

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP

LIA MARA GROSSO NEVES

EFEITOS DO EXTRATO DE *LYCIUM BARBARUM L.* E DO
LASER VERMELHO NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DO
FOTOENVELHECIMENTO CUTÂNEO EM CAMUNDONGOS
HAIRLESS

São Carlos

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP

LIA MARA GROSSO NEVES

EFEITOS DO EXTRATO DE *LYCIUM BARBARUM L.* E DO
LASER VERMELHO NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DO
FOTOENVELHECIMENTO CUTÂNEO EM CAMUNDONGOS
HAIRLESS

Tese apresentada ao Programa
Interinstitucional de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas Associação Ampla
UFSCar/UNESP, para obtenção do título
de Doutora em Ciências Fisiológicas

Orientação: Profa. Dra. Márcia Regina
Cominetti

Co-orientação: Prof. Dr. Nivaldo
Antonio Parizotto

São Carlos

2018




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Lia Mara Grosso Neves, realizada em 17/12/2018:



Prof. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar



Prof. Dr. Hueliton Wiliam Kido
UNINOVE



Prof. Dr. Gerson Jonatan Rodrigues
UFSCar



Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dr. Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins
UNIVAP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.



Prof. Dra. Márcia Regina Cominetti

DEDICATÓRIA

Ao Eterno.

*Aos meus queridos pais Vagner e Soraia pelo
imenso amor e compaixão.*

AGRADECIMENTO

Ao Eterno por suste-me nesta missão, toda honra seja dada ao Deus da minha vida!

A minha orientadora Profa. Dra. Marcia R. Cominetti pelo privilégio da sua orientação e por me conduzir nessa jornada com altruísmo e afeto. Por toda amizade, confiança, paciência, ensinamento e dedicação, não medindo esforços para sempre me ouvir e me atender.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Nivaldo A. Parizotto por todo respeito e credibilidade. Por me motivar a andar altaneiramente nas dificuldades encontradas. Pelo vasto conhecimento compartilhado e grande amizade.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes pela disposição em me auxiliar nas etapas de trabalho com o extrato vegetal.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio pelo auxílio com a técnica de ressonância magnética.

A Profa. Dra. Lucimar R. S. de Avó pelo auxílio com as análises histológicas.

A Profa. Dra. Renata F. V. Lopez pela disposição e auxílio com o estudo de permeação.

Ao Prof. Dr. Ardeshir Bayat pela oportunidade de executar um projeto de bolsa estágio de pesquisa no exterior (BEPE) sob sua supervisão na University of Manchester – UK. Pelo imenso aprendizado adquirido e parceria estabelecida.

Ao querido Alexandre P. V. Chiva, por todo o socorro e auxílio na parte administrativa do PIPGCF/UFSCar e pela amizade construída nessa longa jornada.

A querida Carolina Martin, por todo esforço e auxílio com a técnica de zimografia.

A querida Elaine Floriano, pelo auxílio com as técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência. Pela nova e linda amizade construída.

A minha amiga Carla Tim, por dividir comigo momentos especiais de descontração e desafios. Pela preciosa participação em importantes etapas desse trabalho, sem a qual seria impossível a sua realização. Pela amizade e parceria que construímos juntas.

A minha amiga Izabela Vatanabe por compartilhar comigo momentos finitos no tempo, mas infinitos em valia. Pela sensibilidade e por tornar meus dias repletos de palavras de sabedoria, risos e alegrias, amenizando as adversidades e tornando tudo mais leve.

As minhas amigas Vanessa, Ana Laura, Julia, Cíntia, Dayane, Patrícia e Geno pelos momentos incríveis de trabalho juntas, momentos “café da Ioiô” e por todo incentivo e suporte emocional em diferentes etapas desse trabalho.

Aos meus muitos amigos e parceiros que pertencem ou pertenceram ao Laboratório de Recursos Fisioterapêuticos - DFisio, que de maneira maravilhosa enriqueceram meus dias com ensinamentos, suporte, risadas e muito trabalho.

Aos meus amigos do LABEN: Amanda, Angélica, Angelina, Cecília, Carla, Carol, Liany, Marina N, Marina, Patrícia, Rafaela, Ramon, Rebeqa e Renata, que de maneira especial sempre contribuíram com paciência e disposição em diferentes etapas deste trabalho. Pelo carinho de todos que me acolheram com respeito e consideração. Pelo privilégio de ter dividido muitos momentos de comemorações inesquecíveis e por fazer parte desta equipe incrível.

As minhas amigas Mariana, Gabi S. e Gabi C. pela nossa comunhão em Jesus que tanto me alegrou e fortaleceu em momentos de dificuldade.

A minha amiga Fernanda Ap. S. Mendonça que tanto me ensinou e inspirou a trilhar os caminhos da ciência. Por toda a nossa comunhão no Eterno.

Ao meu irmão Lucas e minha cunhada Eliana por todo amor, suporte e incentivo na busca por novos desafios.

A minha linda sobrinha Sara pelo imenso amor e por extrair o melhor de mim nos momentos mais difíceis. Por me fazer rir e chorar com seus doces e silenciosos abraços.

Em especial aos meus pais Vagner e Soraia que com muito amor e compaixão dividiram comigo cada momento de alegria, tristeza, desafios e comemorações relacionados a este trabalho. Por serem o suporte que precisei para concluir essa longa jornada e pela bendita esperança de tê-los comigo eternamente em Jesus Cristo.

A todas essas pessoas incríveis, que pela participação especial de cada um, terão seus lugares eternizados na história deste trabalho e no meu coração.

A vocês toda a minha gratidão!

“Lâmpada para os meus pés é a tua palavra e, luz para os meus caminhos.”

Salmo 119:105

Agradecimento à FAPESP, CAPES e CNPq

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2013/27021-8 (DR) e nº 2016/24907-3 (BEPE), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP, CAPES e CNPq.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi estruturado na forma de capítulos para uma melhor explanação do seu conteúdo.

O **capítulo I** é composto por uma fundamentação teórica dos principais assuntos abordados nos capítulos seguintes e os objetivos (geral e específicos) do presente estudo.

O **capítulo II** apresenta a purificação da fração de polissacarídeos (fração LBP) a partir das principais moléculas bioativas extraídas do fruto de *Lycium barbarum*, baseado em experimentos mono e bidimensionais de ressonância magnética nuclear. Esta fração será utilizada em todos os experimentos posteriores apresentados nos demais capítulos desta tese. O capítulo apresenta também a determinação dos resultados referentes ao potencial antioxidante pelo método DPPH, à permeação em pele de orelha suína (*in vitro*) e à aplicação isolada e associada da fração LBP e do laser vermelho na proteção da pele de camundongos *hairless* contra o fotodano gerado pela exposição artificial a radiação ultravioleta.

O **capítulo III** é composto por um estudo dos efeitos da fotobiomodulação associada a fração LBP no tratamento do fotodano induzido por radiação ultravioleta na pele do dorso de camundongos *hairless*.

A metodologia aplicada neste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar (nº040/2014) (Anexos).

RESUMO

No processo de envelhecimento ocorre uma diminuição funcional orgânica. A radiação ultravioleta (RUV), proveniente do sol, é o seu principal agente etiológico. Alterações celulares e estruturais surgem como consequência da associação entre RUV e envelhecimento cronológico. As pesquisas experimentais sobre envelhecimento devem ser desenvolvidas a partir de parâmetros que separem as características do fotoenvelhecimento do envelhecimento cronológico e da busca por modelos animais com estrutura tegumentar análoga a de humanos. Diferentes estratégias são utilizadas para a prevenção e tratamento do fotoenvelhecimento. A análise fitoquímica de muitas plantas utilizadas com esta finalidade tem demonstrado que estas contêm substâncias que apresentam efeitos antioxidantes importantes na prevenção e no tratamento do fotoenvelhecimento. A fotobiomodulação (PBM) é amplamente indicada no tratamento do fotoenvelhecimento e tem sido utilizada em diferentes intensidades para estimular ou inibir processos celulares e facilitar a absorção de substâncias utilizadas como protetoras contra danos celulares. Os efeitos moleculares da terapia por fotobiomodulação celular ainda não são completamente demonstrados e há necessidade de mais estudos que venham esclarecer estes mecanismos no processo de fotoenvelhecimento. Desta forma, a proposta deste estudo é investigar e contribuir na elucidação da ação isolada e associada do laser vermelho e do extrato do fruto de *Lycium barbarum* na prevenção e no tratamento do fotoenvelhecimento induzido na pele do dorso de camundongos *hairless*, através da identificação dos principais componentes de uma fração de polissacarídeos isolada a partir do extrato do fruto de *Lycium barbarum* (fração LBP) por ressonância magnética nuclear e das técnicas de histologia, imunohistoquímica e imunofluorescência para análises qualitativas e quantitativas de componentes da pele. Os resultados revelaram que as moléculas bioativas da fração LBP possuem um potencial antioxidante e de permeação na pele. Os tratamentos realizados com a fração LBP e a fotobiomodulação, durante a indução do fotoenvelhecimento, foram eficazes na proteção da pele contra o espessamento epidérmico em todos os grupos experimentais e a degradação das fibras de colágeno, com exceção do grupo que foi tratado primeiramente com a fração LBP e em seguida com o laser vermelho. Os tratamentos não foram capazes de reduzir os níveis de MMPs na pele dos camundongos *hairless* gerados pela RUV. Por outro lado, os tratamentos realizados após a indução do fotodano promoveram uma diminuição do espessamento da epiderme, dos níveis de c-Fos e c-Jun (AP-1) e dos níveis de expressão da MMP-1, 2 e 9 em todos os grupos experimentais. O grupo que foi tratado primeiro com a fotobiomodulação e em seguida com a fração LBP apresentou um aumento dos níveis de colágeno I, III e FGF2, sugerindo um sinergismo nesta ordem de aplicação. Os resultados sugerem a possível utilização da fração LBP em formulações cosméticas devido seu potencial antioxidante e facilitador de permeação e ainda seu uso em associação com laser vermelho para fim de tratamento fotorejuvenescedor em procedimentos estéticos.

Palavras-chave: Radiação ultravioleta. Fotodano. *Lycium barbarum*. Fração LBP. Antioxidante. Fotoproteção. Fotobiomodulação.

ABSTRACT

In the aging process an organic functional decrease occurs. Ultraviolet Radiation (UVR), from the sun, is its main etiological agent. Cellular and structural changes arise as a consequence of the association between UVR and chronological aging. Experimental research on aging should be developed from parameters that separate the characteristics of photoaging from chronological aging and the search for animal models with a tegument structure analogous to that of humans. Different strategies are used for the prevention and treatment of photoaging. The phytochemical analysis of many plants used for this purpose has been shown to contain substances that have important antioxidant effects in the prevention and treatment of photoaging. Photobiomodulation (PBM) is widely indicated in the treatment of photoaging and has been used in different intensities to stimulate or inhibit cellular processes and to facilitate the absorption of substances used as protectors against cell damage. The molecular effects of cellular photobiomodulation therapy have not yet been fully demonstrated and there is a need for further studies that elucidate these mechanisms and understand the beneficial effects of this therapy, including the photoaging process. Thus, the purpose of this study is to investigate and contribute to the elucidation of the isolated and associated action of red laser and *Lycium barbarum* fruit extract in the prevention and treatment of induced photoaging in the dorsal skin of *hairless* mice, by identifying the main components of a polysaccharide fraction isolated from the extract of the fruit of *Lycium barbarum* (LBP fraction) by nuclear magnetic resonance and the techniques of histology, immunohistochemistry and immunofluorescence for qualitative and quantitative analysis of skin components. The results revealed that the bioactive molecules of the LBP fraction have antioxidant and permeation potential in the skin. The treatments performed with the LBP fraction and photobiomodulation during photoaging induction were effective in protecting the skin from epidermal thickening in all experimental groups and degradation of collagen fibers, except for the group that was first treated with LBP fraction and then with the red laser. The treatments were not able to reduce the levels of MMPs in the skin of *hairless* mice induced by UVR. On the other hand, treatments performed after UVR-induced photodamage decreased epidermal thickening, c-Fos and c-Jun (AP-1) levels and MMP-1, 2 and 9 expression levels on the dorsal skin of the *hairless* mice of all experimental groups. The group that was treated first with the photobiomodulation and then with the LBP fraction showed an increase of the levels of collagen I, III and FGF2, suggesting a synergism in this order of application. The results suggest the possible use of the LBP fraction in cosmetic formulations due to its antioxidant and permeation potential and its use in association with red laser for the purpose of skin photorejuvenation treatment in aesthetic procedures.

Keywords: Ultraviolet Radiation. Photodamage. *Lycium barbarum*. LBP fraction. Antioxidant. Photoprotection. Photobiomodulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Diagrama esquemático que ilustra os mecanismos moleculares do Fotoenvelhecimento.....	22
FIGURA 2: Expressão de AP-1 nas diferentes camadas da pele.....	23
FIGURA 3: Relação da pigmentação cutânea com a sensibilidade à RUV.....	25
FIGURA 4: Resumo das principais atividades descritas para extratos vegetais contra danos induzidos por UVB em diferentes modelos.....	29
FIGURA 5: Representação esquemática das vias de sinalização celular desencadeadas pela PBM.....	33
FIGURA 6: Modelo tridimensional da curva de Arndt-Schulz ilustrando como o tempo de irradiância ou de iluminação (fluência) pode ter efeitos bifásicos de resposta à dose na PBM.	35
FIGURA 7: Obtenção da fração de polissacarídeos (LBP). A: Processo de liofilização. B: Material precipitado em etanol 95%.....	41
FIGURA 8: Amostras de pele dermatomizadas pinçadas entre as duas câmaras verticais de células de difusão (Tipo Franz).....	45
FIGURA 9: Amostras de pele fixadas para a remoção do estrato córneo através da técnica de <i>tape-stripping</i> com fitas adesivas de celofane.....	46
FIGURA 10: Divisão dos grupos experimentais.....	48
FIGURA 11: A: Lâmpada incandescente - <i>Ultra-Vitalux 300 W</i> (OSRAM, Augsburg, Alemanha), B: Exposição dos animais à lâmpada incandescente (indução do fotoenvelhecimento).....	49
FIGURA 12: Espectro de irradiância da lâmpada incandescente <i>Ultra-Vitalux 300 W</i> (OSRAM, Augsburg, Alemanha), obtido a 70 cm de distância do sensor de fibra óptica.....	50

FIGURA 13: Equipamento de laser vermelho – 660 nm, utilizado para o tratamento dos animais e molde de EVA utilizado para a padronização da aplicação do laser (6 pontos).....	51
FIGURA 14: Espectro Ultravioleta da fração de LBP, apresentando baixa absorbância na faixa dos 280 nm, sugerindo a ausência de proteína na fração de interesse (LBP).	55
FIGURA 15: Espectro de RMN de ¹ H da fração de LBP (D ₂ O com aquecimento).....	56
FIGURA 16: Espectro de RMN de ¹³ C da fração de LBP. (D ₂ O com aquecimento).....	56
FIGURA 17: Espectro de RMN 2D da fração de LBP em D ₂ O, COSY.....	58
FIGURA 18: Espectro de RMN 2D da fração de LBP em D ₂ O, TOCSY.....	59
FIGURA 19: Mapa de contorno de RMN 2D da fração de LBP em D ₂ O, HMBC.	59
FIGURA 20: Mapa de contorno de RMN 2D da fração de LBP em D ₂ O, HSQC.....	60
FIGURA 21: Ensaio antioxidante da fração LBP através do método DPPH.	61
FIGURA 22: Ensaio <i>in vitro</i> de permeação das formulações HEC+ROD e HEC+ROD+LBP em diferentes camadas como: estrato córneo (EC), epiderme mais derme (EP+D) e solução receptora de amostras de pele de orelha suína por células de difusão (Tipo Franz).	62
FIGURA 23: Distribuição do fluoróforo rodamina B nas camadas da pele de orelha suína em experimento <i>in vitro</i>	63
FIGURA 24: Espessura da epiderme após tratamentos realizados durante a indução do fotoenvelhecimento.....	64
FIGURA 25: Potencial fotoprotetor da fração LBP e do laser vermelho.....	65
FIGURA 26: Fotomicrografias de secções coradas com micro-sirius.	66
FIGURA 27: Porcentagem de fibras colágenas birrefringentes (%) na pele dorsal de camundongos <i>hairless</i>	67
FIGURA 28: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para a marcação da enzima MMP-1.....	68
FIGURA 29: Análise quantitativa da expressão da enzima MMP-1.....	68

FIGURA 30: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para a marcação da enzima MMP-2.....	69
FIGURA 31: Análise quantitativa da expressão da enzima MMP-2.....	70
FIGURA 32: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para a marcação da enzima MMP-9.....	71
FIGURA 33: Análise quantitativa da expressão da enzima MMP-9.....	71
FIGURA 34: Divisão dos grupos experimentais.....	83
FIGURA 35: Fotomicrografias para análise estrutural (HE) da pele fotoenvelhecida de camundongos <i>hairless</i> dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. .	90
FIGURA 36: Espessura da epiderme após os tratamentos realizados na pele fotodanificada.	91
FIGURA 37: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise da expressão dos níveis de p (c-Fos) (marcado em verde) nas amostras de pele dos camundongos <i>hairless</i> dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 µm.....	92
FIGURA 38: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise da expressão dos níveis de p (c-Jun) (marcado em verde) nas amostras de pele dos camundongos <i>hairless</i> dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 µm.....	92
FIGURA 39: Análise quantitativa dos níveis de expressão do fator nuclear p (c-Fos) e p (c- Jun) após a indução do fotoenvelhecimento e aplicação dos tratamentos.....	93
FIGURA 40: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise dos níveis de expressão da enzima MMP-1 (marcado em rosa) nas amostras de pele dos camundongos <i>hairless</i> dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 µm. ..	94
FIGURA 41: Análise quantitativa dos níveis de expressão da enzima MMP-1 após a indução do fotoenvelhecimento e aplicação dos tratamentos.	94

FIGURA 42: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise dos níveis de expressão da enzima MMP-2 (marcado em amarelo) nas amostras de pele dos camundongos <i>hairless</i> dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 µm. ...	95
FIGURA 43: Análise quantitativa dos níveis de expressão da enzima MMP-2 após a indução do fotoenvelhecimento e aplicação dos tratamentos.	96
FIGURA 44: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise dos níveis de expressão da enzima MMP-9 (marcado em verde) nas amostras de pele dos camundongos <i>hairless</i> dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 µm. ...	96
FIGURA 45: Análise quantitativa dos níveis de expressão da enzima MMP-9 após a indução do fotoenvelhecimento e aplicação dos tratamentos.	97
FIGURA 46: Fotomicrografias da técnica de imunohistoquímica para análise dos níveis de expressão de Colágeno I (COL I), III (COL III) e FGF2 (marcados em marrom) em amostras de pele dos camundongos <i>hairless</i> dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 µm.	99
FIGURA 47: Análise quantitativa dos níveis de expressão de colágeno I (COL I), após a indução do fotoenvelhecimento e subsequente aplicação dos tratamentos.....	100
FIGURA 48: Análise quantitativa dos níveis de expressão de colágeno III (COL III), após a indução do fotoenvelhecimento e subsequente aplicação dos tratamentos.....	100
FIGURA 49: Análise quantitativa dos níveis de expressão de FGF2, após a indução do fotoenvelhecimento e subsequente aplicação dos tratamentos.	101
FIGURA 50: Esquema de indução do fotodano gerado pela radiação ultravioleta (RUV)..	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN.....	42
TABELA 2: Informações sobre os anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência e sua metodologia de incubação.....	53
TABELA 3: Determinação das principais unidades glicosídicas e ácidos graxos de cadeia longa que compõem a fração LBP.	58
TABELA 4: Parâmetros utilizados para o tratamento dos animais com fotobiomodulação. Equipamento de Laser – Photon Lase III (DMC, São Carlos/SP, Brasil). InGaAlP = Índio, Gálio, Alumínio e Fósforo..	85
TABELA 5: Informações sobre os anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência e sua metodologia de incubação.....	86
TABELA 6: Informações sobre os anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica e sua metodologia de incubação.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

¹³C - Carbono

¹H - Hidrogênio

ARE - Elemento Responsivo Antioxidante (*Antioxidant Responsive Element*)

ATP - Adenosina Trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)

Cdc42 - Controle da divisão celular pela proteína homóloga 42 (*Cell division control by 42 homolog protein*)

CO₂ - Gás Carbônico

COSY - Espectroscopia de Correlação (*Correlation Spectroscopy*)

COX-2 - Ciclo-Oxigenase-2

D₂O - Óxido de Deutério (*Deuterium Oxide*)

DAB - Diaminobenzidina (*Diaminobenzidine*)

DAPI - Dicloreto de Diaminofenilindol (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride*)

DMSO - Dimetil Sulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DPPH - 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FE - Fotoenvelhecimento

GSH-Px - Glutationa Peroxidase

GTP - Guanosina Trifosfatases (*Guanosine Triphosphatases*)

HaCaT - Queratinócitos Humano Imortalizados (*Immortalized Human Keratinocyte*)

HEC - Hidroxietilcelulose

HMBC - Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)

HSF - Fibroblastos da Pele Humana (*Human Skin Fibroblasts*)

HSQC - Coerência Quântica Única Heteronuclear (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)

LBP - Fração de Polissacarídeos extraídos do fruto de *Lycium barbarum* (*Lycium Barbarum Polysaccharides*)

LED - Diodo Emissor de Luz (*Light Emitting Diode*)

MAPKs - Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinases*)

MDA - Malondialdeído

Nrf2 - Fator Nuclear Derivado de Eritrócitos 2 (*Nuclear fator erythroid-derived 2*)

PBM - Fotobiomodulação (*Photobiomodulation*)

PBS - Tampão Salina-Fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN 1D - Ressonância Magnética Nuclear monodimensional

RMN 2D - Ressonância Magnética Nuclear bidimensional

SOD - Superóxido Dismutase

TBS - Solução Salina Tris Tamponada (*Tris Buffered Saline*)

TOCSY - Espectroscopia de Correlação Total (*Total Correlation Spectroscopy*)

TPA - 12-O-Tetradecanoilforbol 13-acetato (*12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate*)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
1.1 A pele.....	19
1.1.1 Características e funções	19
1.1.2 Envelhecimento intrínseco e extrínseco	19
1.2.1 Patofisiologia	21
1.2.2 Fototipo de pele versus fotodano	24
1.2.3 Fotoenvelhecimento - Modelos experimentais <i>in vivo</i>	26
1.3 Prevenção e tratamento do fotoenvelhecimento	27
1.3.1 Prevenção da penetração da RUV (Bloqueadores).....	27
1.3.2 Antioxidantes e extratos naturais	28
1.3.3 Fotorejuvenescimento	30
1.4 <i>Lycium barbarum</i>.....	30
1.4.1 Botânica e fitoquímica	30
1.4.2 Fração de polissacarídeos do extrato bruto de <i>Lycium barbarum</i> (LBP).....	31
1.5 Fotobiomodulação.....	32
1.5.1 Mecanismo de ação.....	32
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Objetivos específicos	36

CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO BASEADA EM RMN DAS PRINCIPAIS MOLÉCULAS BIOATIVAS DA FRAÇÃO LBP E SEUS EFEITOS DE PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> E DE PREVENÇÃO DO FOTODANO CUTÂNEA <i>IN VIVO</i> ASSOCIADO À FOTOBIMODULAÇÃO	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1 Aquisição do fruto de <i>Lycium barbarum</i>	40
2.2 Obtenção do extrato de polissacarídeos do fruto de <i>Lycium barbarum</i>	40
2.3 Espectro Ultravioleta da fração LBP	41
2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C da fração LBP e experimentos bidimensionais	41
2.5 Determinação da atividade antioxidante da fração LBP pelo método do radical DPPH.....	43
2.6 Formulação gel de LBP a 5%	44
2.7 Análise da permeação cutânea <i>in vitro</i> da fração LBP por Fluorometria e Microscopia Confocal de Fluorescência.....	44
2.8 Animais e divisão dos grupos experimentais.....	47
2.9 Indução do fotoenvelhecimento.....	48
2.10 Realização dos tratamentos	50
2.11 Processamento Histológico	52
2.12 Análise Histológica.....	52
2.13 Imunofluorescência	53

2.14	Quantificação dos marcadores da técnica de Imunofluorescência.....	54
2.15	Análise estatística.....	54
3.	RESULTADOS.....	55
3.1	Espectro Ultravioleta da fração LBP	55
3.2	Determinação da estrutura do polissacarídeo extraído do fruto de <i>Lycium barbarum</i> (fração LBP).....	55
3.3	Ensaio antioxidante da fração LBP pelo método do radical DPPH.....	60
3.4	Análise da penetração da rodamina em modelos de células de difusão (<i>in vitro</i>)	61
3.5	Distribuição da rodamina na pele por Microscopia Confocal de Fluorescência	62
3.6	Análise histológica.....	63
3.7	Imunofluorescência das enzimas MMP-1, 2 e 9.....	67
4.	DISCUSSÃO	72
CAPÍTULO III - APLICAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A FRAÇÃO LBP NO TRATAMENTO DO FOTODANO INDUZIDO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA PELE DO DORSO DE CAMUNDONGOS <i>HAIRLESS</i>.....		
1.	INTRODUÇÃO	80
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	83
2.1	Animais e divisão dos grupos.....	83
2.2	Indução do fotoenvelhecimento	84
2.3	Tratamentos	84
2.4	Histologia.....	85

2.5	Imunofluorescência.....	85
2.6	Imunohistoquímica	86
2.7	Análise estatística.....	88
3.	RESULTADOS.....	89
3.1	Análise histológica.....	89
3.2	Imunofluorescência das p (c-Fos) e p (c-Jun)	91
3.3	Imunofluorescência das enzimas MMP-1, 2 e 9	93
3.4	Imunohistoquímica do Colágeno I, III e FGF2.....	97
4.	DISCUSSÃO	102
	CONSIDERAÇÕES FINAIS/ CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS.....	111
	APÊNDICE.....	120
	ANEXOS.....	122

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 A pele

1.1.1 Características e funções

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 15% do peso corporal total em adultos. Exerce múltiplas funções vitais de proteção contra agressões ambientais como a radiação ultravioleta (RUV), infravermelha e luz visível emitidos pelo espectro solar, poluição ambiental, produtos químicos, lesões mecânicas e perda interna de água. Essas funções garantem a proteção de todos os sistemas biológicos, graças a uma estrutura elaborada, associando tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica, como tecido epitelial, conectivo, vascular, muscular e nervoso. A pele é disposta em três camadas, incluindo (da região externa para a interna) a epiderme e seus apêndices (foliculos pilossebáceos e glândulas sudoríparas), a derme e a hipoderme. A fina estrutura da pele apresenta variações regionais no que diz a sua espessura (variando de 1 a 4 mm), distribuição de apêndices epidérmicos, densidade de melanócitos, entre outras. A pele é uma estrutura flexível que permite o movimento e se torna uma barreira que isola os órgãos internos do microbioma externo, desempenhando um papel essencial na proteção imunológica da pele por ser uma barreira física (Kanitakis 2002, Serre, Busuttill *et al.* 2018).

