. et al. The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. **Dermato-endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 232-235, 2012.

TURNES, J. F. Superoxide dismutase and catalase. **Reference Module in Biomedical Sciences**, v. 4, p. 219-227, 2014.

VARCA, G. et al. Cyclodextrins: an overview of the complexation of pharmaceutical proteins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 11, n. 4, p. 255-263, 2010.

- VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 28, n. 10, p. 469-472, 2010.
- VICEDO ORTEGA, Y.; VICEDO TOMEY, A. Metaloproteinasas de la matriz y envejecimiento cutáneo. **Rev. habanera cienc. méd**, v. 2, n. 5, 2003.
- VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes & development**, v. 14, n. 17, p. 2123-2133, 2000.
- WANG, J. et al. Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 67, n. 2, p. 537-546, 2013.
- WARNER, H. R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 3, p. 249-258, 1994.
- WARNKEN, M. et al. Species differences in expression pattern of arginase isoenzymes and differential effects of arginase inhibition on collagen synthesis in human and rat pulmonary fibroblasts. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 381, n. 4, p. 297-304, 2010.
- WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 472-484, 2015.
- WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature protocols**, v. 5, n. 1, p. 51-66, 2010.
- WIDMER, C. et al. Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13243-13247, 2012.
- WIJNANDS, K. A. et al. Arginase-1 deficiency regulates arginine concentrations and NOS2-mediated NO production during endotoxemia. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e86135, 2014.
- WITTE, M.; KIYAMA, T.; BARBUL, A. Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes. **British Journal of Surgery**, v. 89, n. 12, p. 1594-1601, 2002.
- WULF, H. C. et al. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v. 35, n. 3, p. 185-191, 2004.
- YAAR, M.; ELLER, M. S.; GILCHREST, B. A. Fifty years of skin aging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2002. Nature Publishing Group. p.51-58.
- ZAGUE, V. et al. Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 6, p. 618-624, 2011.
- ZANI, B. G.; BOHLEN, H. G. Transport of extracellular l-arginine via cationic amino acid transporter is required during in vivo endothelial nitric oxide production. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 4, p. H1381-H1390, 2005.

## ANEXO 1

### ***Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE***

Convidamos o senhor a participar do projeto de pesquisa “Avaliação da influência da L-arginina e extratos de fungos endofíticos na elasticidade da pele”, sob a responsabilidade da pesquisadora Profa. Maria de Fátima Borin. O projeto visa o estudo dos mecanismos de envelhecimento da pele e avaliação biológica de substâncias que possam prevenir este envelhecimento.

O objetivo desta pesquisa é avaliar separadamente a influência da L-arginina e de extratos de fungos endofíticos na síntese de colágeno por fibroblastos humanos, e avaliar a inibição da atividade de metaloproteinases por estes compostos.

O senhor receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo.

A sua participação se dará por meio da doação da pele que será retirada durante a cirurgia de postectomia, que é a operação que retira o prepúcio, pele que recobre a glândula, que lhe foi indicada pelo seu médico. Este material seria normalmente descartado pelo hospital. A coleta deste material não irá interferir nas decisões de conduta clínica ou cirúrgica, quantidade de material retirado, tempo de cirurgia, e não serão necessárias inclusões de tratamentos específicos, nem nenhum outro procedimento. Caso o senhor concorde em participar da pesquisa, somente a pele retirada na cirurgia, e que seria destruída pelo hospital, será doada para a pesquisa. Ao final da pesquisa, as amostras serão destruídas.

Não há riscos decorrentes de sua participação na pesquisa, nenhum procedimento será modificado ou incluído para que o senhor doe a pele retirada para pesquisa, somente recolheremos a pele que seria descartada após a cirurgia.

Se o senhor aceitar participar, estará contribuindo para o melhor entendimento do envelhecimento da pele humana, principalmente no que se refere ao fotoenvelhecimento, e mecanismos de prevenção do mesmo.

O senhor pode se recusar a doar a pele que será retirada na sua cirurgia, caso isso lhe traga qualquer constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor. Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Caso haja algum dano direto resultante dos procedimentos de pesquisa, você poderá ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de, no mínimo, cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição.

Se o Senhor tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para Profa. Maria de Fátima Borin, na Universidade de Brasília, no telefone: (61) 3107-2007, no horário das 8 às 18 h.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail [cepfs@unb.br](mailto:cepfs@unb.br), horário de atendimento de 10 h às 12 h e de 14 h às 17 h, de segunda a sexta-feira.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

---

Nome / assinatura

---

Pesquisador Responsável

Maria de Fátima Borin

Brasília, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

HOSPITAL DAS FORÇAS  
ARMADAS - HFA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo do envelhecimento da pele.