1.1.2 Envelhecimento intrínseco e extrínseco

O envelhecimento da pele é um processo contínuo, resultado de dois mecanismos sinérgicos: intrínseco ou cronológico, um processo que ocorre em todos os tecidos biológicos, decorrente da passagem do tempo; e o extrínseco ou fotoenvelhecimento, que é causado pela exposição repetitiva da pele a agentes nocivos, especialmente da radiação proveniente do espectro solar (QUADRO 1) (Naylor, Watson *et al.* 2011, Vierkotter e Krutmann 2012). Em geral, a pele envelhecida apresenta um desequilíbrio entre a perda adequada e o reabastecimento

de seus componentes estruturais e funcionais. A estrutura das fibras cutâneas é a mais severamente afetada pelo envelhecimento, e sua degeneração leva a uma perda gradual do suporte tecidual com um consequente impacto estético (Weihermann, Lorencini *et al.* 2017). Alterações provenientes desses mecanismos, como modificações do tecido conjuntivo, acúmulo progressivo de fibrócitos senescentes, levando a uma redução subsequente da produção e conteúdo de colágeno na pele, são as principais vias relacionadas ao envelhecimento cutâneo. Adicionalmente, uma excessiva geração e acúmulo de superóxidos, promove à superprodução local de metaloproteinases de matriz como resultado de inflamação ou RUV (Kruglikov e Scherer 2016).

QUADRO 1: Mudanças histológicas e clínicas observadas no envelhecimento intrínseco e extrínseco.

CARACTERÍSTICAS	ENVELHECIMENTO INTRÍNSECO	ENVELHECIMENTO EXTRÍNSECO
HISTOLÓGICAS	Fibras colágenas delgadas, curtas e desorganizadas	Elastose
	Atrofia epidérmica	Fragmentação de colágeno
	Achatamento da junção epidérmico-dérmica	Espessura epidérmica irregular
	Redução de melanócitos, mastócitos e Langerhans	Aumento dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos
		Aumento dos marcadores inflamatórios (mastócitos, eosinófilos e células mononucleares)
		Melanogênese
CLÍNICAS	Pele fina	Pele atrófica e coriácea
	Rugas finas	Rugas grosseiras
	Xerose	Lentigos
	Frouxidão	Telangiectasia
	Angioma	Alterações na pigmentação
	Queratoses seborréicas	Dermatite induzida pelo sol

Fonte: Quadro extraído e adaptado de Poon, Kang et al. 2015.

1.2 Fotoenvelhecimento

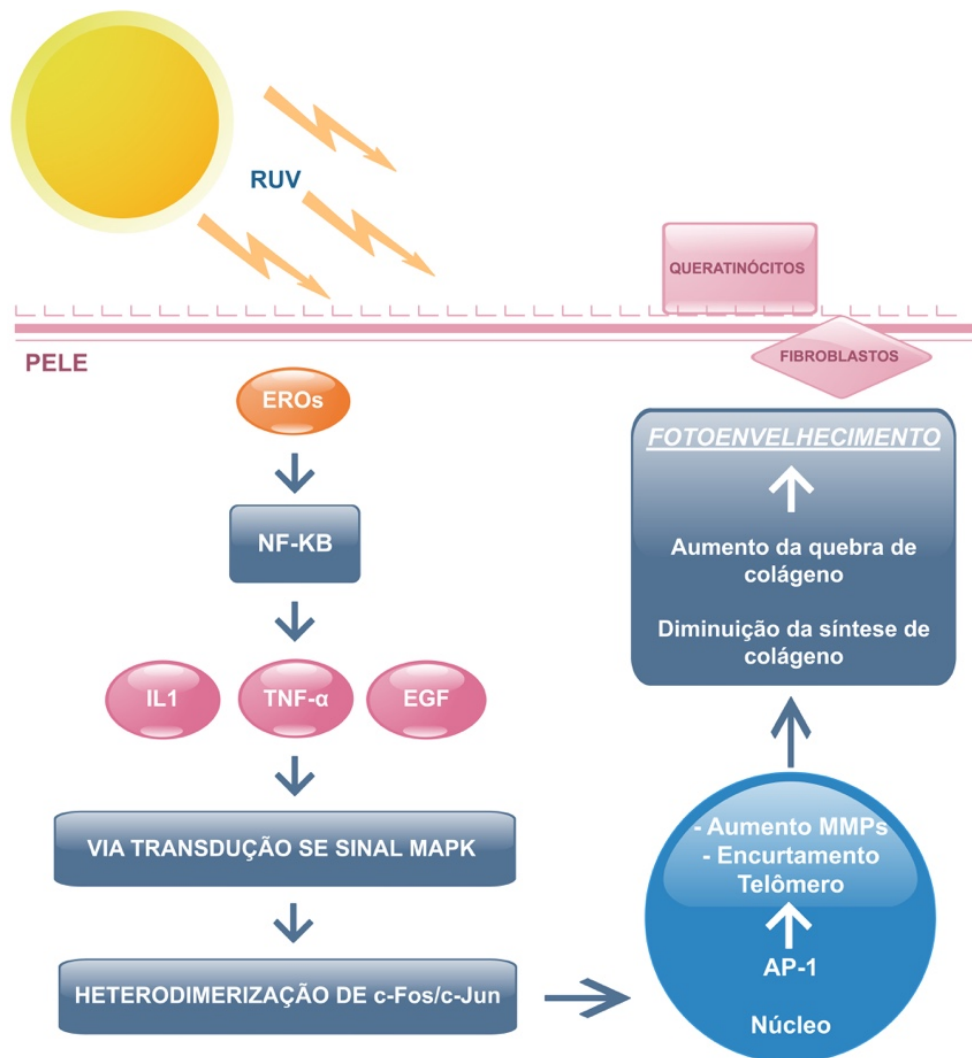
1.2.1 Patofisiologia

O fotoenvelhecimento ou dermoeliose é um processo pelo qual os raios ultravioleta de luz solar ou outros tipos de luz artificial, como lâmpadas incandescentes e fluorescentes, induzem gradualmente alterações clínicas e histológicas na pele (Romanhole, Ataide *et al.* 2015). Os efeitos negativos do fotoenvelhecimento sobre a pele humana são geralmente associados à radiação UVA e UVB (Akhalya, Maksimov *et al.* 2014). A radiação UVB é caracterizada como um agente mutagênico e indutor de câncer, pois causa danos diretos ao DNA. A radiação UVA tem um maior taxa de penetração, atinge as camadas mais internas da pele e está associada principalmente à indução do estresse oxidativo, embora estudos recentes tenham indicado um papel no desenvolvimento do câncer (Amaro-Ortiz, Yan *et al.* 2014).

A radiação ultravioleta induz o fotoenvelhecimento da pele através de sua adsorção repetitiva, danificando diretamente as biomoléculas cutâneas que são ricas em cromóforos. O mecanismo que compreende este processo envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que em excesso são prejudiciais à pele e podem causar danos oxidativos às células e aos componentes da matriz extracelular (MEC) (Naylor, Watson *et al.* 2011). Concentrações mais altas de EROs podem causar danos às moléculas de DNA, ácidos graxos, carboidratos e proteínas, incluindo colágeno e elastina (Rinnerthaler, Bischof *et al.* 2015). Como consequência, uma ativação do fator nuclear kappa-B, por EROs, induz a expressão de citocinas de superfície celular, como a interleucina 1 (IL1), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em queratinócitos e células dermais (Senftleben e Karin 2002, Ruland e Mak 2003). Essa indução supracitada regula positivamente a via de transdução de sinal das quinases ativadas por mitógeno (MAPK), gerando uma transdução de sinal a jusante, onde fatores de transcrição c-Fos e c-Jun passam por heterodimerização, com a subsequente formação de AP-1. Um aumento na expressão de metaloproteinases de matriz

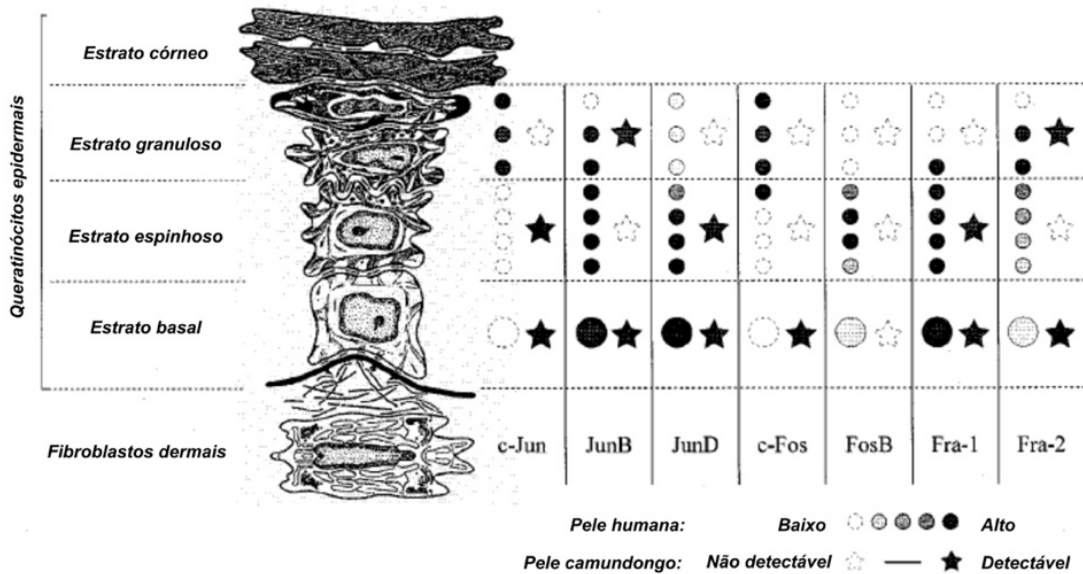
ocorre, estimulando a degradação da MEC dérmica, especialmente de procolágeno I e III (Fisher, Kang *et al.* 2002). Concomitantemente, uma redução na síntese de colágeno é observada devido a inibição do receptor de fator de crescimento de transformação beta II (TGF β II) na pele fotoenvelhecida após a exposição a RUV (FIGURA 1) (Quan, He *et al.* 2002).

FIGURA 1: Diagrama esquemático que ilustra os mecanismos moleculares do Fotoenvelhecimento.



Fonte: Figura extraída e adaptada de Poon, Kang *et al.* 2015.

FIGURA 2: Expressão de AP-1 nas diferentes camadas da pele.



Fonte: Figura extraída e adaptada de Angel, Szabowski et al. 2001.

Com o avanço da idade, ocorre um acúmulo de danos oxidativos na pele, devido ao aumento de EROs gerados pela RUV. Estudos relataram que níveis aumentados do fator nuclear AP-1 (FIGURA 2) e da atividade das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são encontrados na pele envelhecida e esses mecanismos promovem uma regulação da produção e degradação do colágeno (Chung, Kang *et al.* 2000, Fisher, Kang *et al.* 2002). As MMPs são endopeptidases contendo zinco que possuem uma ampla gama de especificidades de substrato. As ações combinadas de MMP-1 (colagenase), 3 (stromelisin) e 9 (gelatinase) têm a capacidade de degradar a maioria das proteínas que compõem a matriz extracelular dérmica (Quan, Qin *et al.* 2009, Kim, Lee *et al.* 2011). São secretadas por queratinócitos e fibroblastos dérmicos em resposta a múltiplos estímulos, como estresse oxidativo, radiação e citocinas (Hwang, Choi *et al.* 2012, Ham, Yoo *et al.* 2014). Até o momento, pelo menos 28 tipos de MMPs foram identificadas, as quais exercem influência em vários processos fisiopatológicos, incluindo fotoenvelhecimento, cicatrização de feridas, crescimento e remodelamento

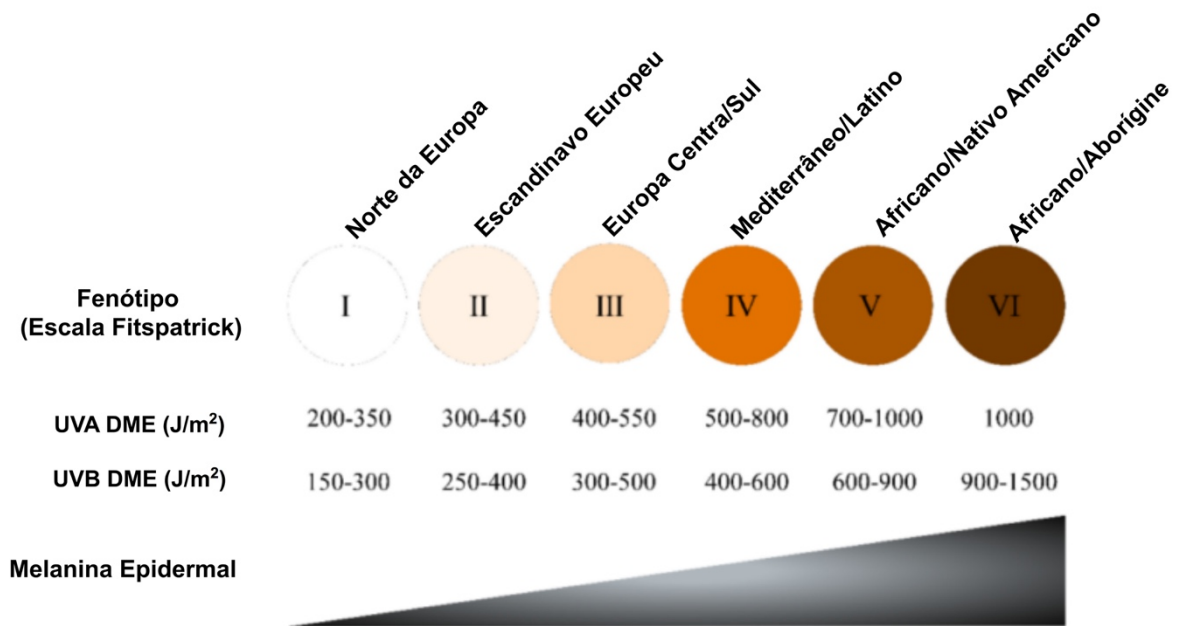
esquelético, artrite, inflamação, angiogênese e câncer (Quan, Qin *et al.* 2009, Jung, Lee *et al.* 2010, Sbardella, Fasciglione *et al.* 2012).

As alterações na pele da face e do pescoço são mais evidentes e uma das maiores queixas dos pacientes na dermatologia. Essas alterações, como rugosidade, pigmentação irregular, telangiectasia, rugas profundas e neoplasia, são frutos de uma combinação de envelhecimento intrínseco e extrínseco; entretanto, foi sugerido que 80% do envelhecimento da pele facial seja devido à exposição solar (Gilchrest 1989). O envelhecimento prematuro da pele é consequência de um processo cumulativo que afeta principalmente o fototipo de pele mais clara (Fisher, Kang *et al.* 2002). As alterações associadas ao fotoenvelhecimento ocorrem tanto na epiderme quanto na derme (Menter, Sayre *et al.* 1996, Scharffetter-Kochanek, Wlaschek *et al.* 1997).

1.2.2 Fototipo de pele versus fotodano

Uma escala semi-quantitativa, denominada “Escala Fitzpatrick”, é composta por seis fototipos de pele (relacionados a pigmentação) e foi desenvolvida na década de 1970 pelo Dr. Thomas B. Fitzpatrick. A escala descreve a relação da cor da pele (pigmentação) com a sensibilidade à RUV. Um método quantitativo (dose mínima eritematosa - DME) é usado para informar a quantidade de RUV, especialmente a RUVB, necessária para induzir queimaduras solares na pele de 24 a 48 horas após a exposição, usando o eritema e o edema como pontos de extremidade. A figura 3 representa o fenótipo de pele segundo a “escala Fitzpatrick” e sua correlação com a DME, com os riscos de surgimento de um melanoma ou outros tipos de câncer da pele (Perez-Sanchez, Barrajon-Catalan *et al.* 2018).

FIGURA 3: Relação da pigmentação cutânea com a sensibilidade à RUV.



Fonte: Figura extraída e adaptada de Perez-Sanchez, Barrajon-Catalan et al. 2018.

Alguns efeitos da RUV que diferem devido aos diferentes fototipos de pele são: fotodano no DNA, infiltração de células inflamatórias, indução de enzimas proteolíticas associadas ao fotoenvelhecimento, proliferação de queratinócitos e imunossupressão (Rijken, Bruijnzeel *et al.* 2004) Um estudo descreveu as diferenças na distribuição de danos no DNA induzidos pela RUV entre indivíduos com fototipo I e II e os de fototipo V e VI. No entanto, fotoprodutos de DNA restringiram-se a células pós-mitóticas na parte superior da epiderme (Fisher, Kang *et al.* 2002). A pele negra possui uma maior proteção contra o fotodano gerado pela RUV, como as queimaduras solares (exposição aguda), o fotoenvelhecimento e a carcinogênese (exposição crônica) do que a pele branca (Rijken, Bruijnzeel *et al.* 2004). O pigmento da pele parece aumentar a dose limite da radiação, induzindo uma resposta inflamatória na pele. Isto é confirmado pelos dados que mostram que a DME de indivíduos de

pele negra é um fator 2-10 maior que o de indivíduos de pele branca (fototipo VI comparado com o I-III) (Fitzpatrick 1988).

1.2.3 Fotoenvelhecimento - Modelos experimentais *in vivo*

Não apenas os camundongos transgênicos são amplamente empregados nos estudos do fotoenvelhecimento da pele, mas também uma variedade de outros modelos animais tem sido empregada para imitar condições da pele humana e patologias (Avci, Sadasivam *et al.* 2013).

Os camundongos C57BL/6J, SKH1 e BALB/c são as três principais linhagens utilizadas em estudo de fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. Sharma *et al.* (2011) investigaram essas três linhagens de animais para um potencial uso como modelo experimental para estudos de fotodano agudo induzido. Os autores testaram estas três estirpes como um modelo experimental para estudos de fotodano agudo. Os animais foram expostos à RUVB e avaliados logo após 3 e 20 horas da fotoexposição. Os achados revelaram que a pele da linhagem C57BL/6J apresentou características semelhantes as do fotoenvelhecimento, como o espessamento epidérmico, infiltração da derme com células inflamatórias, indução de mRNA para TNF- α , acúmulo de glicosaminoglicanos e perda de colágeno. A linhagem SKH1 respondeu similarmente; no entanto, não houve indução de mRNA para TNF- α ou sulfato de condroitina. Por outro lado, a linhagem BALB/c demonstrou menos semelhanças com a pele humana nas respostas à RUVB (Sharma, Werth *et al.* 2011).

Camundongos e cobaias são amplamente usados em ensaios para o desenvolvimento de novos compostos com efeito fotoprotetor. Entre os modelos de camundongos, o *hairless*, principalmente albino, é preferido devido a algumas vantagens sobre outras linhagens de camundongos e por possuir uma similaridade com a pele humana. Devido a incapacidade destes animais de produzir pigmentos, eles se tornam altamente suscetíveis ao câncer de pele e possibilitam mensurações diretas dos efeitos de filtros de proteção solar (Kim, Ananthaswamy *et al.* 2003).

A linhagem HRS/J vem sendo usada como modelo experimental de indução artificial de fotodano. Um estudo avaliou os efeitos de uma formulação de proteção solar sobre a pele de camundongos HRS/J submetidos à simulação da luz solar (Hossy, da Costa Leitao *et al.* 2013). Outro estudo investigou o efeito fotoquimioprotetor de uma fração proveniente de um extrato particionado de folhas de *Byrsonima crassifolia* em animais da linhagem HRS/J expostos a RUVB (de Souza, de Assis Dias Alves *et al.* 2018). Assim, o uso desta linhagem de animais *hairless* em estudos de avaliação do fotodano e possíveis fotoprotetores ou fotorejuvenecedores é crescente e eficaz.

1.3 Prevenção e tratamento do fotoenvelhecimento

A evolução do crescimento médico e populacional tem promovido uma correlação direta com o aumento do número de pessoas de meia-idade e idosas. Medidas dermatológicas, tanto preventivas quanto para a restauração da pele, também têm aumentado, levando a uma significativa demanda por tratamentos antienvelhecimento. Assim, a busca pelo desenvolvimento de alternativas terapêuticas que promovam esses efeitos e a elucidação dos complexos mecanismos biológicos que participam do envelhecimento cutâneo representam questões atuais e significativas que podem impulsionar ainda mais o mercado cosmético dermatológico, já tão promissor atualmente (Weihermann, Lorencini *et al.* 2017).

1.3.1 Prevenção da penetração da RUV (Bloqueadores)

Uma estratégia preventiva e primária contra os danos gerados pela RUV é a fotoproteção. Boas medidas de proteção incluem uma combinação do uso de roupas de proteção solar, aplicação de protetor solar e prevenção de exposição ao sol durante o período com os maiores índices de RUV. Protetores solares são grandes componentes primários para a prevenção do fotoenvelhecimento. Estes produtos podem ser divididos em dois grandes grupos:


orgânicos (ou agentes químicos) que absorvem fótons específicos de RUV e inorgânicos (ou bloqueadores físicos) que refletem e espalham a RUV (Poon, Kang *et al.* 2015). Em 2012, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou um regulamento técnico que se aplica aos produtos cosméticos destinados à proteção solar da pele e aos produtos multifuncionais. Tal regulamento tem o objetivo de estabelecer as definições, os requisitos técnicos, os critérios de rotulagem e os métodos de avaliação de eficácia relacionados a estes produtos e também assegurar a sua eficácia garantindo um elevado nível de proteção da saúde pública. Por fim, o regulamento também visa estabelecer critérios de rotulagem simples e compreensíveis para orientar o consumidor na escolha do produto adequado (ANVISA, 2012). O regulamento também definiu o método de comprimento de onda crítico, como aquele para o qual a área sob a curva de densidade ótica que começa em 290 nm é igual a 90% da área integrada entre 290 e 400 nm no espectro de UV. Para um protetor solar ser rotulado como de “amplo espectro” o comprimento de onda crítico tem que ser maior ou igual a 370 nm. Independentemente do tipo de filtro solar, o mais importante fator para a eficácia do protetor é a quantidade total de filtro solar aplicado na pele, seguido pela uniformidade da aplicação e do espectro de absorção específico do agente usado (Lautenschlager, Wulf *et al.* 2007).





1.3.2 Antioxidantes e extratos naturais

A fotoproteção química e biológica continua sendo um grande desafio para as indústrias farmacêutica e cosmética (Kostyuk, Potapovich *et al.* 2018). Extratos de plantas e compostos naturais são tradicionalmente utilizados no tratamento de patologias da pele, bem como formulações cosméticas rejuvenescedoras e fotoprotetoras. A crescente demanda no mercado consumidor por cosméticos naturais justifica a busca por propriedades bioativas e a avaliação da eficácia destes produtos para combater os efeitos prejudiciais gerados pela RUV (Cavinato, Waltenberger *et al.* 2017).

Suplementos botânicos têm sido estudados para fins de uso na prevenção do fotodano na pele gerado pela RUV. Alguns se destacam em seus efeitos protetores, como a *Galla chinensis*, bem conhecida por suprimir significativamente a expressão de EROs e MMP-1 induzida por RUVB em fibroblastos dérmicos humanos e os níveis de MMP-1 na pele de camundongos *hairless* e por reduzir a espessura e formação de rugas, aumentando a elasticidade da pele (Sun, Hwang *et al.* 2015). Membros da família *Rubiaceae*, como *Coffea arabica*, *Ixora parviflora* e *Neonauclea reticulata*, demonstraram efeitos anti-fotoenvelhecimento, resultando na inibição dos níveis de expressão de MMP-1, 3 e 9 (Chiang, Lin *et al.* 2011, Wen, Fan *et al.* 2012, Chiang, Chen *et al.* 2013). Cavinato *et al.* (2017) resumiram as principais atividades de alguns extratos vegetais contra o fotodano induzido pela RUVB em diferentes modelos experimentais (FIGURA 4).

FIGURA 4: Resumo das principais atividades descritas para extratos vegetais contra danos induzidos por UVB em diferentes modelos.



 Queratinócitos	 Fibroblastos	 Hairless mice	 Humanos
<p><u>Anti-inflamatório:</u> <i>aspalathus linearis</i> <i>cyclopia meyeriana</i> bergamota laranja ginseng vermelho</p> <p><u>Anti-apoptótico:</u> <i>cyclopia meyeriana</i></p> <p><u>Atioxidante:</u> toranja café torrado</p> <p><u>Modulação da MEC:</u> café torrado</p> <p><u>Proliferação celular:</u> toranja</p>	<p><u>Anti-inflamatório:</u> <i>angelica archangelica</i> <i>foeniculum vulgare</i></p> <p><u>Modulação da MEC:</u> <i>angelica archangelica</i> <i>foeniculum vulgare</i> soja ginseng branco</p> <p><u>Atioxidante:</u> <i>angelica archangelica</i> <i>foeniculum vulgare</i></p> <p><u>Proliferação celular:</u> toranja</p>	<p><u>Anti-inflamatório:</u> soja</p> <p><u>Atioxidante:</u> <i>cyclopia meyeriana</i></p> <p><u>Modulação da MEC:</u> <i>foeniculum vulgare</i> ginseng branco ginseng vermelho café torrado</p> <p><u>Melhora na aparência da pele:</u> <i>foeniculum vulgare</i> ginseng branco ginseng vermelho café torrado</p>	<p><u>Melhora na aparência da pele:</u> <i>aspalathus linearis</i></p>

Fonte: Figura extraída e adaptada de Cavinato, Waltenberger et al. 2017.

1.3.3 Fotorejuvenescimento

Existem duas abordagens principais no gerenciamento atual do fotoenvelhecimento, as quais incluem estratégias de prevenção e tratamento do fotodano. Produtos que tentam reverter os danos existentes na pele, como retinóides tópicos, 5-fluorouracil e cosmeceúticos em geral, têm sido amplamente investigados (Poon, Kang *et al.* 2015).

Um avanço na variedade de técnicas e no desenvolvimento de produtos cosméticos tem resultado em melhorias na aparência da pele e favorecido a manutenção de características como nutrição, boa textura, hidratação e integridade da matriz dérmica envelhecida (Roy, Sahu *et al.* 2013). Estudos crescentes sobre a fisiologia da pele como um sistema biológico ativo vêm trazendo um maior entendimento sobre o quanto pode ser influenciado por aplicações tópicas, concomitantemente com a descoberta de novos ingredientes ativos e veículos de formulação, promovendo o desenvolvimento de produtos mais eficazes (Dreno, Araviiskaia *et al.* 2014).

Agentes físicos também são empregados como coadjuvantes para melhorar aspectos da pele fotodanificada. Nos últimos 15 anos, a Terapia Fotodinâmica (PDT) tópica também demonstrou ser um método possível para o fotorejuvenescimento, a técnica parece mostrar excelente eficácia e tolerância da pele a curto prazo (Le Pillouer-Prost e Cartier 2016). Também a terapia de fotobiomodulação, no comprimento de onda do vermelho e infravermelho, geralmente é usada a fim de modular a atividade biológica em diferentes tecidos (Tsai e Hamblin 2017), como será descrito em maior detalhe no item 5.

1.4 *Lycium barbarum*

1.4.1 Botânica e fitoquímica

Lycium barbarum L. é um arbusto da família *Solanaceae*, amplamente distribuído nas regiões áridas e semiáridas do nordeste da China, sudeste da Europa e as áreas do Mediterrâneo.

O fruto de *L. barbarum*, também chamado Goji berry ou Wolfberry, é utilizado na medicina tradicional chinesa há mais de 2300 anos na Ásia Oriental (Xin, Wan *et al.* 2011).

As bagas do fruto são consumidas em sopas, com mingau, arroz e também adicionadas a numerosos pratos feitos com carnes e vegetais. Os frutos são colhidos de agosto a outubro e geralmente são desidratados, mas também podem ser consumidos frescos, como as folhas jovens que são muito valorizadas. Recentemente, também tem sido amplamente comercializado como alimento de saúde e remédio antienvelhecimento nos países ocidentais e os produtos vendidos fora da Ásia contêm, de acordo com os fornecedores, exclusivamente bagas de *Lycium barbarum* (Potterat 2010).

1.4.2 Fração de polissacarídeos do extrato bruto de *Lycium barbarum* (LBP)

Muitos estudos sobre farmacologia e fitoquímica do fruto desta planta demonstraram que *L. barbarum* apresenta uma grande quantidade de polissacarídeos, sendo estes um dos seus principais ingredientes ativos com efeitos antioxidantes (Liang, Jin *et al.* 2011, He, Yang *et al.* 2012), na imunomodulação (Zhang, Zhou *et al.* 2011) e antitumorais (Mao, Xiao *et al.* 2011). A análise fitoquímica também demonstrou outros constituintes incluindo hidratos de carbono, carotenoides, flavonoides, aminoácidos, vitaminas e outros componentes (Potterat 2010). Zhang *et al* (2015) identificaram através de análise por cromatografia gasosa dois tipos de frações de polissacarídeos isoladas do fruto de *Lycium barbarum*. A fração nomeada LBP-d era composta por oito tipos de monossacarídeos: fucose, ribose, ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose e glicose, enquanto que a nomeada LBP-e era composta por seis tipos de monossacarídeos: fucose, ramnose, arabinose, manose, galactose e glicose (Zhang, Lv *et al.* 2015).

1.5 Fotobiomodulação

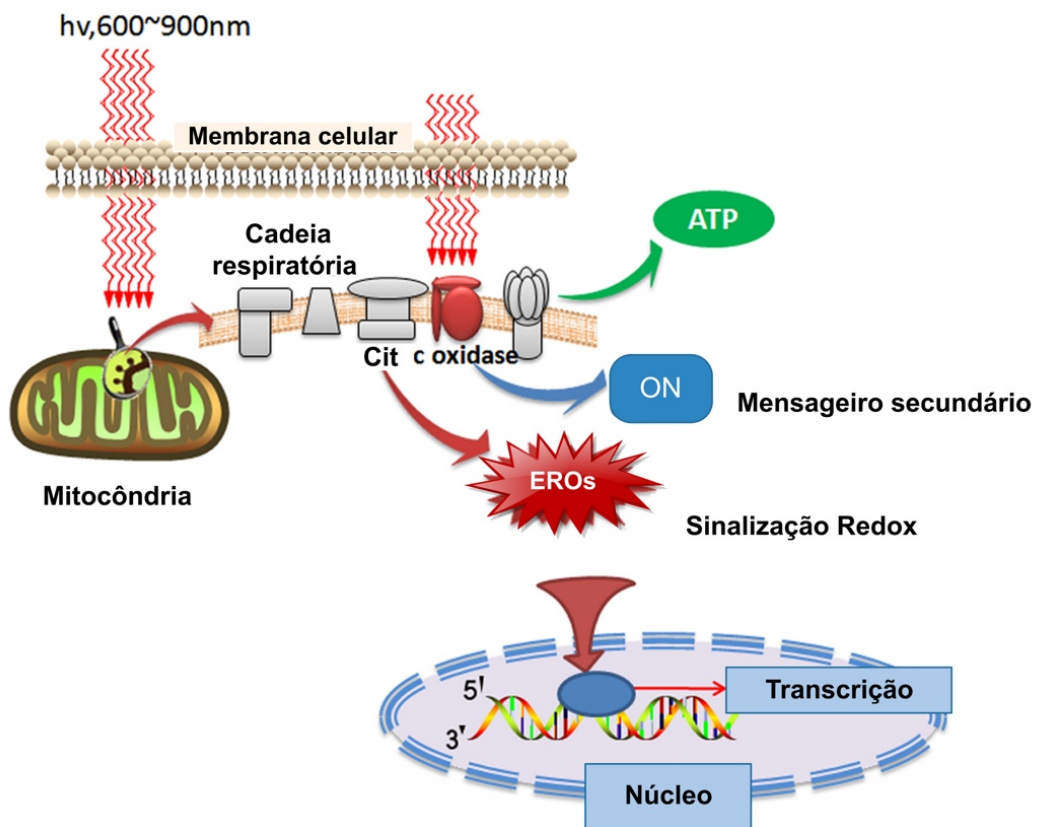
1.5.1 Mecanismo de ação

A fotobiomodulação (PBM) pode ser definida como a conversão de energia luminosa para energia metabólica com uma subsequente modulação do funcionamento biológico das células e tecidos. O laser é uma fonte de energia eletromagnética, visível ou não, e que se encontra no espectro de luz que varia do infravermelho ao ultravioleta, passando pelo espectro visível. Os lasers utilizados para promover a fotobiomodulação possuem características como coerência, monocromaticidade e unidirecionalidade, que permitem a entrega de níveis significativos de energia, tornando esse tipo de luz uma modalidade terapêutica importante, diferenciada e não invasiva (Rojas e Gonzalez-Lima 2011).

Os mecanismos envolvidos na fotoestimulação celular com PBM não estão completamente esclarecidos, mas sabe-se que esta terapia apresenta muitos efeitos em nível molecular, celular e tecidual. Acredita-se que o mecanismo biológico básico por trás dos efeitos da PBM, através da absorção de luz vermelha e infravermelha por cromóforos, seja em particular o citocromo c oxidase (CCO), que é a unidade IV na cadeia respiratória localizada dentro da mitocôndria, e talvez também cromóforos na membrana plasmática das células, levando posteriormente à uma cascata de eventos nas mitocôndrias, bioestimulando vários processos. Os espectros de absorção obtidos para CCO em diferentes estados de oxidação foram registrados e demonstraram muita similaridade aos espectros de ação para respostas biológicas à PBM (Karu e Kolyakov 2005). Isto significa que a absorção de energia luminosa pode causar fotodissociação de óxido nítrico inibitório a partir de CCO, levando ao aumento da atividade enzimática, do transporte de elétrons, do consumo de oxigênio, da respiração mitocondrial e da produção de ATP. Por outro lado, a PBM altera o estado redox celular induzindo a ativação de numerosas vias de sinalização intracelulares, modificando a afinidade de fatores de transcrição relacionados com a proliferação, sobrevivência celular e reparo tecidual. Depois que os fótons

são absorvidos pelos cromóforos na mitocôndria, a respiração e o ATP aumentam, mas além disso, moléculas sinalizadoras, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (ON) também são produzidas (FIGURA 5) (Gupta, Avci et al. 2013, Gupta, Dai et al. 2014).

FIGURA 5: Representação esquemática das vias de sinalização celular desencadeadas pela PBM.



Fonte: Figura extraída e adaptada de Huang, Sharma et al. 2011.

A PBM promove mudanças na expressão de vários fatores de crescimento no tecido irradiado, tais como, a liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta 1 (TGF- β 1), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de citocinas envolvidas no reparo de lesões (Chung, Dai *et al.* 2012). Citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β) e

fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são secretadas nas feridas irradiadas contribuindo para a síntese de colágeno, enquanto que os níveis séricos de IL-6 diminuiram (Lee, Park *et al.* 2007).

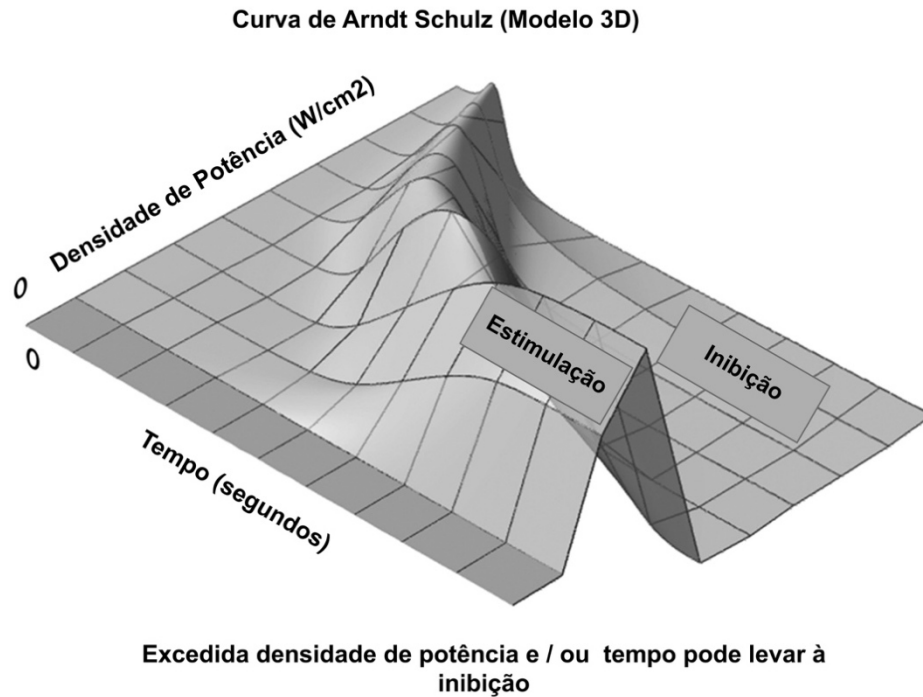
1.5.2 Fotorejuvenescimento com PBM

Um número de diferentes modalidades de tratamentos é empregado para prevenir e tratar o fotoenvelhecimento. O uso de lasers e outras fontes de luz está integrado no tratamento do processo de envelhecimento cutâneo (Dierickx e Anderson 2005). A PBM têm sido utilizada no tratamento estético de rugas finas, pele fotoenvelhecida e cicatrizes no processo de fotorejuvenescimento (Avci, Gupta *et al.* 2013), em várias intensidades para estimular ou inibir processos celulares (Barolet, Roberge *et al.* 2009). O objetivo principal é induzir uma forma controlada de reparo tecidual com o aumento da síntese de colágeno e remodelação da matriz dermal. Entre estes efeitos podem-se observar alterações endoteliais reversíveis, recrutamento de neutrófilos, monócitos e liberação de citocinas e fatores de crescimento que estimulam fibroblastos posteriormente levando a um aumento da síntese e organização de colágeno e elastina (Zelickson, Kilmer *et al.* 1999, Omi, Kawana *et al.* 2003). Além disso, a literatura relata que a irradiação com PBM promove a angiogênese e o aumento do número de fibroblastos na pele (Neves, Matheus *et al.* 2013). Estas propriedades se mostram promissoras em uma possível associação da PBM com extratos vegetais.

Para que se obtenha uma resposta biológica adequada é necessário atingir a dose ótima de radiação, através da escolha dos parâmetros adequados que envolvem o comprimento de onda, densidade de energia e potência, o tipo de regime de operação do laser e o número de aplicações (Woodruff, Bounkeo *et al.* 2004). A PBM ainda permanece controversa devido à compreensão incompleta dos mecanismos básicos e à seleção de parâmetros dosimétricos inadequados que levaram a estudos com respostas negativas. Os efeitos bifásicos de resposta à dose ou a curva de Arndt-Schulz em PBM (FIGURA 6), como a estimulação e inibição, foram

mostrados tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (Huang, Chen *et al.* 2009, Huang, Sharma *et al.* 2011).

FIGURA 6: Modelo tridimensional da curva de Arndt-Schulz ilustrando como o tempo de irradiância ou de iluminação (fluência) pode ter efeitos bifásicos de resposta à dose na PBM.



Fonte: Figura extraída e adaptada de Huang, Sharma *et al.* 2011.

Dessa forma, uma compreensão adicional da extensão em que o efeito de resposta bifásica à dose se aplica na PBM se faz necessária para revelar parâmetros biológicos eficazes, auxiliando futuras investigações em diferentes modelos experimentais, otimizando também os tratamentos clínicos com PBM.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da fotobiomodulação com laser vermelho e da fração de polissacarídeos, isolada do fruto de *Lycium barbarum*, na prevenção e tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo em camundongos *hairless*.

2.2 Objetivos específicos

- ⇒ Identificar as principais moléculas bioativas de uma fração de polissacarídeos extraída do fruto de *Lycium barbarum* (fração LBP), baseado em experimentos mono e bidimensionais de ressonância magnética nuclear.
- ⇒ Avaliar o potencial antioxidante da fração LBP através do método radical DPPH e de permeação na pele por meio de ensaio *in vitro*.
- ⇒ Avaliar as respostas celulares e estruturais mediante a aplicação isolada e associada da fração LBP e do laser vermelho na proteção da pele de camundongos *hairless* contra o fotodano gerado pela exposição artificial a radiação ultravioleta.
- ⇒ Avaliar as respostas celulares e estruturais mediante a aplicação isolada e associada da fração LBP e do laser vermelho no tratamento do fotodano na pele de camundongos *hairless* induzido por exposição artificial a radiação ultravioleta.
- ⇒ Investigar a relação entre a ordem de aplicação dos tratamentos e as respostas obtidas, a fim de elucidar possíveis efeitos sinérgicos produzidos pelas associações dos tratamentos.

**CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO BASEADA EM RMN DAS
PRINCIPAIS MOLÉCULAS BIOATIVAS DA FRAÇÃO LBP E
SEUS EFEITOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* E DE
PREVENÇÃO DO FOTODANO CUTÂNEA *IN VIVO*
ASSOCIADO À FOTOBIMODULAÇÃO**

1. INTRODUÇÃO

A pele é o principal meio através do qual um organismo interage com o seu ambiente e está regularmente exposta a condições de dano oxidativo direto, incluindo radiação ultravioleta (RUV) (Pittayapruek, Meehansan *et al.* 2016). O fotodano induzido pela RUV gera mudanças indesejáveis na aparência da pele que ao longo do tempo levam ao aumento ou aceleração da perda de reserva fisiológica e de proteção (Gilchrest 2013). Estudos se fazem necessários nessa área devido à enorme demanda do consumidor por agentes que possam impedir ou reverter esses danos. Vários metabólitos vegetais secundários são dotados de atividade antioxidante e foram estudados para prevenir, retardar e controlar o desenvolvimento de patologias relacionadas à idade (Saewan e Jimtaisong 2015). Portanto, o potencial de uso de antioxidantes naturais contra a RUV por via oral (Hwang, Sun *et al.* 2013, Lee, Im *et al.* 2018) e tópica (Hwang, Lee *et al.* 2014, Jeon, Kim *et al.* 2016) tem sido investigado. Alguns compostos naturais apresentam propriedades de absorção da RUV e agem como antioxidantes, reduzindo os efeitos prejudiciais da fotoexposição e aumentando a capacidade antioxidante das células da pele (Petruk, Del Giudice *et al.* 2018). O uso de antioxidantes exógenos pode ser uma valiosa estratégia para prevenir danos na pele induzidos pela RUV.

Como já descrito no capítulo 1, o fruto de *Lycium barbarum* L. (*L. barbarum*) é bem conhecido como um produto herbal chinês, potente como tônico nutritivo e tem sido usado historicamente como anti-senil por milhares de anos (Jin, Huang *et al.* 2013). Os polissacarídeos isolados dos extratos aquosos do *Lycium barbarum* (fração LBP) foram identificados como um dos principais ingredientes ativos, responsáveis pelas atividades biológicas (Zhang, Chen *et al.* 2005). Corroborando com tais propriedades tradicionais, estudos indicam que a fração LBP possui uma gama de atividades biológicas como antioxidante, imunomoduladora, antitumoral, radioprotetora, entre outras (Amagase e Nance 2008, Jin, Huang *et al.* 2013). Sua composição foi elucidada por análises químicas incluindo hidrólise enzimática régio-seletiva, alcalina e

ácida e métodos espectroscópicos envolvendo cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas, espectrometria de massas com ionização por “*electrospray*” de alta resolução e ressonância magnética nuclear mono e bidimensional, respectivamente (Gao, Ali *et al.* 2008).

A associação das atividades biológicas benéficas de extratos de plantas com métodos físicos, como a fotobiomodulação, tem sido estudada com relação ao seu potencial de proteção contra o fotodano gerado pela RUV. A terapia com laser de baixa intensidade, foi descoberta no final dos anos 1960, mas só recentemente tem sido amplamente aplicada na dermatologia (Avcı, Gupta *et al.* 2013). Esta terapia tem provado ser uma ferramenta útil para a modulação do metabolismo celular (Silva, Machado *et al.* 2018) e sua associação com extratos naturais antioxidantes parece ser uma estratégia útil na proteção da pele contra os danos nocivos da RUV.

Não há relatos sobre a associação dos efeitos antioxidantes da fração LBP e da fotobiomodulação com laser vermelho contra o fotodano da pele gerado pela exposição a RUV. Devido ao potencial de ambas as terapias, o presente estudo teve como objetivo identificar as principais moléculas bioativas de uma fração de polissacarídeos extraídas do fruto de *Lycium barbarum* (fração LBP), baseado em experimentos mono e bidimensionais de ressonância magnética nuclear, bem como determinar o potencial antioxidante e de permeação na pele da fração LBP e ainda investigar a aplicação isolada e associada da fração LBP e do laser vermelho na proteção da pele de camundongos *hairless* contra o fotodano gerado pela exposição artificial a radiação ultravioleta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aquisição do fruto de *Lycium barbarum*

Os frutos desidratados de *Lycium barbarum*, foram exportados por Qingdao Gufeng International Trade CO. LTD., com origem da China e número de lote de WZW14018. Os mesmos foram adquiridos comercialmente em março de 2014, na Casa Oriente Produtos Naturais, situada no mercado municipal de Rio Claro/SP, onde eram vendidos prontos para consumo.

2.2 Obtenção do extrato de polissacarídeos do fruto de *Lycium barbarum*

A extração e o isolamento da fração de polissacarídeos foram realizados segundo protocolo de (Ke, Zhang et al. 2011). Foram pesados 300 g do fruto de *Lycium barbarum* (seco e triturado), adicionados a 2 L de etanol (95%) e mantidos sob refluxo durante 5 horas à temperatura de 75°C, para a remoção dos lipídeos. Esse procedimento foi realizado três vezes e o sobrenadante das extrações foi descartado após filtração. Em seguida, um extrato aquoso foi obtido através da adição de 1 L de água destilada ao material precipitado a cada 3 horas durante quatro vezes à temperatura ambiente. O extrato final (4 L) foi filtrado (papel qualitativo), liofilizado e o seu volume foi reduzido 10 vezes (400 mL). Logo após o material obtido foi precipitado em etanol 95% (4 L) por 12 horas a 4°C (FIGURA 7).

O extrato foi submetido a filtração a vácuo e o material precipitado foi lavado com etanol absoluto, acetona e éter, sucessivamente. O precipitado lavado obteve um rendimento de massa final de 26 g e o mesmo foi definido como fração de polissacarídeos (Fração LBP) e armazenado em freezer ($\pm 20^{\circ}\text{C}$).

2.3 Espectro Ultravioleta da fração LBP

Um espectro ultravioleta da fração de polissacarídeos extraídos do fruto de *Lycium Barbarum* foi realizado para a verificação da ausência de proteína na fração. Para isso, 1 mg da fração denominada LBP foi solubilizada em 10 mL de água destilada e lida em espectrofotômetro (Modelo U-200, Hitachi, Japão). A ausência do pico na faixa dos 280 nm foi sugerida para determinar a ausência de proteína na fração de polissacarídeos (LBP).

FIGURA 7: Obtenção da fração de polissacarídeos (LBP). A: Processo de liofilização. B: Material precipitado em etanol 95%.



Fonte: Acervo do autor (2018).

2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C da fração LBP e experimentos bidimensionais

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (*Ultrashield Plus*[®]). O espectrômetro é equipado com sonda criogênica TCI (*Triple Resonance Cryoprobe Inverse*) de 5 mm, com bobinas de ^1H e ^{13}C e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA[®] (*Automatic Tuning e Matching*). As

amostras foram preparadas transferindo-se 200 mg da fração LBP para os tubos de RMN de 10 mm de diâmetro, seguido da adição de 2 mL do solvente Dimetilsulfóxido (DMSO). Os experimentos foram feitos em uma temperatura de 25°C (TABELA 1). O processamento para os espectros de RMN de ¹H foi feito aplicando-se uma transformada de Fourier com 65.536 pontos (SI), a fase (apk) e as linhas de base foram corrigidas automaticamente. Para os espectros bidimensionais, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 (**SIF2**) e 512 em F1 (**SIF1**), utilizando a função de apodização seno quadrado (**QSINE**) e o fator SSB igual a 3, em ambos os eixos. A fase foi ajustada manualmente.

TABELA 1: Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN.

Parâmetros^A	¹H	gCOSY	gTOCSY	gHSQC	gHMBC
sequência de pulsos	<i>lcpnf2</i>	<i>Cosygppraqf</i>	<i>dipsi2gpphpr</i>	<i>hsqcetgp</i>	<i>Hmbcgplpndqf</i>
TD - TDF2	65.536	4.096	4.096	4.096	4.096
TDF1*	-	256	256	256	256
SW - SW2 (ppm)	20,02	16,02	20,02	16,02	16,02
SW1*(ppm)	-	16,02	20,02	238,82	238,82
AQ - AQF2 (s)	2,72	0,21	0,17	0,17	0,17
AQF1* (s)	-	0,01	0,01	0,003	0,004
Ns	128	8	32	80	96
p1 ¹H (μs)	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
p1 ¹³C* (μs)	-	-	-	14,00	14,00
d1 (s)	2,4	1,0	1,0	1,0	1,0

^A Nomenclatura Bruker. * somente para os experimentos bidimensionais. TDF2 - número de pontos do domínio de tempo direto; TDF1 - número de pontos do domínio de tempo indireto; SW2 - janela espectral do domínio direto; SW1 - janela espectral do domínio indireto; AQ-F2 - tempo de aquisição no domínio direto; AQ-F1 - tempo de aquisição no domínio indireto; ns - número de promediações; p1 ¹H - duração do pulso de 90° ¹H; p1 - ¹³C - duração do pulso de 90° ¹³C; d1 - tempo de relaxação.

Os espectros de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ foram realizados com a sequência de pulso **zgpg30**, sem girar a amostra e em temperatura de 80°C. A amostra foi dissolvida em D₂O. O experimento foi realizado em equipamento 9,4 Tesla (400,13 MHz para frequência do hidrogênio), operando com uma sonda com ajuste automático de sintonia (ATMA[®]) e temperatura variável entre -120 a 150°C. Os parâmetros de aquisição foram: número de pontos do domínio de tempo (**TD**) 32.768; janela espectral (Kim, Ananthaswamy *et al.*) 240,0 ppm; tempo de aquisição (Afaq e Mukhtar) 0,68 s; número de promediações (**ns**) 92.160; duração do pulso de 30° (^{13}C) 4,95 μs ; frequência central do pulso (**O1P**) 100,0 ppm; tempo de relaxação (**d1**) 0,2 s; programa de desacoplamento (**CPDPRG**) waltz16; e duração do pulso de 90° para desacoplamento 90 μs .

2.5 Determinação da atividade antioxidante da fração LBP pelo método do radical DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante da fração LBP, 2 mg da amostra foi pesada e solubilizada em 1 mL do solvente DMSO, chegando a concentração de 2mg/mL. Uma diluição seriada foi realizada a partir da concentração inicial de 2 mg/mL para 1 mg/mL, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 31,5 $\mu\text{g/mL}$, obtendo ao final sete concentrações diferentes. Foram preparados 7 tubos de ensaio contendo 150 μL de cada uma das concentrações obtidas da diluição seriada. Uma solução foi preparada contendo 3,9 mg de DPPH (Sigma-Aldrich) em 100 mL de metanol e após completa solubilização 2.850 μL da mesma foi acrescentada em cada tubo de ensaio pré-preparado na diluição seriada, totalizando 3 mL (150 μL de amostra e 2.850 μL de solução de DPPH em cada tubo), apresentando uma variação de concentração final nos 7 tubos de 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 3,12 $\mu\text{g/mL}$, 1,56 $\mu\text{g/mL}$. Os experimentos foram realizados em triplicata. Após a adição da solução do DPPH nas amostras, foi aguardado o tempo de 30 minutos para a reação e o início das leituras em espectrofotometria, no comprimento de onda de 517 nm. Como

controle negativo, foram consideradas as leituras realizadas da solução de DPPH sem amostra e como controle positivo, foi utilizado um antioxidante já estabelecido na literatura, o ácido ascórbico. A leitura do branco (solvente utilizado) foi feita para a calibração do equipamento e em seguida as leituras foram realizadas. As absorbâncias foram computadas e o cálculo da porcentagem de inibição da oxidação foi feito através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Controle} - \text{Amostra})}{\text{Controle}} \times 100$$

2.6 Formulação gel de LBP a 5%

Uma formulação em gel, contendo a fração LBP a 5% foi preparada para os ensaios de permeação cutânea *in vitro* e os experimentos *in vivo*. Para isso, 5 g dos polissacarídeos isolados do fruto de *Lycium barbarum* (LBP) e 2,5 g de hidroxietilcelulose foram adicionados e homogeneizados a 95 mL de água ultrapura.