**Pesquisador:** Maria de Fátima Borin

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 36534914.0.3001.0025

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 931.684

**Data da Relatoria:** 01/12/2014

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa envolvendo mestrado e doutorado em Ciências da Saúde da UnB, intitulado: "Avaliação da Influência da L-arginina e Extratos de Fungos Endofíticos na Elasticidade da Pele."

A pesquisa foi cadastrada com o título resumido "Estudo do Envelhecimento da Pele".

O término está previsto para julho de 2018. A presente proposta de pesquisa foi aprovada pelo CEP-UNB, após atendimento das pendências levantadas, conforme Parecer Consubstanciado de 18 de novembro de 2014, anexado a esse processo.

#### Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo é avaliar a influência da L-arginina e de extratos de fungos endofíticos de colágeno por fibroblastos humanos e avaliar a capacidade que tais compostos apresentam em inibir a atividade de metaloproteinases.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Serão realizados diversos procedimentos na execução da pesquisa. O que envolve diretamente os sujeitos de pesquisa é a coleta de amostras de pele de prepúcio, retirado por meio do processo de postectomia, por indicação médica no ambulatório de urologia do Hospital das Forças Armadas (HFA). Foi ressaltado no projeto que essas amostras de pele seriam naturalmente descartadas pelo HFA, assim como descrito pela pesquisadora que essa pesquisa não ocasionará nem riscos e nem

**Endereço:** HFA - Estrada Parque Contorno do Bosque s/n  
**Bairro:** sala 10 Centro **CEP:** 70.658-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3233-1599 **Fax:** (61)3234-4821 **E-mail:** pesquisahfa@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 931.684

benefícios aos doadores da pele que será utilizada para o preparo da cultura de células. Não haverá qualquer interferência no tratamento clínico dos indivíduos. Esse material a ser recolhido no HFA seria normalmente incinerado.

Os benefícios destacados estão relacionados a produção científica com o melhor entendimento do processo de envelhecimento da pele.

O sujeito de pesquisa tomará ciência do projeto por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que contempla todos os aspectos exigidos de um TCLE e que aborda de forma clara a utilização de material biológico para a realização de pesquisa. Havendo a concordância, o material poderá ser utilizado apenas para a finalidade da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

É um projeto de pesquisa longo, envolvendo mestrado e doutorado, com a realização de uma série de etapas e procedimentos laboratoriais. Ao HFA compete apenas ceder o material biológico previsto na metodologia, daí sua participação como instituição coparticipante. A metodologia adotada, apesar de complexa, parece ser adequada para o alcance dos objetivos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentou todos os documentos exigidos para a realização da pesquisa, estando o projeto de acordo com a Resolução CNS 466/2012 e suas complementares.

**Recomendações:**

Nada a acrescentar além do descrito no item "Considerações Finais".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Apesar da prévia aprovação pelo CEP da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, tendo em vista as alterações ocorridas na metodologia, com a inclusão da aplicação do TCLE e a necessidade de ciência pela clínica envolvida e demais trâmites administrativos, o colegiado deliberou por aguardar a aprovação da segunda versão do projeto antes de emitir parecer favorável, de forma readequar a tramitação no âmbito interno da instituição coparticipante. Este item foi atendido sendo anexada a documentação no presente protocolo em 09/01/2015.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** HFA - Estrada Parque Contorno do Bosque s/n  
**Bairro:** sala 10 Centro **CEP:** 70.658-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3233-1599 **Fax:** (61)3234-4821 **E-mail:** pesquisahfa@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS FORÇAS  
ARMADAS - HFA



Continuação do Parecer: 931.684

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme deliberado pelo colegiado do CEP/HFA em sua reunião extraordinária do dia 02 de dezembro de 2014, expeda-se o parecer APROVADO para o presente projeto de pesquisa. A pesquisadora fica, desde já, notificada da obrigação ética de seguir o protocolo de pesquisa conforme delineado, além de encaminhar, via Plataforma Brasil, relatórios parciais semestrais e final sucinto. Quaisquer alterações porventura necessárias, assim como uma possível interrupção da pesquisa também devem ser notificadas e devidamente justificadas, previamente via Plataforma Brasil.

BRASILIA, 12 de Janeiro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Ricardo César Amado**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** HFA - Estrada Parque Contorno do Bosque s/n  
**Bairro:** sala 10 Centro **CEP:** 70.658-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3233-1599 **Fax:** (61)3234-4821 **E-mail:** pesquisahfa@yahoo.com.br