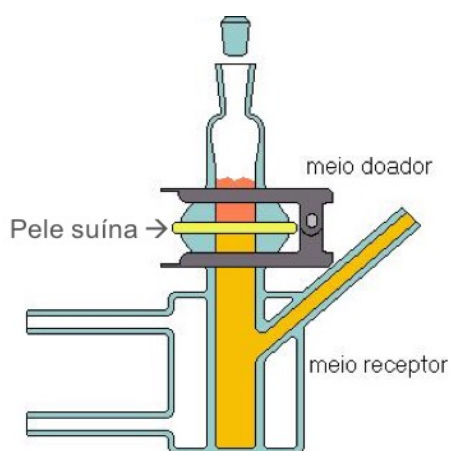
2.7 Análise da permeação cutânea *in vitro* da fração LBP por Fluorometria e Microscopia Confocal de Fluorescência

Para os ensaios de permeação da formulação em gel da fração LBP a 5%, um fluoróforo denominado rodamina B foi usado como marcador de permeação para confirmar se houve ou não a penetração da formulação em teste. Através da fluorometria foi possível realizar uma análise quantitativa da permeação em diferentes camadas da pele, e ainda uma análise qualitativa da distribuição da formulação na pele por microscopia confocal de fluorescência.

As análises de permeação foram realizadas em modelo de pele de orelha suína (*in vitro*) baseado em metodologia anteriormente descrita (Praca, Bentley *et al.* 2011). O aparato utilizado para avaliar a permeação cutânea foi composto por células de difusão vertical tipo Franz com um compartimento receptor de 15 mL e uma área de difusão de 1,1 cm². As

amostras de pele dermatomizadas (espessura $\approx 500 \mu\text{m}$) foram pinçadas entre as duas câmaras verticais das células de difusão, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor (FIGURA 8). O compartimento receptor foi mantido a temperatura de 25°C (temperatura ambiente) com homogeneização constante em 500 rpm.

FIGURA 8: Amostras de pele dermatomizadas pinçadas entre as duas câmaras verticais de células de difusão (Tipo Franz).

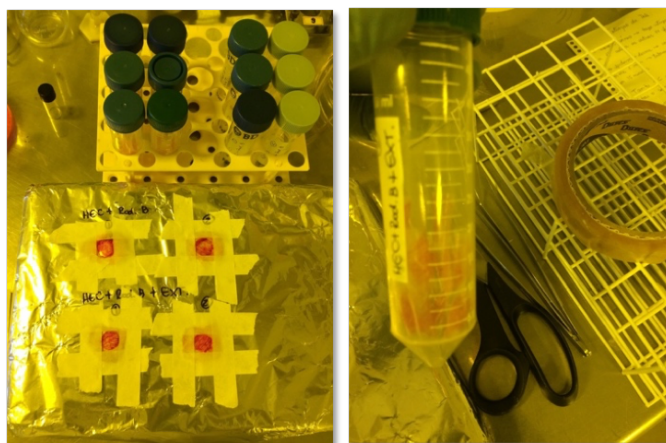


Fonte: Imagem extraída e adaptada de <https://goo.gl/images/cVJTP2>.

Foi aplicado no compartimento doador, 0,9 g das seguintes formulações: HEC (0,1 g de hidroxietilcelulose em 4 mL de água ultrapura, usado como controle interno, HEC+RODAMINA (0,1 g de hidroxietilcelulose e 0,4 g de rodamina em 4 mL de água ultrapura) e HEC+RODAMINA+LBP5% (0,1 g de hidroxietilcelulose e 0,4 g de rodamina em 4 mL da fração de LBP a 5%), com $n=2$ para a fluorometria e $n=2$ para microscopia confocal de fluorescência, para cada formulação supracitada. Em seguida, o compartimento foi vedado com plástico filme e mantido ao abrigo da luz. O compartimento receptor foi preenchido com solução tampão fosfato (30 mM, pH 7.2) e o experimento foi conduzido por 18 horas. Em seguida, as peles foram retiradas do aparato e o excesso de formulação foi removido cuidadosamente com papel absorvente. Todo o volume do compartimento receptor foi coletado

para quantificar a rodamina (fluoróforo) que permeou através da pele. Para avaliar a quantidade de rodamina retida na pele, foi realizado o procedimento de extração por fita adesiva, para separar o estrato córneo (EC) das camadas restantes, epiderme mais derme (EP+D). O EC foi obtido por tiragem (*tape-stripping*) de 15 fitas adesivas de celofane (3M, Scotch Book Tape, MN, EUA), sendo que a primeira fita foi descartada (FIGURA 9). O tecido restante contendo a epiderme mais derme (EP+D), sem o EC foi cortado em pedaços pequenos e triturado com o auxílio de um triturador de tecidos (Politron). Tanto as fitas obtidas por tiragem contendo EC, quanto o tecido restante triturado contendo a EP+D foram colocados em tubos plásticos contendo 5 mL de metanol-água (3:1), no qual foi usado como solvente de extração para amostras EC e EP + D. Após 15 minutos de extração da rodamina, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo plástico e em seguida foram realizadas leituras das absorbâncias das amostras (duplicata) em Fluorímetro (RFPC-PRO) com área de integração de 530 – 690 nm (fenda de 1.5). Amostras da solução receptora, coletadas do aparato após o ensaio de penetração das formulações no modelo de células verticais, também foram submetidas a leitura juntamente com as amostras das diferentes camadas da pele (EC e EP+D).

FIGURA 9: Amostras de pele fixadas para a remoção do estrato córneo através da técnica de *tape-stripping* com fitas adesivas de celofane.



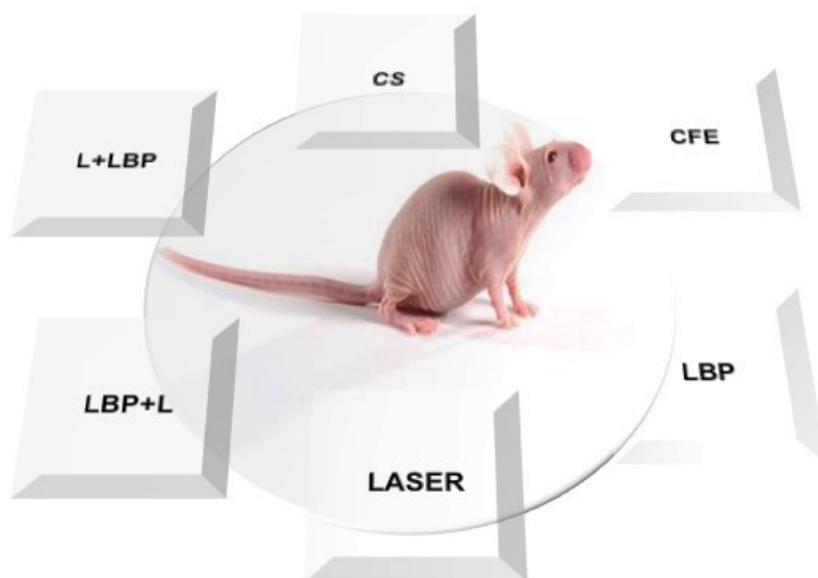
Fonte: Acervo do autor (2018).

Após a remoção das peles do aparato das células verticais, duas amostras de cada formulação foram processadas para a técnica de microscopia confocal de fluorescência. Ao término do experimento de permeação das formulações, as amostras de pele foram congeladas com auxílio de nitrogênio líquido e um gel crioprotetor (TissueTek-Sigma). Em seguida, as mesmas foram cortadas em criostato (50 µm de espessura) e fixadas em laminas para posterior análise da distribuição da rodamina nas diferentes camadas da pele. As laminas foram analisadas e as imagens foram capturadas em microscópio confocal de fluorescência – excitação em verde (TCS SP8, Leica).

2.8 Animais e divisão dos grupos experimentais

Para a composição do grupo experimental, 48 camundongos fêmeas *hairless* da linhagem HRS/J, com idade aproximada de 6 semanas foram adquiridas do Biotério Central – UT/CCBS da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Após a chegada dos animais no Biotério do Departamento de Fisioterapia – Dfisio/UFSCar, os mesmos passaram por um processo de duas semanas de adaptação ao novo ambiente, atingindo assim a idade necessária para o início dos experimentos (8 semanas). Durante o período experimental, todos os animais foram agrupados (cada grupo experimental/caixa) em gaiolas de polipropileno (30 x 32 x 18 cm), forradas com serragem e com livre acesso à água e alimento. Os animais foram mantidos em um gabinete biotério (Insight) com programa de iluminação artificial (ciclo claro/escuro 12h x 12h), com início do período claro às 6:00 horas e de exaustão que mantinha sua temperatura interna igual a do ambiente em que estava alocado, o biotério do Dfisio/UFSCar com temperatura controlada a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 subgrupos (n=8), conforme a figura 10.

FIGURA 10: Divisão dos grupos experimentais.



Fonte: Imagem (camundongo) extraída de: <https://www.criver.com/sites/default/files/resource-files/sho-mice-us-pricing.pdf>.

CS (n=8) - animais que não foram fotoenvelhecidos, CFE (n=8)* - animais que foram fotoenvelhecidos, LBP (n=8) - animais que foram fotoenvelhecidos e tratados com a fração LBP, LASER (n=8) - animais que foram fotoenvelhecidos e tratados com laser vermelho, LBP+L (n=8) - animais que foram fotoenvelhecidos e tratados com a fração LBP e em seguida com laser vermelho e L+LBP (n=8) - animais que foram fotoenvelhecidos e tratados com laser vermelho e em seguida com a fração LBP). *1 animal morreu durante o experimento.

2.9 Indução do fotoenvelhecimento

O procedimento para fotoenvelhecer a pele dos animais foi realizado através da administração de doses sub-eritematosas de luz ultravioleta (Brandwilliams, Cuvelier et al.) com regime de exposição crônico e cumulativo, sem ocasionar lesões carcinogênicas. Durante o procedimento os animais permaneceram dentro de um recipiente plástico, sem qualquer restrição de movimento, conscientes e sem necessidade de anestesia, visto que tal procedimento não causou dor ou sofrimento aos mesmos. O fotoenvelhecimento dos grupos experimentais foi induzido por uma lâmpada incandescente - *Ultra-Vitalux 300 W* (OSRAM, Augsburg, Alemanha) - que é semelhante, no seu espectro de emissão, ao perfil espectral da luz solar

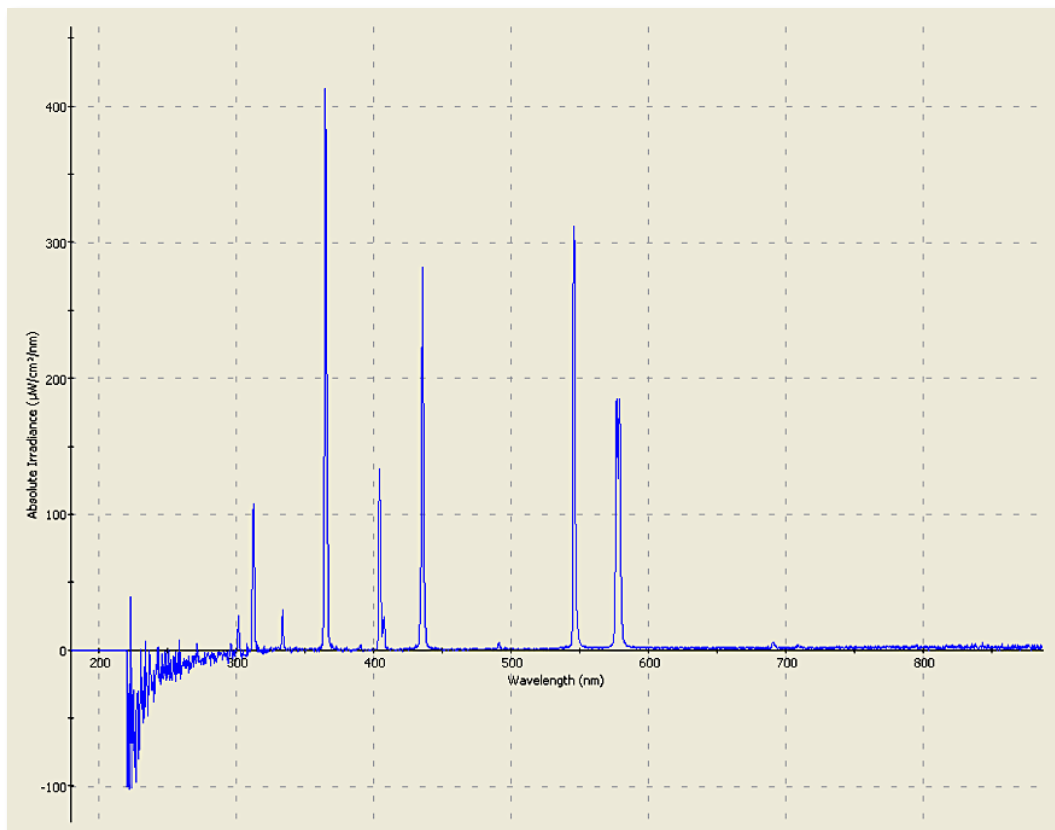
(FIGURA 11). A irradiância da lâmpada incandescente foi mensurada com o auxílio de um radiômetro de pesquisa, através do *software* SpectraSuite (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA), equipado com um sensor de fibra óptica (FIGURA 12). Nesse estudo foi padronizado uma irradiância de 0,1 mW/cm² de UVB (280 a 315 nm), 0,8 mW/cm² de UVA (315 a 480 nm) e 3,89 mW/cm² de irradiância total da lâmpada (280 a 886 nm) a uma distância de 70 cm entre a lâmpada e o dorso dos animais durante as sessões de irradiação.

FIGURA 11: A: Lâmpada incandescente - *Ultra-Vitalux 300 W* (OSRAM, Augsburg, Alemanha), B: Exposição dos animais à lâmpada incandescente (indução do fotoenvelhecimento).



Fonte: Acervo do autor (2018).

FIGURA 12: Espectro de irradiância da lâmpada incandescente *Ultra-Vitalux 300 W* (OSRAM, Augsburg, Alemanha), obtido a 70 cm de distância do sensor de fibra óptica.



Todos os subgrupos experimentais, exceto os subgrupos CS, foram expostos a 100 mJ/cm^2 (1 dose mínima eritematosa = 100 mJ/cm^2) sete vezes por semana, durante a primeira semana, por 16 minutos/sessão; e depois a 200 mJ/cm^2 três vezes por semana, durante 5 semanas, por 33 minutos/sessão, totalizando 6 semanas de foto exposição, segundo protocolo adaptado de Hwang, Sun et al. 2013 e Hwang, Park et al. 2014.

2.10 Realização dos tratamentos

Os tratamentos foram realizados durante a indução do fotoenvelhecimento (a partir da terceira semana até a sexta). Todos os tratamentos foram realizados três vezes por semana (seg/qua/sex), totalizando quatro semanas de tratamento divididos em 12 sessões.

Para cada dia de tratamento, uma dose de 50 mg da fração LBP 5% foi aplicada com o auxílio de uma espátula e espalhada gentilmente, sem esfregar, com a ponta do dedo indicador, até sua total absorção, em uma área de 3 cm x 2 cm no dorso dos animais dos grupos LBP, LBP+L e após a aplicação do laser nos grupos L+LBP. Cada sessão de tratamento com laser vermelho foi realizada na mesma área e horário de aplicação nos grupos L, L+LBP e após a aplicação da fração LBP 5% no grupo LBP+L, nos seguintes parâmetros: Aparelho Photon Lase III (DMC, São Carlos/SP, Brasil) com comprimento de onda 660 nm (FIGURA 13), área de feixe de 0.028 cm², 40 mW de potência e fluência de 40 J/cm², com tempo de aplicação de 28 segundos e 1.12 J/ponto (6 pontos). Dois dias após o término dos tratamentos, os animais foram eutanasiados e a região da pele tratada e não tratada (grupo controle) do dorso de cada animal foi coletada, dividida em quadrantes e distribuída nos grupos de modo padronizado, sendo devidamente armazenada conforme protocolo exigido para cada análise a ser realizada.

FIGURA 13: Equipamento de laser vermelho – 660 nm, utilizado para o tratamento dos animais e molde de EVA utilizado para a padronização da aplicação do laser (6 pontos).



Fonte: Acervo do autor (2018).

2.11 Processamento Histológico

As peles coletadas dos animais de todos os grupos experimentais foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas e lavadas em água corrente por 1 hora. Em seguida, as mesmas foram submetidas a processamento histológico, no qual passaram pelo processo de desidratação (1 hora em cada um dos seguintes banhos: álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III), clarificação (1 hora em cada um dos seguintes banhos: xilol I e xilol II) e impregnação (1 hora em banho de parafina I e 2 horas em parafina II). Logo em seguida, utilizando uma central de inclusão, as peles previamente infiltradas em parafina foram incluídas, com o auxílio de uma pinça, no interior de um molde de alumínio contendo parafina líquida, com a superfície a ser seccionada para baixo. Cada bloco de parafina com a pele incluída foi devidamente identificado.

Os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente, em relação à pele, por meio de um micrótomo rotativo (LEICA), obtendo cortes semi-seriados com espessura de 5 µm. Os mesmos foram tratados com as técnicas de: hematoxilina-eosina (HE) para análise estrutural e da espessura da epiderme e picro-sirius para observação da organização das fibras colágenas, através de microscopia com o emprego de luz polarizada.

2.12 Análise Histológica

As imagens das secções foram capturadas e digitalizadas em fotomicroscópio (SC30, Olympus). A análise estrutural das imagens foi realizada através da descrição morfológica da pele do dorso dos animais de todos os grupos experimentais. As mensurações da espessura do epitélio foram padronizadas através da obtenção de medidas na região central de todas as secções analisadas, através do *software* Cellsens Standard® e a análise quantitativa da porcentagem de área de fibras colágenas birrefringentes foi realizada em três campos diferentes por secção de cada lâmina através do *software* Image J®.

2.13 Imunofluorescência

Para as análises de imunofluorescência, cortes parafinizados com espessura de 5 µm contidos em lâminas silanizadas foram mantidos em estufa (60°C) por 15 minutos para derretimento do excesso de parafina. Em seguida, as lâminas passaram pelos processos de desparafinização e hidratação através dos seguintes banhos: xilol I (20 min), xilol II (20 min), xilol III (20 min), álcool absoluto (5 min), álcool 90% (3 min), álcool 80% (2 min), álcool 70% (2 min), água corrente fraca (2 min), água destilada (2 min). A recuperação antigênica foi realizada através da incubação das lâminas em tampão citrato (pH 6.0) com o auxílio de uma panela a vapor por 40 min. Após isso, as lâminas foram resfriadas e lavadas três vezes em tampão PBS (5 min/vez). As lâminas foram secas e incubadas com BSA 0,5% e soro de burro 10% em PBS durante 2 horas para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em tampão PBS (5 min/vez) e imediatamente após procedeu-se a incubação dos anticorpos primários, diluídos em 0,5% BSA (PBS) em câmara úmida a 4°C (18 horas), conforme informações na TABELA 2. Após as três lavagens das lâminas em tampão PBS (5 min/vez), as mesmas foram incubadas em anticorpos secundários, diluídos em 0,5% BSA (PBS) em câmara úmida com proteção contra a luz, por período de uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em tampão PBS (5 min/vez) e montadas com lamínulas e solução de montagem contendo DAPI (Ab104139, Abcam) para marcação nuclear.

TABELA 2: Informações sobre os anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência e sua metodologia de incubação.

<i>Anticorpo</i>	<i>Código</i>	<i>Marca</i>	<i>Titulação</i>	<i>Incubação</i>
Anti-MMP1	Ab137332	Abcam	1:100	18 horas, temperatura a 4°C
Anti-MMP2	Ab37150	Abcam	1:100	18 horas, temperatura a 4°C
Anti-MMP9	Ab38898	Abcam	1:100	18 horas, temperatura a 4°C
Alexa Flúor 488	A11034	Life	1:500	1 hora, temperatura ambiente
Alexa Flúor 568	A11011	Life	1:500	1 hora, temperatura ambiente

2.14 Quantificação dos marcadores da técnica de Imunofluorescência

As imagens para a quantificação dos marcadores por imunofluorescência foram capturadas através de um Microscópio de fluorescência (BX61, Olympus) e do *software* Cellsens Dimension[®]. A exposição de luz na captura das imagens foi padronizada e as mensurações foram realizadas em três campos diferentes por secção em cada lâmina através do *software* Image J[®].

2.15 Análise estatística

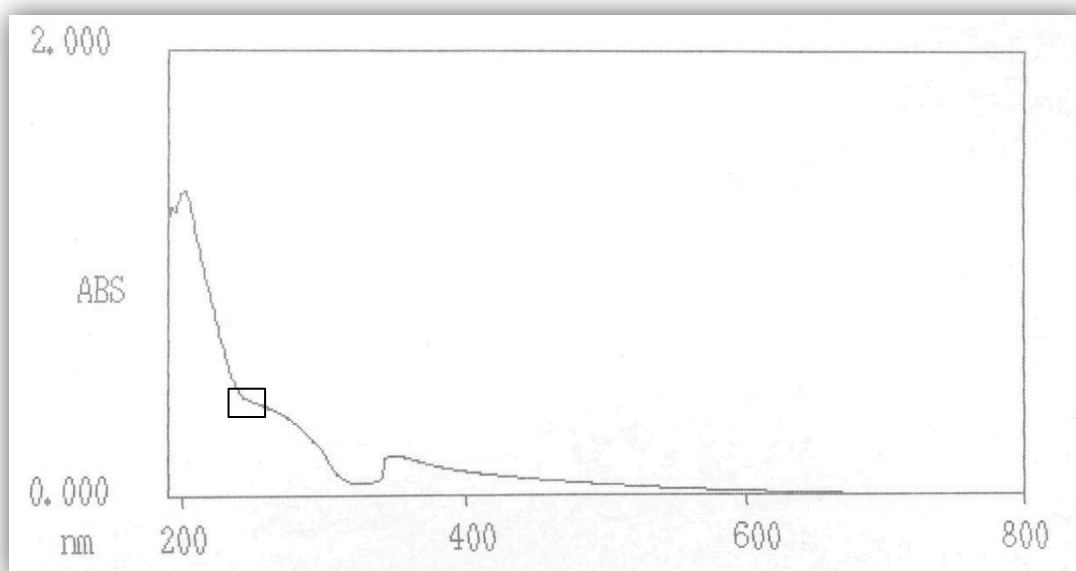
Todas as variáveis tiveram a sua distribuição verificada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os valores foram inseridos em planilhas e analisados por One-way (ANOVA) e pós-teste de Tukey (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (dados não-paramétricos) para comparação entre grupos usando o *software* Graph Pad Prism[®] 7.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1 Espectro Ultravioleta da fração LBP

Foi registrado o espectro ultravioleta da fração LBP para verificar a ausência do pico na faixa dos 280 nm, que indica a ausência de proteínas na fração de polissacarídeos (LBP). O espectro apresentou uma absorvância muito baixa, na faixa dos 280 nm, sugerindo a ausência de proteína na fração LBP (FIGURA 14).

FIGURA 14: Espectro Ultravioleta da fração de LBP, apresentando baixa absorvância na faixa dos 280 nm, sugerindo a ausência de proteína na fração de interesse (LBP).



3.2 Determinação da estrutura do polissacarídeo extraído do fruto de *Lycium barbarum* (fração LBP)

A análise dos espectros de RMN ^1H (FIGURA 15) e ^{13}C (FIGURA 16) indica que este polissacarídeo é constituído predominantemente por glicosídeos, neste caso polissacarídeos.

Os principais sinais de deslocamento químico que caracterizam esta classe de substância são os sinais de hidrogênios anoméricos das unidades de glicosil, dubletos em δ 5,40, 5,14 e

4.51 e seus respectivos sinais de carbonos em δ 102,0, 99,0, 97,5 e 92, assim como diversos sinais de hidrogênios carbinólicos entre δ 3.2 a 4.2 e seus respectivos sinais de carbonos entre δ 60,0 a 83,0, assim como dubleto em δ 0,90 característico de metilas de ramnosos. Aparecem sinais no espectro de RMN de ^{13}C com deslocamentos característicos de ácidos carboxílicos ou ésteres na região de δ 170-180.

FIGURA 15: Espectro de RMN de ^1H da fração de LBP (D_2O com aquecimento).

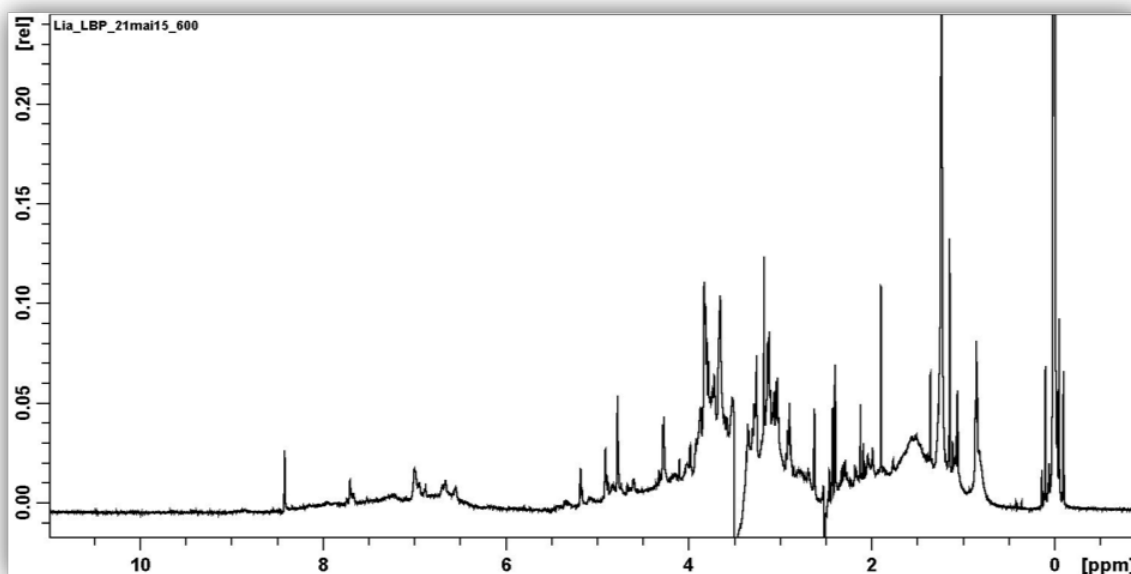
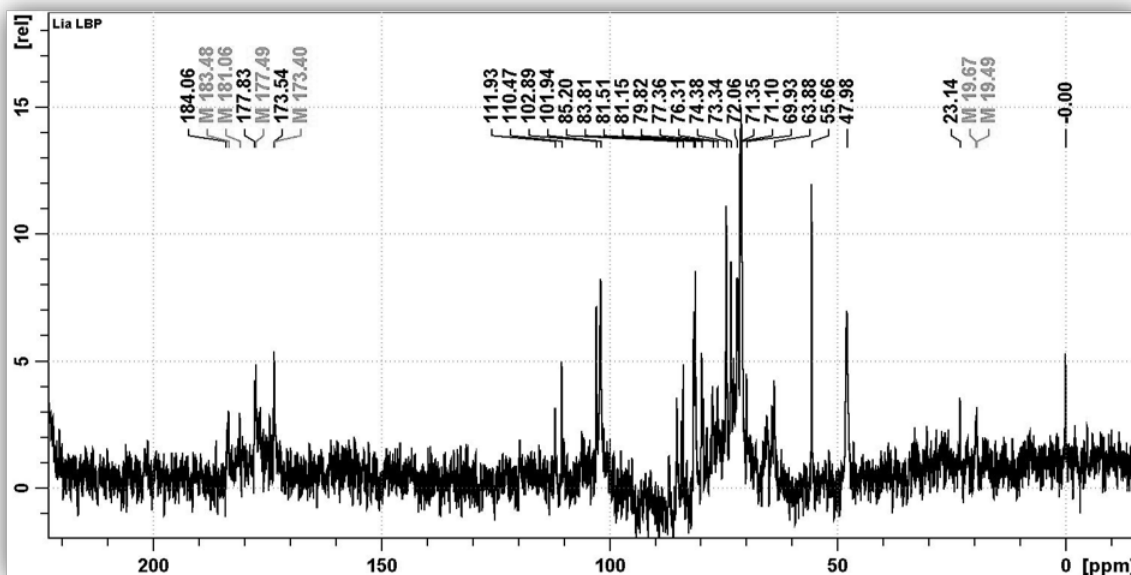


FIGURA 16: Espectro de RMN de ^{13}C da fração de LBP. (D_2O com aquecimento).



Através da análise dos dados obtidos nos experimentos de RMN bidimensionais, realizados com a amostra da fração de polissacarídeos extraídas do fruto de *Lycium barbarum*, pode-se verificar que o polissacarídeo tem constituição de diferentes monômeros, assim como a interligação dos mesmos (TABELA 3). Os dados de RMN indicados a seguir, obtidos pela análise dos mapas de contornos, COSY e TOCSY, HMBC e HSQC (FIGURA 17 - 20) demonstram se tratar de um polissacarídeo composto por:

Carbonos/Hidrogênios (ppm) anoméricos:

109.0/4.78; 109.1/4.77; 108.5/4.90; 107.0/4.30; 104.0/4.10; 103.5/4.20; 103.0/4.30;
101.0/4.79; 100.0/4.60; 99.0/4.70; 96.0/4.85; 93.0/4.80; 91.0/4.91; 90.0/5.2

Carbonos/Hidrogênios (ppm) glicosídeos:

85.20; 83.81; 81.51; 81.15; 79.82; 77.36; 76.31; 74.38; 73.34; 72.06; 71.35; 71.10;
69.93; 63.88; 65.66; 47.98/3.50-4.10m

Carbono/Hidrogênio (ppm) metílico e carbono carboxílico:

19.0/1.10; 173.5; 173.4

Aparecem ainda sinais característicos de ácidos graxos de cadeia longa e possuindo insaturações esterificando os sacarídeos:

Carbonos/Hidrogênios (ppm):

184.0; 183.5; 181.1; 177.8; 177.49; 119.0/6.51; 117.0/7.00; 116.0/6.53; 29.0/1.20;
20.0/2.40; 14.0/0.88

TABELA 3: Determinação das principais unidades glicosídicas e ácidos graxos de cadeia longa que compõem a fração LBP.

$^1\text{H/ppm}$	$^{13}\text{C/ppm}$	COSY	Possíveis Unidades glicosídicas
5.18 d(3.35 Hz)	91.7	3.18	α -glucose
4.91 <i>broad</i>	91.3	3.13	α -galactose
4.89 <i>broad</i>	93.6	-	β -arabinose
4.27 d(7.50 Hz)	96.9	2.89	α -arabinose
4.77 <i>broad</i>	107.9	3.82; 3.03	β -galactose
4.59 <i>broad</i>	102.6	3.27	β -glucose
6.66 <i>broad</i>	115.8	-	Ácido graxo
6.99 <i>broad</i>	117.1	6.56	Ácido graxo
6.56 <i>broad</i>	118.8	6.99	Ácido graxo

FIGURA 17: Espectro de RMN 2D da fração de LBP em D_2O , COSY.

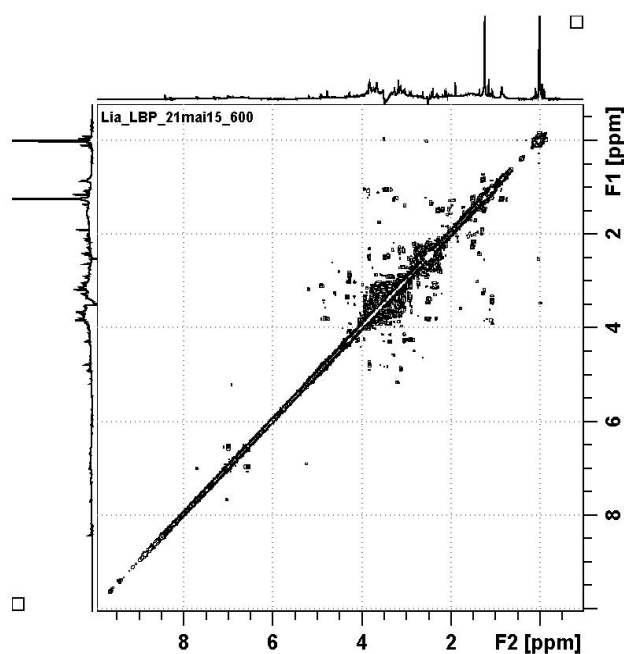


FIGURA 18: Espectro de RMN 2D da fração de LBP em D₂O, TOCSY.

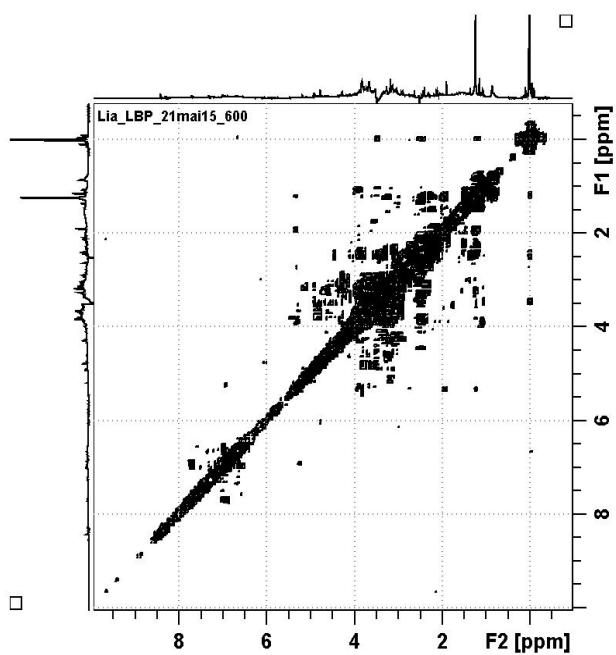


FIGURA 19: Mapa de contorno de RMN 2D da fração de LBP em D₂O, HMBC.

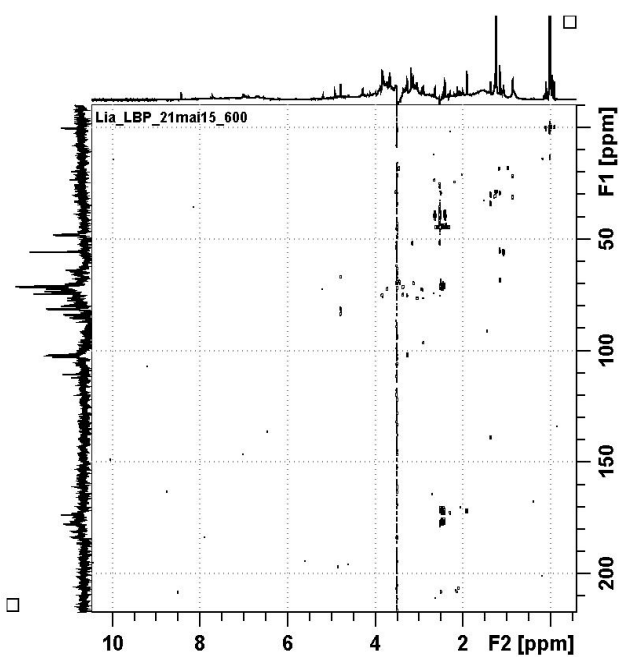
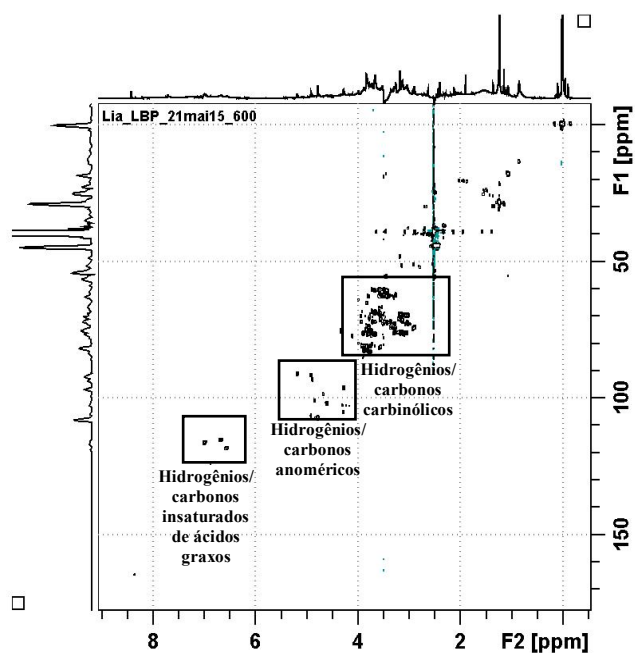


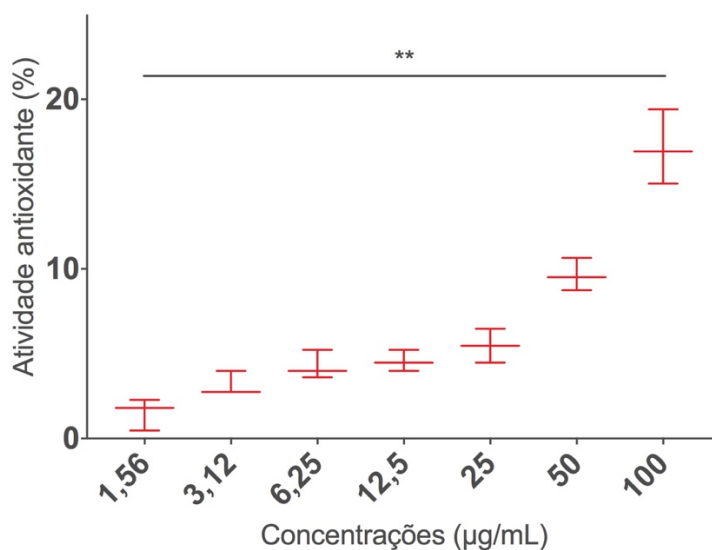
FIGURA 20: Mapa de contorno de RMN 2D da fração de LBP em D₂O, HSQC.



3.3 Ensaio antioxidantes da fração LBP pelo método do radical DPPH

Foi realizado um ensaio para verificar a atividade antioxidante da fração isolada de polissacarídeos (LBP), extraída do fruto de *L. barbarum* (FIGURA 21), obtido à temperatura de 75°C durante 5 horas sob refluxo. O método consiste em determinar a capacidade de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil- 1-picrilhidrazina). Após a adição do antioxidante em teste, uma diminuição da absorbância é observada proporcionalmente à concentração e à atividade da amostra (Brandwilliams, Cuvelier e Berset, 1995). O ácido ascórbico foi usado como controle positivo, devido a sua eficácia como antioxidante estar bem estabelecida na literatura (Mukherjee *et al.*, 2011; Shekhar e Anju, 2014). A figura 21 demonstra os padrões de atividade antioxidante da fração de LBP em diferentes concentrações, sugerindo um potencial antioxidante em todas as concentrações testadas, com diferença significativa entre as concentrações de 1,56 µg/mL e 100 µg/mL ($p < 0,01$).

FIGURA 21: Ensaio antioxidante da fração LBP através do método DPPH.

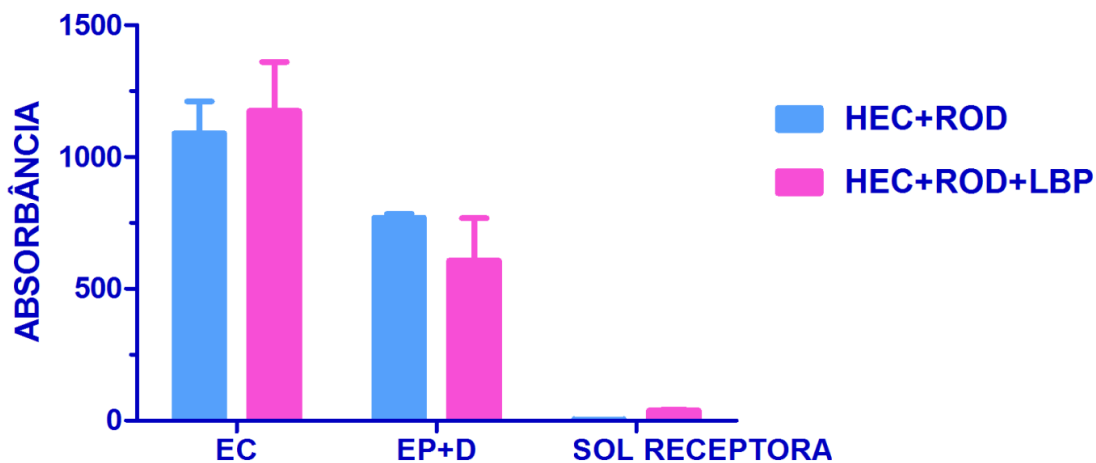


As concentrações testadas foram 1,56 µg/mL, 3,12 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro e os experimentos foram realizados em triplicatas. Os valores estão representados como médias \pm DP. ** indicam diferença significativa entre as concentrações de 1,56 µg/mL e 100 µg/mL ($p < 0,01$). Os dados não apresentaram distribuição normal e, portanto, foram analisados por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

3.4 Análise da penetração da rodamina em modelos de células de difusão (*in vitro*)

O ensaio de permeação *in vitro* realizado em pele de orelha de porco, através do modelo de células verticais (tipo Franz), demonstrou que a fração LBP, presente em uma das formulações testadas, atua como um agente facilitador da penetração da formulação. Esta conclusão foi possível graças a presença do marcador rodamina na solução receptora das células que foram ensaiadas com a formulação HEC+ROD+LBP (FIGURA 22), indicando que a permeação foi completa, chegando até a fase receptora. Houve ainda a permeação das duas formulações testadas, pois as absorbâncias encontradas demonstraram que com ou sem a fração LBP, o marcador rodamina presente nas formulações pôde ser quantificado tanto no EC quanto na EP+D. Baseado em nossos achados, podemos também sugerir um potencial facilitador de permeação, com propriedade de retenção da fração LBP, provavelmente contribuindo para os efeitos biológicos encontrados neste estudo.

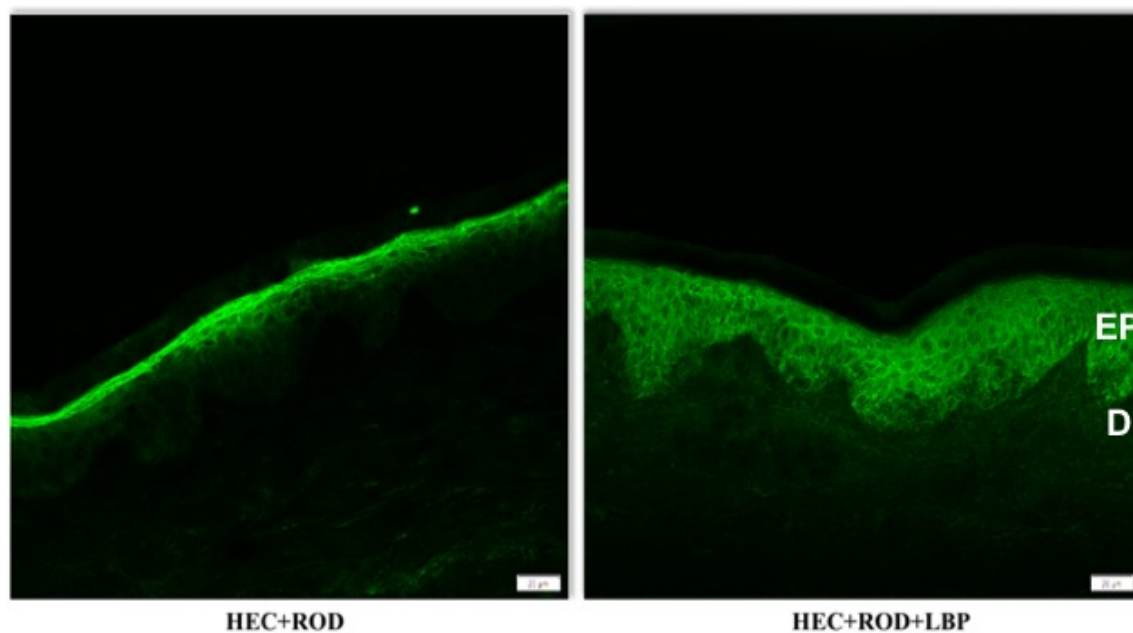
FIGURA 22: Ensaio *in vitro* de permeação das formulações HEC+ROD e HEC+ROD+LBP em diferentes camadas como: estrato córneo (EC), epiderme mais derme (EP+D) e solução receptora de amostras de pele de orelha suína por células de difusão (Tipo Franz).



3.5 Distribuição da rodamina na pele por Microscopia Confocal de Fluorescência

Através de microscopia confocal de fluorescência foi possível observar a distribuição do fluoróforo rodamina, incorporado nas formulações em teste (HEC+ROD e HEC+ROD+LBP). Uma melhor distribuição da formulação HEC+ROD+LBP foi observada quando comparada com a formulação HEC+ROD. A presença da fração LBP parece promover uma distribuição mais homogênea nas diferentes camadas da pele e ainda resulta no alcance de uma maior profundidade tanto na epiderme quanto na derme. Por outro lado, a distribuição da formulação sem a fração HEC+ROD se restringe ao estrato córneo e apresenta uma menor homogeneidade na derme (FIGURA 23). Assim, é possível afirmar que a presença da fração LBP na composição de uma formulação pode promover uma melhor distribuição e homogeneidade da formulação nas diferentes camadas da pele.

FIGURA 23: Distribuição do fluoróforo rodamina B nas camadas da pele de orelha suína em experimento *in vitro*.

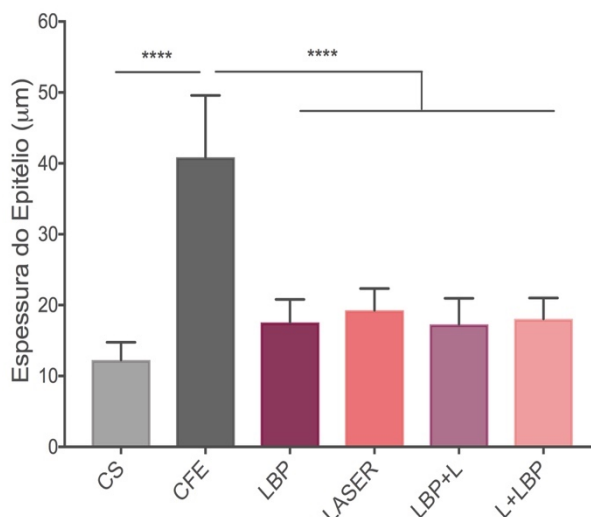


As formulações HEC+ROD e HEC+ROD+LBP foram aplicadas em modelo de células de difusão (tipo Franz) e as amostras foram coletadas após 18 horas da aplicação. Epiderme (EP), derme (D). Bar = 20 µm.

3.6 Análise histológica

Após os tratamentos, amostras de pele dos animais foram coletadas e submetidas a processamento histológico. Secções representativas de pele da região dorsal dos camundongos *hairless* foram fotografadas e analisadas por microscopia óptica. Na análise de coloração com hematoxilina eosina foi possível observar que o grupo controle saudável (CS) não apresentou alterações histológicas na epiderme e na derme, enquanto que no grupo no qual os animais foram expostos à radiação ultravioleta (CFE) observou-se alterações estruturais, como a fragmentação discreta das fibras na região da derme e o espessamento da epiderme, quando comparado aos grupos tratados e ao grupo CS. Os resultados indicam diferenças significativas ($p < 0,0001$) na espessura da epiderme entre o controle fotoenvelhecido (CFE) e os grupos tratados (LBP, LASER, LBP + L, L + LBP) (FIGURA 24).

FIGURA 24: Espessura da epiderme após tratamentos realizados durante a indução do fotoenvelhecimento.

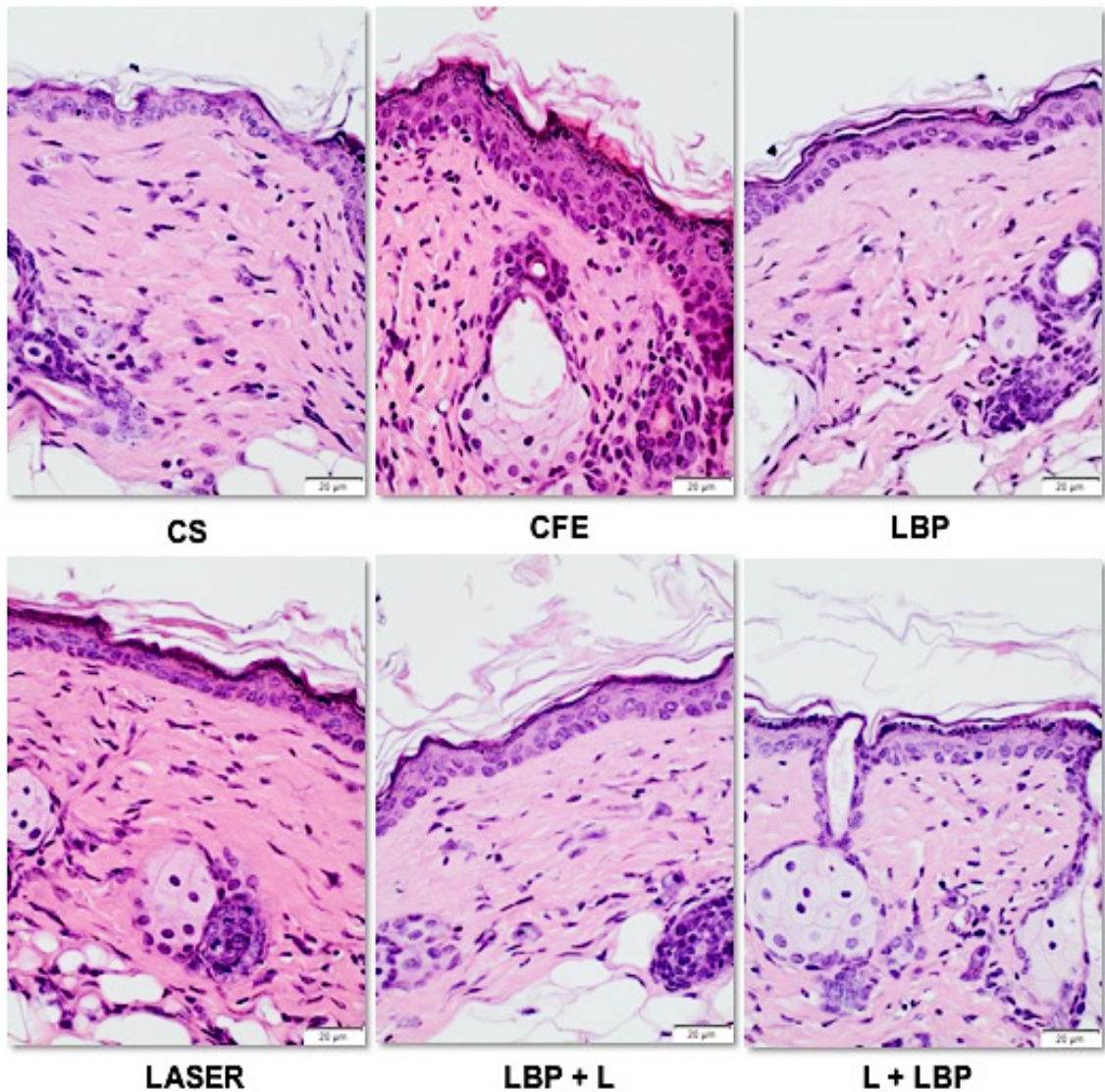


Os animais foram fotoenvelhecidos e tratados durante este processo com fração LBP e laser vermelho; ambos isolados e associados (LBP+L e L+LBP). As imagens das seções foram capturadas e digitalizadas através de um fotomicroscópio. Os valores estão representados como médias \pm DPs. **** indica diferença significativa ($p < 0,0001$) entre o controle fotoenvelhecido (CFE) e os grupos tratados e grupo CS. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

Os tratamentos aplicados, tanto isolados (LBP e LASER) quanto associados (LBP+L e L+LBP), apresentaram um potencial protetor contra o aumento da espessura do epitélio, um tipo de dano causado pela exposição crônica à RUV. Os resultados obtidos após os tratamentos foram semelhantes ao grupo controle (CS), que não foi exposto ao fotoenvelhecimento. O grupo tratado com fração LBP (LBP) apresentou um adelgaçamento da epiderme e fibras de colágeno mais organizadas na derme reticular, com feixes paralelos à epiderme e fibras mais longas e fragmentadas. No grupo tratado com o laser vermelho (LASER) observou-se um espessamento e aumento da densidade das fibras de colágeno na derme, com uma maior quantidade de fibras maduras, apresentando um tipo de reticulação característico desse estágio. Nos grupos que receberam associação de tratamentos (LBP+L e L+LBP), a derme assumiu características de cada tratamento isolado (LBP e LASER), representando uma fase intermediária entre eles

quanto à formação de colágeno e densidade (FIGURA 25). Em geral, todos os tratamentos parecem melhorar a derme e as características da epiderme quando os tratamentos são realizados durante o fotoenvelhecimento induzido pela RUV.

FIGURA 25: Potencial fotoprotetor da fração LBP e do laser vermelho.

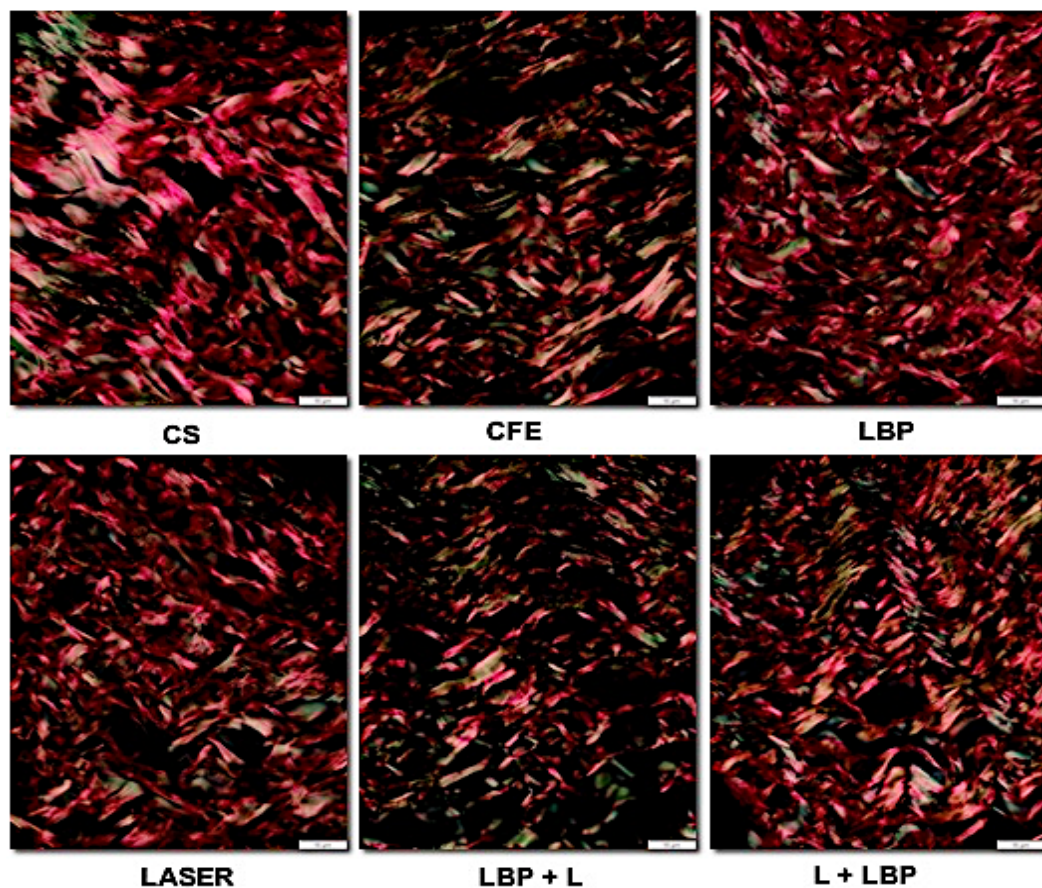


Fotomicrografias de secções coradas com hematoxilina eosina. Os camundongos *hairless* foram fotoenvelhecidos através da administração de doses sub-eritematosas de luz ultravioleta durante 6 semanas. Os tratamentos com a fração LBP, LASER, LBP+L e L+LBP ocorreram a partir da terceira semana de irradiação e terminaram na sexta semana. Bar = 20 µm.

A análise histológica das secções da região dérmica total coradas com picro-sírius, mostrou diferença significativa na quantificação de fibras colágenas birrefringentes por

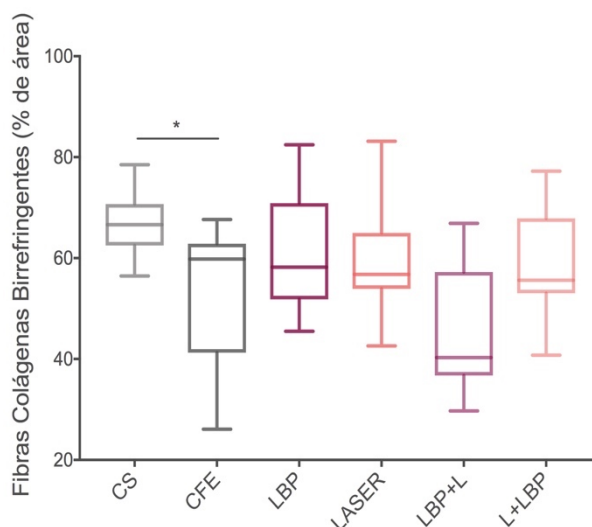
porcentagem de área. Uma menor quantidade de fibras de colágeno foi observada no grupo CFE quando comparado com o grupo CS ($p < 0,05$), confirmando um dos efeitos deletérios do RUV no aumento da degradação e na diminuição da quantidade de fibras colágenas no grupo irradiado e sem tratamento (FIGURAS 26 e 27). Os tratamentos aplicados durante o processo de fotoenvelhecimento apresentaram um potencial protetor contra a degradação das fibras de colágeno, com exceção do grupo LBP+L, que apresentou menor quantidade de fibras de colágeno birrefringentes quando comparadas aos grupos tratados e controles (CS e CFE). Os resultados sugerem um efeito inibitório da síntese de colágeno ou um aumento da sua degradação devido à aplicação da fração LBP antes do laser.

FIGURA 26: Fotomicrografias de secções coradas com picro-sirius.



Todos os grupos experimentais, exceto o grupo CS, foram fotoenvelhecidos durante 6 semanas e receberam os tratamentos a partir da terceira semana até a sexta semana (durante a fotoexposição). As secções foram coradas com picro-sirius para a quantificação das fibras colágenas birrefringentes (vermelho/verde), sob microscopia de luz polarizada. Bar = 10 μ m.

FIGURA 27: Porcentagem de fibras colágenas birrefringentes (%) na pele dorsal de camundongos *hairless*.



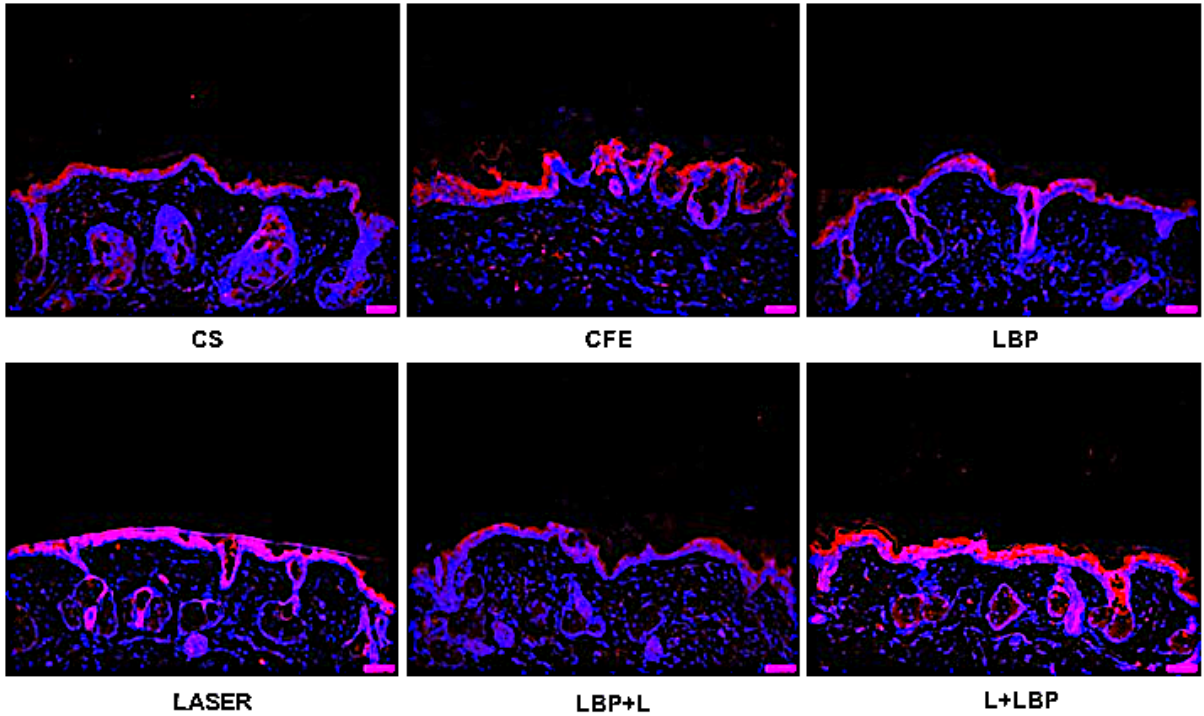
Grupos experimentais: controle sadio (CS), controle fotoenvelhecido (CFE), grupos tratados com LBP, LASER, LBP+ L e L+LBP. As imagens das secções foram capturadas e digitalizadas através de um fotomicroscópio (Olympus SC30) e a análise quantitativa da porcentagem de área de fibras de colágeno birrefringentes foi realizada usando o software Image J[®]. Os valores estão representados como médias \pm DPs. * indicam diferenças significativas entre os grupos CS e o grupo CFE ($p < 0,05$). Os dados não apresentaram distribuição normal e, portanto, foram analisados por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para comparação entre grupos, usando o software Graph Pad Prism[®] 7.0.

3.7 Imunofluorescência das enzimas MMP-1, 2 e 9

Os achados encontrados na análise das expressões da metaloproteinase 1 (MMP-1) demonstraram um aumento de 19,79% no grupo CFE com relação ao grupo de animais que não foram fotoenvelhecidos (CS). Dentre os grupos tratados, os grupos LBP e LBP+L apresentaram uma diminuição na expressão de MMP-1 quando esses tratamentos foram realizados durante a indução do fotoenvelhecimento, promovendo uma proteção contra esse fotodano gerado pela RUV, diferentemente do grupo LASER que apresentou a expressão igual ao grupo CFE (FIGURA 28). No grupo L+LBP foi possível observar um aumento significativo da expressão de MMP-1 ($p < 0,05$), quando comparado com os tratamentos LBP e LBP+L (FIGURA 29). Essa diferença indica que a associação dos tratamentos realizados provavelmente induziu um aumento na expressão da enzima MMP-1 devido a ordem da aplicação dos tratamentos, uma

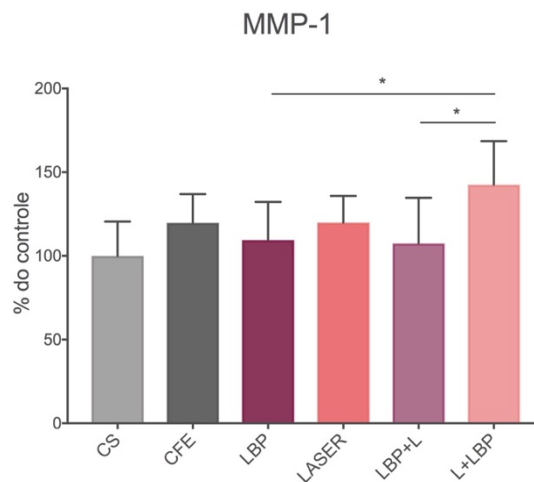
vez que os mesmos tratamentos aplicados de maneira inversa mantiveram os níveis de expressão próximo aos do grupo CS.

FIGURA 28: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para a marcação da enzima MMP-1.



As secções foram marcadas com o anticorpo Anti-MMP-1 (marcado em rosa) para quantificação dos níveis de expressão da enzima, sob microscópio de imunofluorescência. Bar = 50 μm.

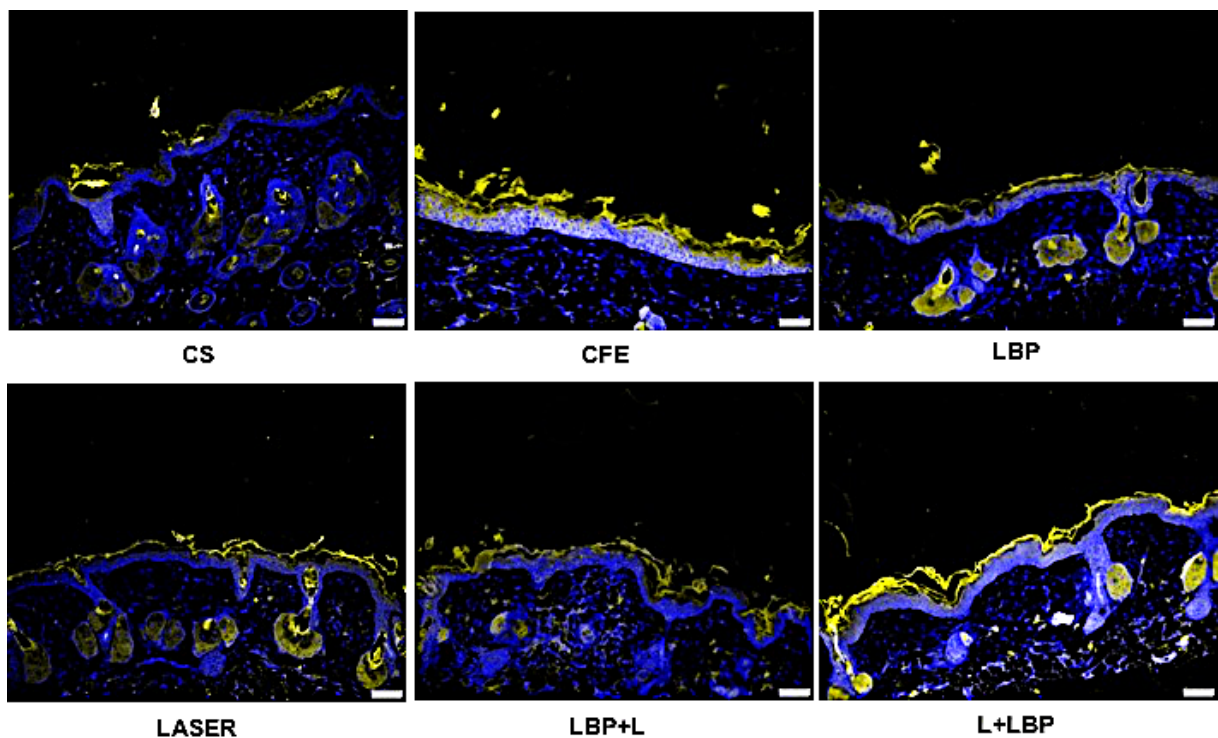
FIGURA 29: Análise quantitativa da expressão da enzima MMP-1.



Os valores estão representados como médias ± DPs. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos LBP e LBP+L com o L+LBP. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

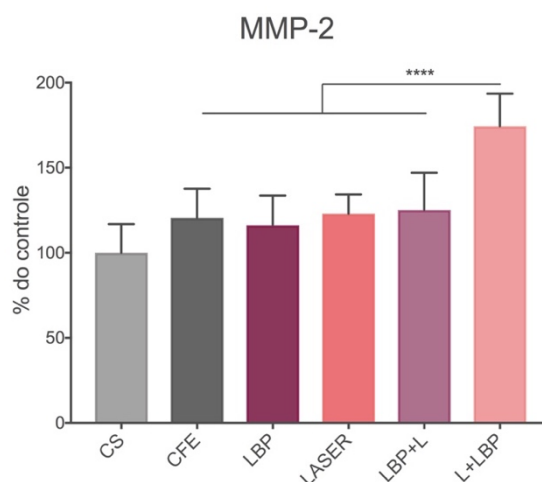
Os níveis de expressão da enzima MMP-2 do grupo CFE aumentaram em 20,53% com relação ao grupo CS (FIGURA 30). Os grupos tratados mantiveram os níveis próximos aos do grupo CFE (animais fotoenvelhecidos que não receberam tratamento), com exceção do grupo de animais tratados com laser vermelho e em seguida com a fração LBP (L+LBP) que apresentou um aumento significativo ($p < 0,0001$) na expressão de MMP-2 quando comparado aos outros tratamentos (LBP, LASER e LBP+L) e o grupo CFE (FIGURA 31). Similarmente aos achados encontrados na análise de expressão da enzima MMP-1, os tratamentos aplicados durante a indução do fotoenvelhecimento no dorso dos camundongos *hairless* induziu um aumento na expressão dos níveis da enzima MMP-2.

FIGURA 30: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para a marcação da enzima MMP-2.



As secções foram marcadas com o anticorpo Anti-MMP-2 (marcado em amarelo) para quantificação dos níveis de expressão da enzima, sob microscópio de imunofluorescência. Bar = 50 μ m.

FIGURA 31: Análise quantitativa da expressão da enzima MMP-2.

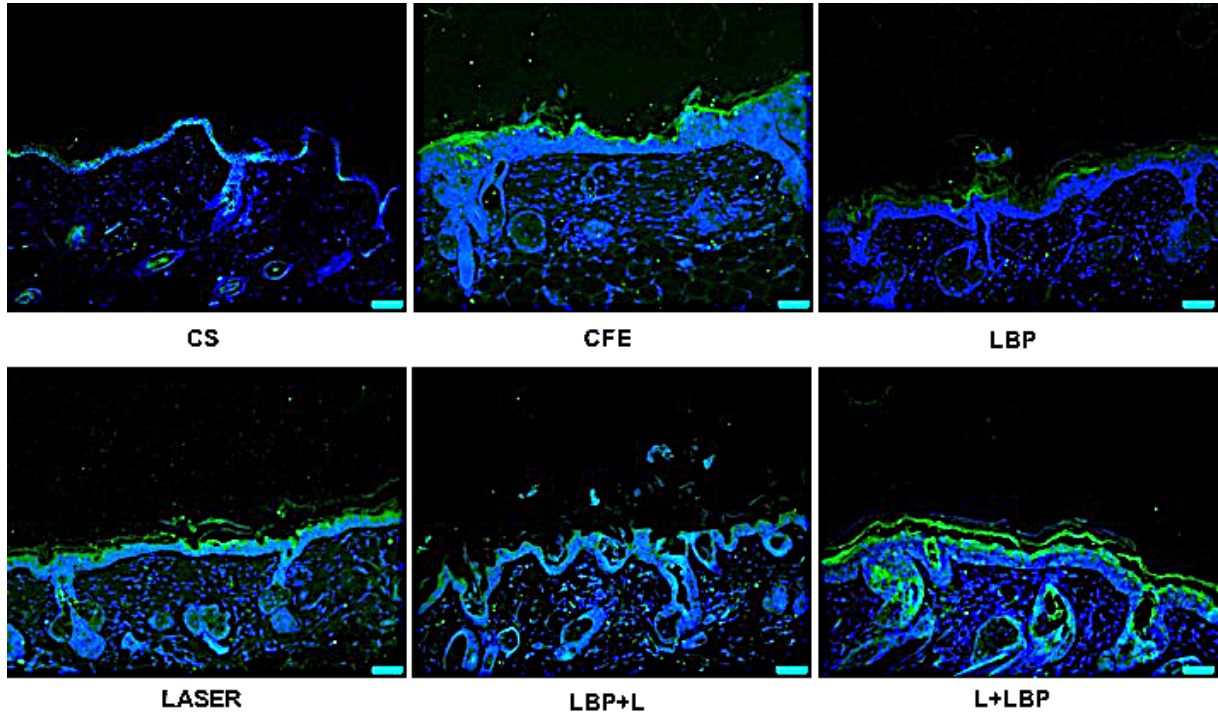


Os valores estão representados como médias \pm DPs. **** indica diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos CFE e os grupos tratados com LBP, LASER e LBP+L com o grupo tratado com L+LBP. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

Diferenças significativas entre os grupos CS e CFE foram encontradas também nos níveis de expressão da enzima MMP-9 ($p < 0,0001$). Os achados indicam que a indução artificial do fotoenvelhecimento nos camundongos *hairless* promoveu um aumento na expressão desta enzima (FIGURA 32 e 33). Como visto anteriormente, na análise dos níveis das enzimas MMP- 2 através da técnica de imunofluorescência, o tratamento com laser vermelho e em seguida com a fração LBP durante a indução do fotoenvelhecimento dos animais também promoveu um aumento significativo na expressão da enzima MMP-9 ($p < 0,0001$), quando comparado ao grupo de animais que foram fotoenvelhecidos e não tratados (CFE). De acordo com os nossos achados a associação dos tratamentos aplicados nesta ordem citada foi capaz de produzir um aumento nos níveis de expressão das enzimas MMP-1, 2 e 9. Tais resultados sugerem que a aplicação do laser vermelho juntamente com a fração LBP em seguida da exposição dos animais a radiação ultravioleta pode ter gerado um efeito de sobreposição de energia sobre a pele dos animais fotoexpostos, induzindo uma exacerbada expressão das metaloproteinases de matriz atuantes no processo de degradação das fibras de colágeno na

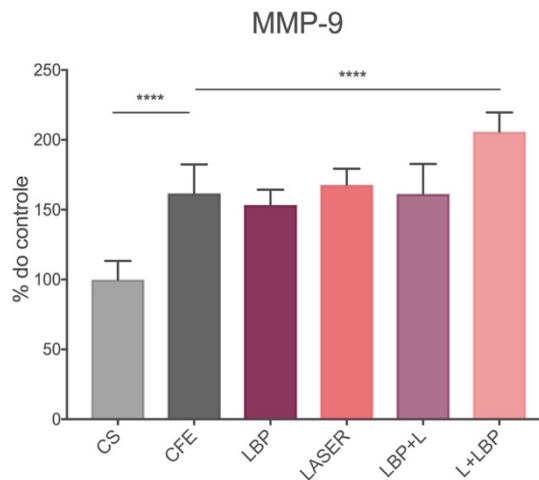
derme, conhecido como um mecanismo de resposta frente a demasiada exposição à radiação ultravioleta proveniente do espectro solar.

FIGURA 32: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para a marcação da enzima MMP-9.



As secções foram marcadas com o anticorpo Anti-MMP-9 (marcado em verde) para quantificação dos níveis de expressão da enzima, sob microscópio de imunofluorescência. Bar = 50 µm.

FIGURA 33: Análise quantitativa da expressão da enzima MMP-9.



Os valores estão representados como médias \pm DPs. **** indica diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos CS e CFE e entre o grupo CFE e grupo tratado com L+LBP. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo fornece um perfil fitoquímico baseado em experimentos de RMN mono e bidimensionais das principais moléculas bioativas presentes na fração de polissacarídeos extraídas do fruto de *Lycium barbarum* (Agrawal 1992). As moléculas foram identificadas como possíveis unidades glicosídicas de arabinose, glucose, galactose e ainda foram identificados traços de ácidos graxos de cadeia longa possuindo insaturações esterificando os sacarídeos. Pôde-se verificar que o polissacarídeo tem constituição de diferentes monômeros, assim como a interligação dos mesmos, corroborando com os achados de (Zhou, Jiang et al. 2018), que identificaram um isolamento de polissacarídeos do fruto de *Lycium barbarum* com similar composição, apresentando três unidades a mais, além da presença de arabinose, glucose e galactose, também a ramnose, xilose e manose. (Yuan, Wang et al. 2016) também isolaram e caracterizaram um polissacarídeo do fruto de *L. barbarum*. A proposta da composição foi apresentada como LBPA, através de RMN mono e bidimensional, assim como por espectrometria de massas e determinação da faixa de massa molecular por cromatografia de alta performance com permeação em gel.

Muitos estudos sobre farmacologia e fitoquímica do fruto de *L. barbarum* demonstraram que seus principais ingredientes ativos, com efeitos antioxidantes, seriam os polissacarídeos (LBP) nele presentes (Liang, Jin et al. 2011). O potencial antioxidante da composição proposta (fração LBP) neste estudo foi verificado e apresentou significativo efeito na inibição da oxidação testada pelo método radical DPPH. O efeito antioxidante dos polissacarídeos extraídos do fruto de *Lycium barbarum* é bem conhecido na literatura (Wu, Ng et al. 2004, Lin, Wang et al. 2009). O mecanismo antioxidante é um componente importante na prevenção e tratamento do envelhecimento. Experimentos mostrando os efeitos antienvhecimento de *Lycium barbarum* frequentemente usam radicais livres como biomarcadores tóxicos experimentais (Gao, Wei et al. 2017). Um estudo investigou a atividade

antioxidante *in vitro* dos polissacarídeos de *Lycium barbarum* (LBP) e demonstrou, por espectrofotometria no ultravioleta, que a fração LBP possui eficiente atividade sequestradora de ânions superóxido, radicais hidroxila e radicais livres de DPPH. A taxa de depuração aumentou gradualmente com o aumento da concentração da fração, e quando a concentração atingiu um certo valor, a taxa se estabilizou (Zhang, Gu *et al.* 2013). Outro estudo demonstrou que o potencial antioxidante de LBP poderia proteger parcialmente queratinócitos humanos imortalizados (células HaCaT) contra fotodano induzido por radiação ultravioleta B (RUVB) através da ativação da via Nrf2/ARE, capturando assim EROs, reduzindo danos no DNA e subsequentemente suprimindo a via MAP p38 induzida por RUVB (Li, Li *et al.* 2017). Desse modo, o potencial antioxidante da fração LBP pode ser uma nova via a ser amplamente explorada pela indústria de cosmeceuticos no cuidado da pele contra danos oxidativos causados pela radiação ultravioleta.

Métodos alternativos são utilizados para avaliar o desempenho de diferentes tipos de formulações. Os modelos mais utilizados para realizar estudos de permeação são os de pele animal e humana *ex vivo*. Através da padronização de protocolos e técnicas, os modelos de pele disponíveis podem ser úteis em substituição da pele humana *in vivo*, a fim de avaliar a bioequivalência de produtos tópicos (Abd, Yousef *et al.* 2016). Realizamos um estudo de permeação *in vitro*, utilizando orelha suína como modelo de pele animal para ensaiar a penetração de duas formulações tópicas, uma contendo a fração LBP e a outra na ausência desta, com o objetivo de realizar análises quantitativas e qualitativas da penetração das duas formulações usando o fluoróforo rodamina B como marcador de permeação. Nossos achados demonstraram que a formulação contendo a fração LBP promoveu uma melhor distribuição da formulação em todas as camadas da pele, quando comparado com a mesma formulação sem a fração LBP. Assim, é possível afirmar que a fração LBP atuou como um facilitador de permeação cutânea nos camundongos *hairless*, sendo capaz de promover uma distribuição

homogênea da formulação na epiderme e derme. Apesar da constituição da pele do dorso de camundongos e de orelha suína serem distintos, acreditamos que tal diferença não seja suficiente para alterar a permeação cutânea da fração nos experimentos *in vivo*. Contudo, somente experimentos de permeação utilizando a pele dorsal de camundongos poderiam responder em definitivo esta questão.

Ensaio utilizando o mesmo modelo experimental foram realizados com formulações contendo curcumina. A penetração do composto se apresentou baixa, mas a sua retenção na pele ocorreu de forma prolongada. Os autores sugeriram um potencial uso da curcumina em formulações antienvhecimento devido a essa propriedade encontrada no composto (Gonçalves 2014). Desta forma, propomos que a fração LBP, isolada neste presente trabalho, também possa ser usada em formulações antienvhecimento devido a sua propriedade antioxidante, além de atuar como agente facilitador de permeação e distribuição homogênea da formulação nas camadas da epiderme e derme.

Atualmente, a procura por compostos que possam ser usados como agentes fotoprotetores tem crescido exponencialmente (OyetakinWhite, Tribout *et al.* 2012, Yuan, Liu *et al.* 2012, Farris, Yatskayer *et al.* 2014). Nossos achados sobre os efeitos da fração LBP e do laser vermelho, aplicados tanto isolados quanto associados, na proteção contra os danos gerados pela radiação ultravioleta mostraram que os tratamentos foram capazes de promover proteção contra o espessamento epidérmico e a fragmentação de fibras colágenas na derme. (Hwang, Sun *et al.* 2013) observaram um efeito semelhante do extrato de ginseng (EG) na proteção contra o aumento da espessura do epitélio e alterações na densidade de colágeno. A epiderme de camundongos *hairless* que foram expostos à radiação ultravioleta e tratados com EG, apresentou uma menor espessura. A derme, por sua vez, apresentou fibras colágenas regulares e mais densas quando comparadas com os animais fotoenvelhecidos e não tratados.

Em nosso estudo, a análise quantitativa das fibras colágenas birrefringentes revelou resultados promissores nos grupos tratados com a fração LBP, LASER e L+LBP em comparação com o grupo CFE, porém não houve diferença significativa. Atribuímos esses achados a uma provável baixa concentração da fração LBP e/ou a necessidade de ajuste na dose de aplicação da fotobiomodulação. No caso do grupo LBP+L, além dos pressupostos descritos acima, a ordem de aplicação dos tratamentos pode ter influenciado nos resultados obtidos. (Serafini, Detoni et al. 2014) também investigaram os efeitos fotoprotetores de formulações tópicas contendo extrato vegetal (*Morinda citrifolia*) e observaram que formulações à base de 10% e 15% de extrato apresentaram características morfológicas semelhantes ao grupo de animais não irradiados. Essa seria uma boa referência para novos ensaios com concentrações mais altas da fração LBP.

É conhecido que as metaloproteinases de matriz (MMPs) desempenham papéis importantes como enzimas de degradação e estão estruturalmente relacionadas a vários processos, incluindo a inflamação, a invasão de células tumorais e o envelhecimento da pele. As MMPs participam do processo de fotoenvelhecimento da pele e a regulação de suas atividades pode ser uma estratégia para a prevenção e tratamento dos danos na pele induzidos pela radiação ultravioleta (Pyun, Kim *et al.* 2012). Em nossos achados a análise dos níveis de expressão das metaloproteinases de matriz 1, 2 e 9 demonstrou que os tratamentos parecem produzir diferentes respostas dependendo da ordem da aplicação e da forma isolada ou associada. Todos os tratamentos realizados mantiveram os níveis de expressão das enzimas MMP-1, 2 e 9 próximos ao grupo CFE, não demonstrando assim eficácia na redução da expressão dessas metaloproteinases de matriz, com exceção do grupo L+LBP, na qual a aplicação do laser vermelho foi feita antes da aplicação da fração LBP. Este grupo apresentou altos níveis de expressão destas enzimas e possivelmente a ordem de aplicação pode ter influenciado na resposta ao tratamento do grupo L+LBP.

É sabido que a RUV pode danificar diretamente as biomoléculas cutâneas que são ricas em cromóforos, induzindo a produção de EROs, atuando nas células e componentes da MEC (Naylor, Watson *et al.* 2011). Supostamente, a aplicação da fotobiomodulação em seguida da sessão de irradiação ultravioleta pode ter provocado uma resposta oxidante devido a quantidade de energia depositada no tecido em um curto prazo de tempo, sendo ainda potencializada por um provável sinergismo da fração LBP com a fotobiomodulação, uma vez que os tratamentos aplicados de maneira inversa e isolados não produziram a mesma resposta. Estudos geralmente realizados em células da pele *in vitro* ou em modelos animais sugerem que micronutrientes e fitoquímicos podem fornecer fotoproteção da pele humana (Poljsak, Dahmane *et al.* 2013). No entanto, a fotoproteção só pode ser alcançada se um intervalo ideal de dose farmacológica for alcançado na pele humana devido a reações pró-oxidantes bem conhecidas de antioxidantes, como por exemplo, no caso de concentrações excessivas de carotenoides (Pandel, Poljsak *et al.* 2013). (Silva, Machado *et al.* 2018) investigaram a associação de antioxidantes e fotobiomodulação com o objetivo de promover o rejuvenescimento da pele. Foram testados os efeitos dos extratos de camomila, alecrim, mirtilo, chá verde, figo, romã e nozes, associados a uma dose de 1 J/cm² do laser vermelho (640 nm) em queratinócitos expostos a radiação ultravioleta A. Os dados mostraram que a fotobiomodulação é uma terapia promissora para restaurar os queratinócitos após o dano UVA, mas que o mecanismo detalhado e os efeitos das associações exigem maior exploração. Embora a combinação da fotobiomodulação com extratos naturais possa ser uma estratégia útil, a escolha de um extrato natural é um desafio, uma vez que a concentração de trabalho e outras propriedades podem trazer resultados indesejados (Silva, Machado *et al.* 2018). Contudo, a atividade das MMP-1, 2 e 9 parece não ter sido aumentada no grupo L+LBP, uma vez que a porcentagem de área das fibras colágenas birrefringentes se apresentou 5,85% maior que a do grupo CFE. Por sua vez, o grupo LBP+L apresentou níveis de expressão das enzimas próximos ao grupo CFE, mas com um possível

aumento da atividade, já que houve uma diminuição da porcentagem de área de 8,51% das fibras colágenas birrefringentes. Alguns autores atribuíram a supressão da atividade de MMP-2 e 9 a uma inibição da degradação do colágeno e a redução da formação de rugas. Os autores trataram os animais com uma solução oral de um tripeptídeo de colágeno (CTP) em diferentes concentrações durante a exposição à radiação UVB e observaram que o CTP inibiu as expressões de MMP-3 e 13, a atividade das enzimas MMP-2 e 9 e ainda reduziu a espessura da pele nos animais que foram submetidos a sessões de radiação UVB (Pyun, Kim *et al.* 2012). Ensaio de atividade de MMPs por zimografia poderiam auxiliar no entendimento destes resultados. Apesar destes ensaios terem sido realizados neste estudo, a grande variação entre a atividade das MMPs nos animais em cada grupo impediu uma conclusão definitiva neste sentido.

Tomados em conjunto, os resultados deste capítulo indicam que a fração LBP isolada do fruto de *Lycium barbarum* possui um potencial antioxidante e de permeação na pele suína (*in vitro*). Os achados também revelaram que os tratamentos com a fração LBP e a fotobiomodulação, aplicados isolados e associados, durante o processo de indução do fotoenvelhecimento parecem ser eficazes na proteção da pele de camundongos *hairless* contra efeitos deletérios da RUV, como o espessamento da epiderme e a degradação das fibras colágenas. Contudo, os tratamentos produziram diferentes respostas quando aplicados de forma isolada ou associada, tendo ainda como interferência a ordem da aplicação dos mesmos. Algumas limitações foram encontradas neste estudo com relação a necessidade de ensaios pilotos com o objetivo de investigar quais eram as ideais concentrações da fração LBP e os melhores parâmetros dosimétricos do laser vermelho a serem posteriormente testados no período experimental de tratamento dos animais neste modelo de fotodano induzido por RUV. No entanto, a dificuldade de reprodução da linhagem HRS/J, limitou o número de animais para o período experimental, sendo assim inviável o uso de animais para ensaios pilotos. Assim, há

a necessidade de estudos adicionais no mesmo modelo experimental para investigar os efeitos da fração LBP em diferentes concentrações e do laser vermelho em diferentes doses, com o objetivo de encontrar uma dose ideal para a prevenção do fotodano produzido pela radiação ultravioleta na pele de camundongos *hairless*. Essas investigações complementariam o estudo dos efeitos isolados e associados de terapias não invasivas e preventivas como a fitoterapia e a fotobiomodulação.

**CAPÍTULO III - APLICAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO
ASSOCIADA A FRAÇÃO LBP NO TRATAMENTO DO
FOTODANO INDUZIDO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA
NA PELE DO DORSO DE CAMUNDONGOS *HAIRLESS***

1. INTRODUÇÃO

O fotoenvelhecimento é um processo cumulativo e muitos fatores contribuem para sua indução, como o grau de exposição ao sol e o tipo pigmentação da pele (Petruk, Del Giudice *et al.* 2018). As células da pele ativamente respondem a esses sinais, alterando seu repertório de expressão gênica para prevenir danos induzidos pela RUV (Angel, Szabowski *et al.* 2001).

A exposição crônica à RUV induz uma excessiva produção de EROs, que ativam receptores de superfície e iniciam uma cascata de sinalização, promovendo oxidação proteica, dano mitocondrial e no DNA. As EROs ainda desencadeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (Yaar e Gilchrist 2007, Gilchrist, Eller *et al.* 2009, Gilchrist 2013). Uma série de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) induzem o fator de transcrição da proteína ativadora 1 (AP-1) para iniciar a transcrição dos genes c-Jun e c-Fos após a exposição à RUV (Gillardon, Eschenfelder *et al.* 1994, Fisher, Talwar *et al.* 1999, Soriani, Hejmadi *et al.* 2000, Sjerobabski Masnec e Poduje 2008). Há três famílias de MAPKs em células de mamíferos conhecidas como quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase amino-terminal c-Jun (JNK) e p38, cada uma das quais forma uma via de sinalização. Cada via é acoplada a receptores de superfície celular através de membros da pequena família de proteínas de ligação a GTP, incluindo Ras, Rac e Cdc42 (Coso, Chiariello *et al.* 1995, Minden, Lin *et al.* 1995). Embora haja um “*cross talk*” entre os caminhos, a via ERK é mais associada à ativação dos receptores de fatores de crescimento, enquanto que as vias JNK e p38 estão mais intimamente associadas à ativação de receptores de citocinas e com estresse celular, incluindo a exposição à RUV. A ativação da MAPKs induz a expressão tanto c-Jun como c-Fos, que compreendem, juntamente com fatores proteicos, o fator de transcrição da proteína ativadora AP-1 (Karin e Hunter 1995, Claret, Hibi *et al.* 1996, Whitmarsh e Davis 1996). AP-1 exerce controle na atividade da transcrição basal e induzível de vários genes contendo regiões de ligação AP-1 (sequência de consenso 5'-TGAG / CTCA-3'), também conhecido como

elemento responsivo ao TPA (Angel e Karin 1991). O complexo proteico de AP-1 é composto por um grupo de membros estrutural e funcionalmente relacionados à família da proteína Jun (originalmente descrita como c-Jun), JunB e JunD e a família da proteína Fos (originalmente descrita como cFos), FosB, Fra-1 e Fra-2. (Hess, Angel *et al.* 2004). A expressão constitutiva de c-Fos pode refletir seu papel na proliferação e diferenciação de células normais da pele, que ocorrem continuamente. No entanto, c-Fos deve heterodimerizar com um membro da família Jun para formar um complexo AP-1 ativo (Fisher, Talwar *et al.* 1998). Isso resulta na indução positiva da síntese de metaloproteinases de matriz (MMPs) como a MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 e MMP-9. Em conjunto, essas enzimas degradam fibras de colágeno e elastina da MEC na pele (Varani, Spearman *et al.* 2001). Adicionalmente, uma diminuição na expressão do fator de crescimento tumoral β (TGF- β) inibe a produção de colágeno e aumenta a de elastina, comprometendo consequentemente a integridade estrutural da pele (Yaar e Gilchrist 2007, Gilchrist, Eller *et al.* 2009, Gilchrist 2013).

A fotoexposição prolongada da pele induz um envelhecimento prematuro tanto na epiderme quanto na derme (Menter, Sayre *et al.* 1996, Scharffetter-Kochanek, Wlaschek *et al.* 1997). Essas alterações estão associadas clinicamente a rugosidade, pigmentação irregular, telangiectasia, rugas profundas e neoplasia (Gilchrist 1989, Oikarinen 1990, Chung, Seo *et al.* 2001). O desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do fotoenvelhecimento vem ganhando importância devido aos procedimentos cirúrgicos estéticos, na maioria dos casos, serem de alto custo, muito invasivos e que poderiam levar a complicações (Petruk, Del Giudice *et al.* 2018).

A fototerapia ou fotobiomodulação refere-se ao uso de fótons, em uma irradiância não-térmica, para alterar a atividade biológica de células e tecidos. O mecanismo da fotobiomodulação no nível celular foi atribuído à absorção da radiação monocromática visível e infravermelha próxima por componentes da cadeia respiratória celular (Karu 1989).

Nas últimas décadas, terapias a laser não-ablativas têm sido cada vez mais utilizadas no tratamento estético de rugas finas, da pele fotoenvelhecida e em cicatrizes, um processo conhecido como fotorejuvenescimento (Avci, Gupta *et al.* 2013). Tratamentos da pele com fotobiomodulação visam melhorar a pele fotoenvelhecida e envelhecida sem destruir a epiderme (Hardaway e Ross 2002). Estudos relataram um aumento na produção de procolágeno, colágeno, e fatores básicos de crescimento de fibroblastos (bFGF), bem como proliferação de fibroblastos após exposição a irradiação com laser em modelos *in vitro* e *in vivo* (Abergel, Lyons *et al.* 1987, Yu, Naim *et al.* 1994).

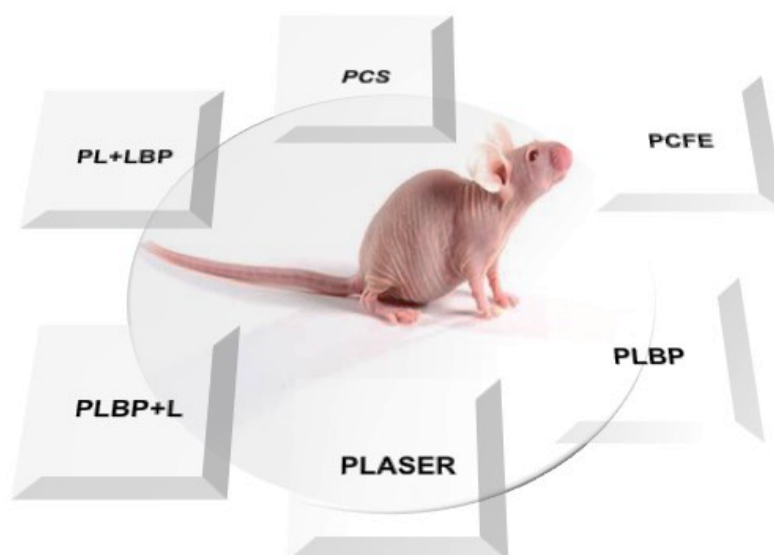
Extratos de plantas e compostos naturais têm sido historicamente utilizados via oral e tópica, mas o efeito da maioria destes compostos ainda precisa ser estudado em mais detalhes. O mercado de cosméticos para o produtos antienvelhecimento e fotoprotetores, baseados em compostos naturais, está crescendo continuamente, e há uma necessidade de expansão da pesquisa neste campo (Cavinato, Waltenberger *et al.* 2017). Estudos indicam que os polissacarídeos do fruto de *Lycium barbarum* (Fração LBP) possuem uma gama de atividades, incluindo propriedades antioxidantes (Amagase e Nance 2008, Chang e So 2008), aumentando os antioxidantes endógenos, como SOD e GSH-Px, reduzindo o nível de malondialdeído (MDA) e protegendo a pele dos danos mediados por radicais de oxigênio (Liang, Jin *et al.* 2011). Há, no entanto, poucos relatos sobre a aplicação tópica dos extratos ou suas frações, gerando assim uma necessidade de maiores investigações do uso da fração LBP como um potencial tratamento da pele danificada pela RUV. Uma possível associação entre a fração LBP e a fotobiomodulação parece ser uma estratégia promissora no fotorejuvenescimento da pele. Assim, este capítulo descreve os efeitos da fotobiomodulação associada a fração de polissacarídeos extraídos do fruto de *Lycium barbarum* no tratamento do fotodano induzido por radiação ultravioleta na pele do dorso de camundongos *hairless*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e divisão dos grupos

Uma colônia da linhagem HRS/J foi doada à nossa instituição pelo Biotério de Produção e Experimentação de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da USP/SP. A mesma foi expandida e mantida no biotério localizado no Departamento de Fisioterapia - DFisio/UFSCar. Foram utilizados 47 camundongos fêmeas *hairless* da linhagem HRS/J, com idade aproximada de 8 semanas provenientes dessa colônia. Todos os animais foram agrupados (cada grupo experimental/caixa) em gaiolas de polipropileno (30 x 32 x 18 cm), forradas com serragem e com livre acesso à água e alimento. Os animais foram mantidos nas mesmas condições supracitadas no capítulo II e divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais conforme figura 34.

FIGURA 34: Divisão dos grupos experimentais.



Fonte: Imagem (camundongo) extraída de: <https://www.criver.com/sites/default/files/resource-files/sho-mice-us-pricing.pdf>.

PCS (n=7) - animais que não foram fotoenvelhecidos, PCFE (n=8) - animais que foram fotoenvelhecidos, PLBP (n=8) - animais que foram fotoenvelhecidos e tratados com a fração LBP, PLASER (n=8) - animais que foram fotoenvelhecidos e tratados com laser vermelho, PLBP+L (n=8) - animais que foram fotoenvelhecidos e tratados com a fração LBP e em seguida com laser vermelho e PL+LBP - animais que foram tratados com laser vermelho e em seguida com a fração LBP).

2.2 Indução do fotoenvelhecimento

Todos os grupos experimentais, exceto os subgrupos PCS, foram expostos a 100 mJ/cm² (1 dose mínima eritematosa = 100 mJ/cm²) sete vezes por semana, durante a primeira semana, por 16 minutos/sessão; e depois a 200 mJ/cm² três vezes por semana, durante 5 semanas, por 33 minutos/sessão, totalizando 6 semanas de fotoexposição, segundo protocolo de Hwang, Sun et al. 2013 e Hwang, Park et al. 2014.

2.3 Tratamentos

Os tratamentos isolados (PLBP e PLASER) e associados (PLBP+L e PL+LBP) foram realizados após a indução do fotoenvelhecimento (6 semanas), sendo iniciados na semana seguinte ao término do processo. Os animais foram tratados por três vezes durante a semana (seg/qua/sex), totalizando três semanas de tratamento (9 sessões).

A pele da região dorsal (3 cm x 2 cm) dos animais dos grupos PLBP, PLBP+L e, após a aplicação do laser vermelho, do grupo PL+LBP, foi tratada com 50 mg da formulação em gel de LBP a 5% a cada sessão de tratamento, na qual foi espalhada gentilmente com a ponta do dedo indicador, até sua completa absorção. Cada sessão de tratamento com laser vermelho foi realizada na mesma região e horário de aplicação nos grupos PL, PL+LBP e, após a aplicação da formulação em gel de LBP a 5%, no grupo PLBP+L, nos parâmetros apresentados na tabela 4.

TABELA 4: Parâmetros utilizados para o tratamento dos animais com fotobiomodulação. Equipamento de Laser – Photon Lase III (DMC, São Carlos/SP, Brasil). InGaAlP = Índio, Gálio, Alumínio e Fósforo.

<i>PARÂMETROS - LASER VERMELHO (InGaAlP)</i>	
Comprimento de onda	660 nm
Frequência	Contínuo
Potência	40 mW
Densidade de potência	1.42 W/cm ²
Área do feixe	0.028 cm ²
Densidade de energia	40 J/cm ²
Modo de aplicação	Contato direto
Tempo por ponto	28 segundos
Energia por ponto (6 pontos)	1.12 J

Dois dias após o término dos tratamentos, os animais foram eutanasiados e a pele do dorso de cada animal foi coletada e devidamente armazenada conforme protocolo exigido para cada análise a ser realizada.

2.4 Histologia

O processamento histológico, a técnica de hematoxilina-eosina (HE) e a análise estrutural e morfométrica (espessura do epitélio) foram realizados conforme descrito no item 2.11 do capítulo II.

2.5 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi realizada conforme descrito no item 2.13 do capítulo II. Os anticorpos primários e secundários usados nesta etapa e suas respectivas titulações estão descritos na tabela 5.

TABELA 5: Informações sobre os anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência e sua metodologia de incubação.

<i>Anticorpo</i>	<i>Código</i>	<i>Marca</i>	<i>Titulação</i>	<i>Incubação</i>
Anti-MMP1	Ab137332	Abcam	1:100	18 horas, geladeira (4°C)
Anti-MMP2	Ab37150	Abcam	1:100	18 horas, geladeira (4°C)
Anti-MMP9	Ab38898	Abcam	1:100	18 horas, geladeira (4°C)
Phospho-c-Fos	D82C12	Cell Signal	1:100	18 horas, geladeira (4°C)
Phospho-c-Jun	D47G9	Cell Signal	1:100	18 horas, geladeira (4°C)
Alexa Fluor 488	Ab150077	Abcam	1:500	1 hora, temperatura ambiente
Alexa Fluor 568	A11011	Life	1:500	1 hora, temperatura ambiente

As imagens para a quantificação dos marcadores por imunofluorescência foram capturadas através de um Microscópio de fluorescência (BX61, Olympus) e do *software* Cellsens Dimension[®]. A exposição de luz na captura das imagens foi padronizada e as quantificações foram realizadas em campos não coincidentes e escolhidos aleatoriamente, sendo três campos por secção para as metaloproteinases e seis para os fatores nucleares, usando o *software* Image J[®].

2.6 Imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica foi utilizado um kit de detecção (*Novo Link Polymer* RE7280-K, Leica) para quantificação da expressão de colágeno I, III e FGF2. As instruções do fabricante foram seguidas. Assim, os cortes contidos nas lâminas foram desparafinizados, hidratados e lavados em água corrente. Em seguida, a recuperação antigênica foi realizada através da incubação das lâminas em tampão citrato (pH 6.0), com o auxílio de uma panela a vapor por 40 min. Após isso, as lâminas foram resfriadas e lavadas três vezes em água ultrapura.

As soluções do kit foram utilizadas para todas as etapas seguintes. A peroxidase endógena foi neutralizada com a solução *Peroxidase Block* (5 min) e as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS (5 min/vez). As secções foram incubadas com a solução *Protein Block* (5 min) e em seguida lavadas duas vezes em TBS (5 min/vez). Os anticorpos primários foram diluídos em 0,5% BSA (PBS) e incubados em câmara úmida, conforme informações na tabela 6.

TABELA 6: Informações sobre os anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica e sua metodologia de incubação.

<i>Anticorpo</i>	<i>Código</i>	<i>Marca</i>	<i>Titulação</i>	<i>Incubação</i>
Anti-Collagen I	Ab34710	Abcam	1:100	1 hora, temperatura ambiente
Anti-Collagen III	Ab7778	Abcam	1:100	1 hora, temperatura ambiente
Anti-FGF2	Ab8880	Abcam	1:200	1 hora, temperatura ambiente

Após a incubação dos anticorpos primários as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS (5 min/vez) e incubadas com a solução *Post Primary* (30 min). Novamente, lâminas foram lavadas duas vezes em TBS (5 min/vez) e então incubadas com a solução *NovoLink TM Polymer* (30 min). Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS (5 min/vez), sob leve agitação e coradas com solução *DAB* (5 min). Logo após as lâminas foram enxaguadas em água, contra coradas com hematoxilina (5 min) e novamente enxaguadas em água durante 5 min. Por último, os cortes foram desidratados e as lâminas foram montadas com lamínulas e meio de montagem. Para o controle negativo os anticorpos primários foram omitidos.

As imagens para a quantificação das imunomarcações de colágeno I, III e FGF2 foram capturadas através de um microscópio de luz (BX61, Olympus) e do *software* CellSens Dimension[®]. A quantificação foi realizada em cinco campos não coincidentes, escolhidos aleatoriamente, usando o *software* Image J[®], segundo protocolo de (Mata, Tefe-Silva et al. 2015).

2.7 Análise estatística

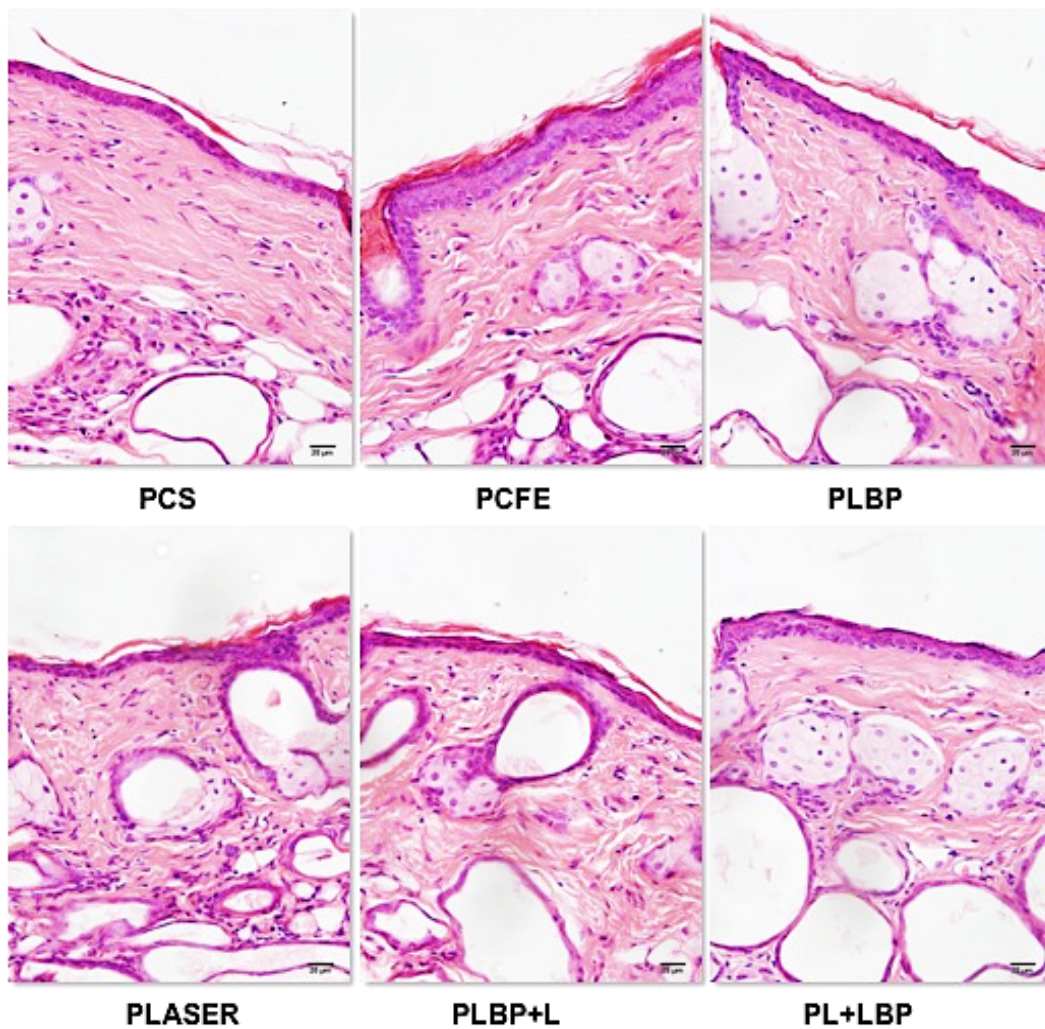
Todas as variáveis tiveram a sua distribuição verificada através do teste de normalidade de D'Agostine Peason. Os valores foram inseridos em planilhas e analisados por One-way (ANOVA) e pós-teste de Tukey (dados paramétricos) e Kruskall-Wallis com pós-teste de Dunn (dados não-paramétricos) para comparação entre grupos usando o *software* Graph Pad Prism[®] 7.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1 Análise histológica

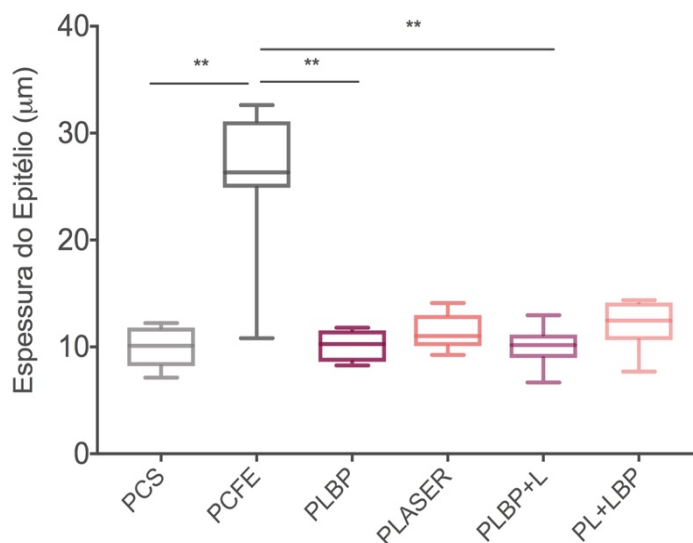
Amostras de pele dos animais foram coletadas e submetidas a processamento histológico. A análise estrutural da coloração com hematoxilina-eosina por microscopia óptica das secções representativas de pele da região dorsal dos camundongos *hairless* demonstrou alterações histológicas na epiderme e derme do grupo controle fotoenvelhecido que não recebeu tratamento. Um aumento na fragmentação e desorganização das fibras na região da derme e o espessamento da epiderme foram observados no grupo PCFE quando comparado aos grupos tratados após a indução do fotoenvelhecimento e ao grupo PCS. O grupo PLBP apresentou as fibras de colágeno mais curtas e levemente desorganizadas na derme reticular. No grupo PLASER observou-se uma maior quantidade de células na derme papilar, um espessamento e aumento da densidade das fibras colágenas na derme reticular, com maior presença de fibras maduras. O grupo PLBP+L, no qual os tratamentos foram associados e a fração de LBP foi aplicada antes do laser vermelho, apresentou características do grupo PLBP e as fibras de colágeno se apresentaram levemente fragmentadas e desorganizadas, diferentemente do grupo PL+LBP que apresentou um aumento no tamanho e densidade das fibras, com feixes paralelos à epiderme (FIGURA 35). Na análise quantitativa da espessura da epiderme os resultados indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre o controle fotoenvelhecido (PCFE) e os grupos PLBP e PLBP + L, sugerindo um efeito benéfico na recuperação deste tipo de fotodano induzido pela radiação ultravioleta, tanto na aplicação da fração de LBP isolada, quanto na associação com o laser vermelho aplicado após a fração de LBP (FIGURA 36). Os grupos PLASER e PL+LBP também apresentaram resultados promissores na recuperação da espessura do epitélio, mas não significativos. De maneira geral, os tratamentos realizados após a indução do fotoenvelhecimento parecem promover efeitos positivos na recuperação do fotodano gerado pela RUV.

FIGURA 35: Fotomicrografias para análise estrutural (HE) da pele fotoenvelhecida de camundongos *hairless* dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP.



Os tratamentos foram realizados após a indução do fotoenvelhecimento. Coloração de hematoxilina-eosina (HE). Bar = 20 µm.

FIGURA 36: Espessura da epiderme após os tratamentos realizados na pele fotodanificada.



Os animais foram fotoenvelhecidos e tratados após este processo com a fração LBP (PLBP) e o laser vermelho (PLASER); ambos isolados e associados (PLBP+L e PL+LBP). Os valores estão representados como médias \pm DPs. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre o controle fotoenvelhecido (PCFE) e os grupos PLBP, PLBP+L e PCS. Os dados apresentaram distribuição não normal e, portanto, foram analisados por Kuskal- Wallis e pós-teste de Dunn para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

3.2 Imunofluorescência das p (c-Fos) e p (c-Jun)

A análise quantitativa da expressão dos fatores nucleares p (c-Fos) e p (c-Jun), através da técnica de imunofluorescência, demonstrou que a indução do fotoenvelhecimento promoveu um aumento significativo ($p < 0,001$) da expressão dos dois fatores nucleares na pele dos camundongos *hairless* que não receberam tratamento (PCFE) com relação ao grupo de animais que não foram fotoenvelhecidos e não receberam nenhum tratamento (PCS). Todos os tratamentos realizados após a indução do fotoenvelhecimento foram capazes de diminuir significativamente ($p < 0,001$) a expressão desses fatores quando comparados com o grupo PCFE (FIGURAS 37-39). Os achados revelam que os tratamentos realizados tanto isolados quanto associados promovem uma biomodulação da expressão dos fatores nucleares p (c-Fos) e p (c-Jun), levando os níveis de expressão a valores próximos da normalidade (PCS).

FIGURA 37: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise da expressão dos níveis de p (c-Fos) (marcado em verde) nas amostras de pele dos camundongos *hairless* dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 μ m.

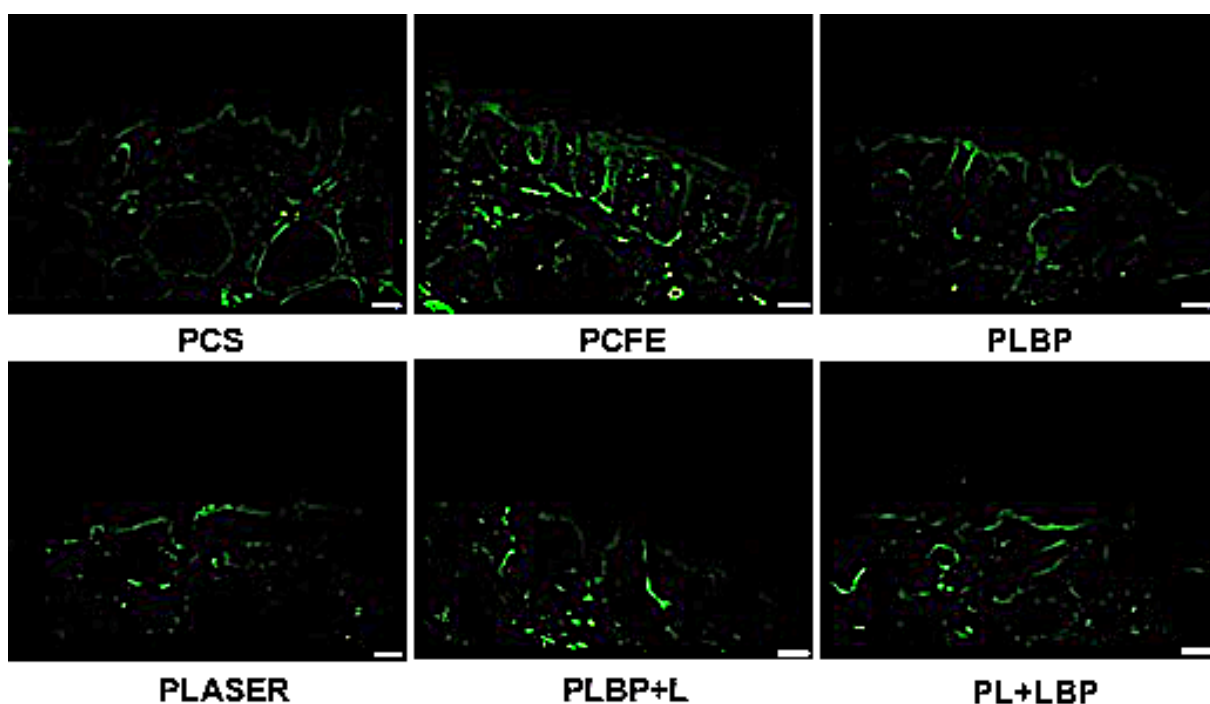


FIGURA 38: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise da expressão dos níveis de p (c-Jun) (marcado em verde) nas amostras de pele dos camundongos *hairless* dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 μ m.

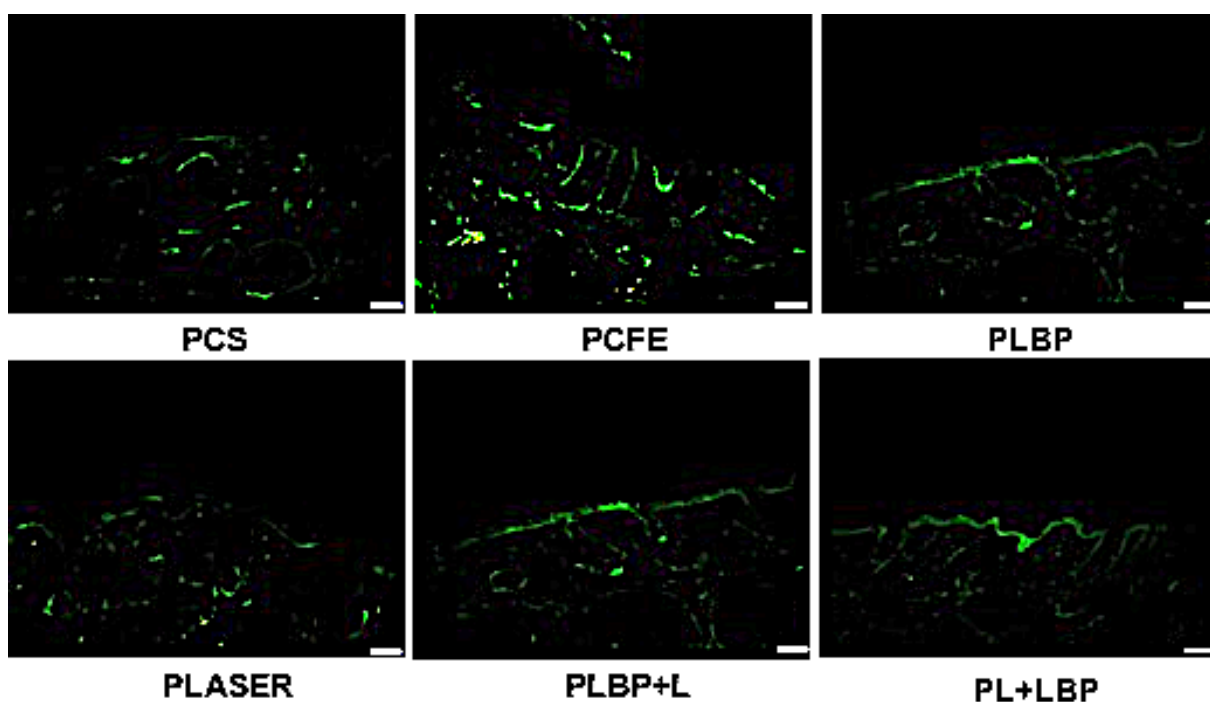
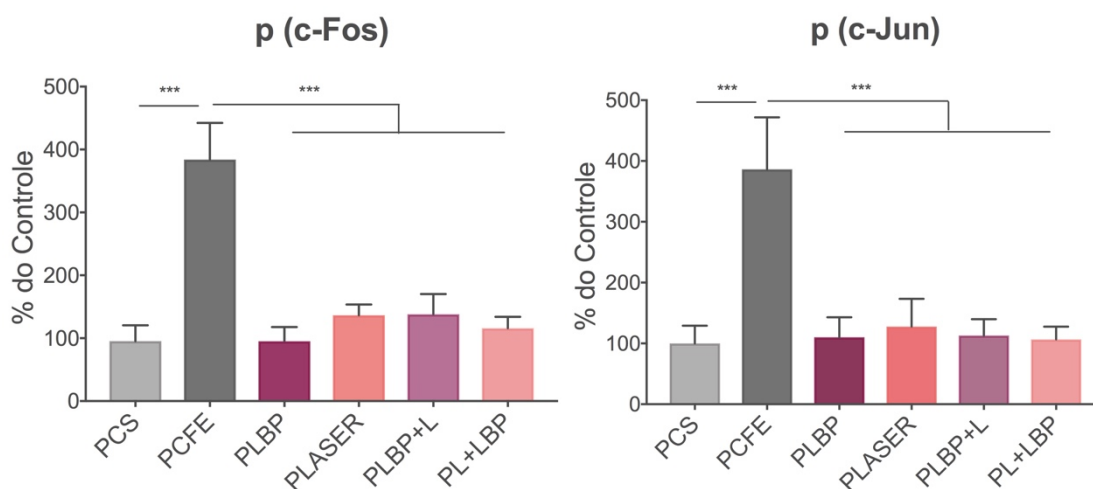


FIGURA 39: Análise quantitativa dos níveis de expressão do fator nuclear p (c-Fos) e p (c- Jun) após a indução do fotoenvelhecimento e aplicação dos tratamentos.



Os valores estão representados como médias \pm DPs. *** indica diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos de animais que foram fotoenvelhecidos (PCFE) e o grupo de animais não foram fotoenvelhecidos (PCS) e entre o grupo PCFE e grupos PLBP, PLASER, PLBP+L e PL+LBP. Os resultados foram analisados por One-way (ANOVA) e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

3.3 Imunofluorescência das enzimas MMP-1, 2 e 9

A análise de imunofluorescência demonstrou que os níveis de MMP-1 aumentaram após a indução do fotoenvelhecimento, apresentando diferença significativa ($p < 0,01$) quando se comparou os grupos controles PCS e PCFE. Todos os tratamentos realizados após o fotoenvelhecimento foram capazes de diminuir os níveis da enzima MMP-1 na pele dos camundongos *hairless*. O grupo PLBP apresentou níveis significativamente reduzidos de MMP-1 ($p < 0,01$), comparado com o grupo PCFE, da mesma forma que os grupos PLASER, PLBP+L e PL+LBP ($p < 0,05$) (FIGURAS 40 e 41).

FIGURA 40: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise dos níveis de expressão da enzima MMP-1 (marcado em rosa) nas amostras de pele dos camundongos *hairless* dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 μ m.

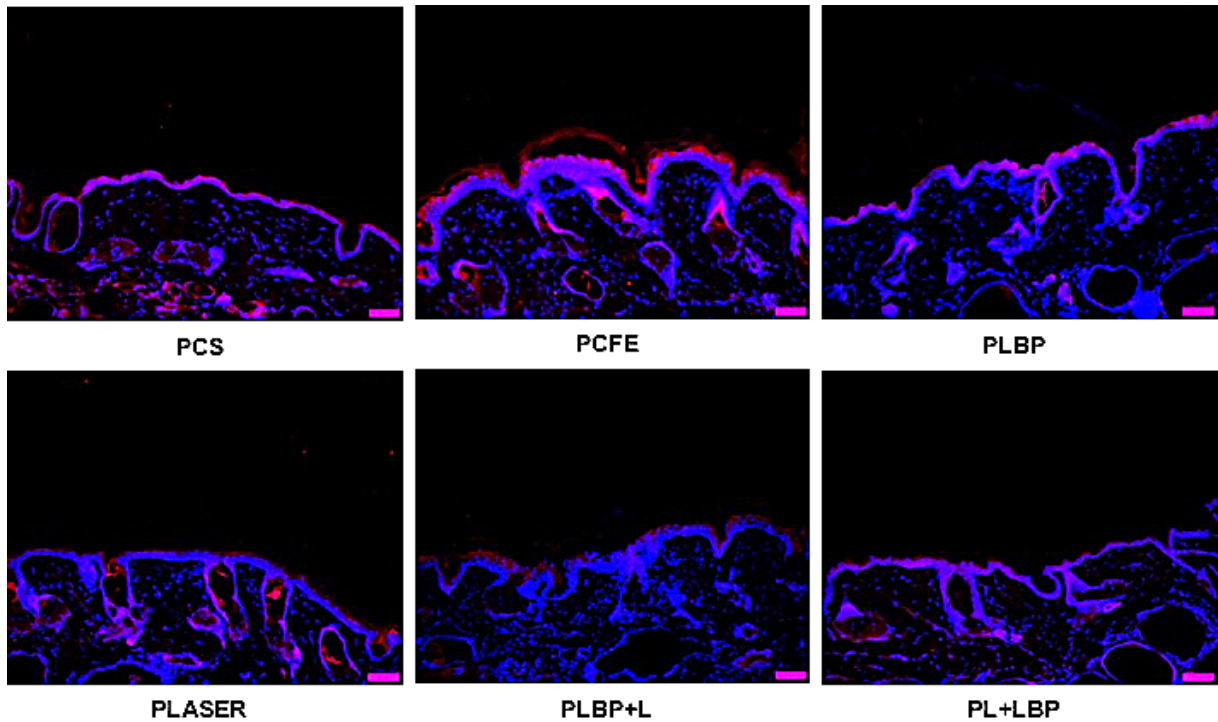
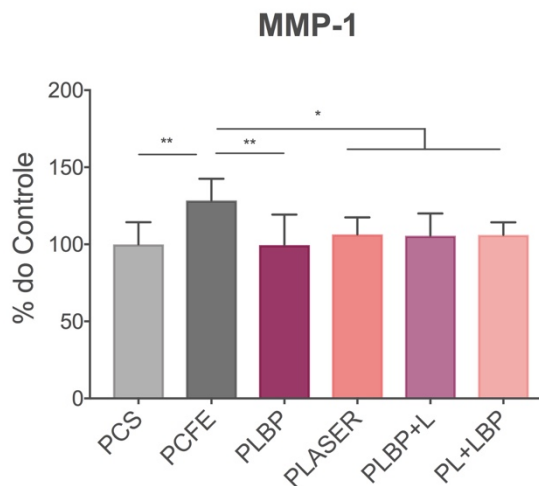


FIGURA 41: Análise quantitativa dos níveis de expressão da enzima MMP-1 após a indução do fotoenvelhecimento e aplicação dos tratamentos.



Os valores estão representados como médias \pm DPs. * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$) indicam diferenças significativas entre os grupos de animais que foram fotoenvelhecidos (PCFE) e o grupo de animais não foram fotoenvelhecidos (PCS) e entre o grupo PCFE e os grupos PLBP, PLASER, PLBP+L e PL+LBP. Os resultados foram analisados por One-way (ANOVA) e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

Os níveis da expressão de MMP-2 também se apresentaram significativamente reduzidos (FIGURA 42 e 43) após os tratamentos aplicados tanto isolados quanto associados, com uma maior diferença entre os grupos PL+LBP e PCFE ($p < 0,0001$). Os achados demonstram que todos os tratamentos promoveram resultados efetivos no controle do aumento da expressão da enzima MMP-2, característica essa, encontrada no processo de fotoenvelhecimento. Os achados da análise de expressão dos níveis da enzima MMP-9 por imunofluorescência revelaram diferença significativa entre os grupos controles PCS e PCFE ($p < 0,0001$) e entre os grupos PCFE e PLBP, PLASER, PLBP+L e PL+LBP ($P < 0,0001$), conforme demonstram as figuras 44 e 45. Essas diferenças se mostraram relevantes, uma vez que a diminuição significativa dos níveis de expressão dessa enzima, após a indução do processo de fotoenvelhecimento, pode promover uma menor degradação das fibras de colágeno da matriz extracelular.

FIGURA 42: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise dos níveis de expressão da enzima MMP-2 (marcado em amarelo) nas amostras de pele dos camundongos *hairless* dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 μ m.

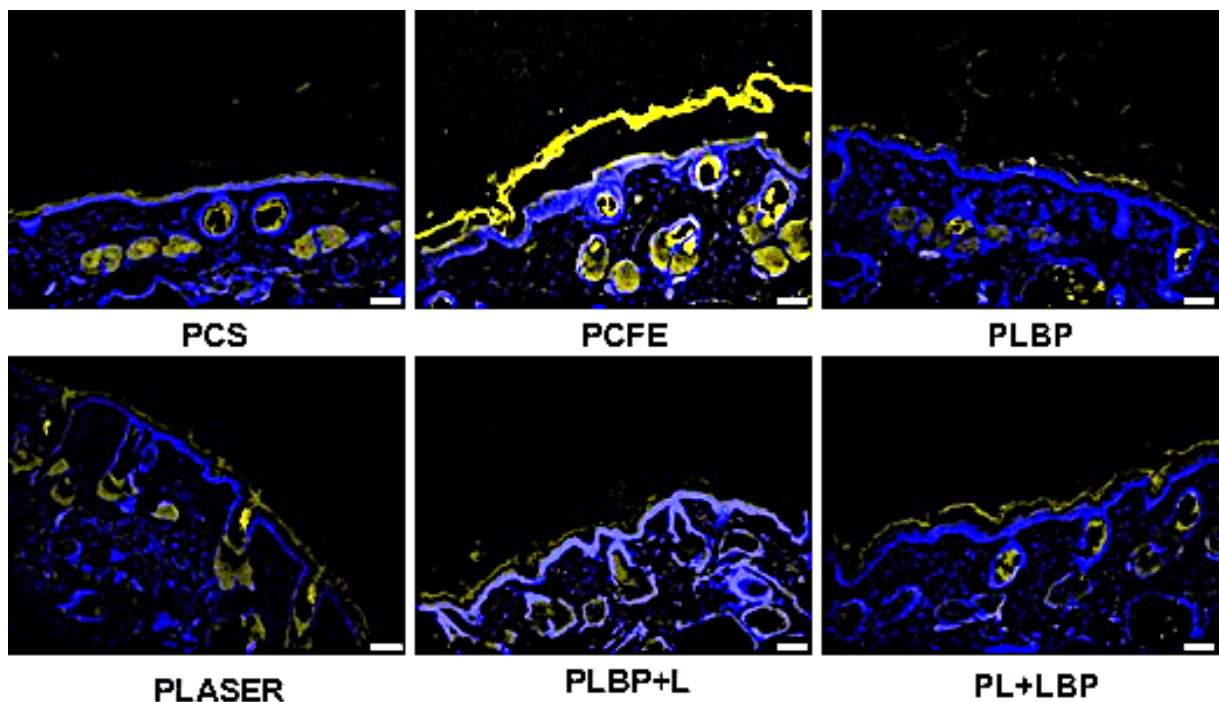
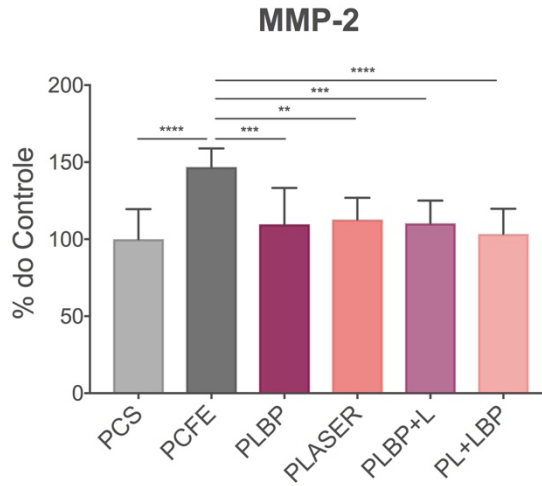


FIGURA 43: Análise quantitativa dos níveis de expressão da enzima MMP-2 após a indução do fotoenvelhecimento e aplicação dos tratamentos.



ph Os valores estão representados como médias \pm DPs. ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$) indicam diferenças significativas entre os grupos de animais que foram fotoenvelhecidos (PCFE) e o grupo de animais não foram fotoenvelhecidos (PCS) e entre o grupo PCFE e os grupos PLBP, PLASER, PLBP+L e PL+LBP. Os resultados foram analisados por One-way (ANOVA) e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Gra Pad Prism® 7.0.

FIGURA 44: Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência para análise dos níveis de expressão da enzima MMP-9 (marcado em verde) nas amostras de pele dos camundongos *hairless* dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 μ m.

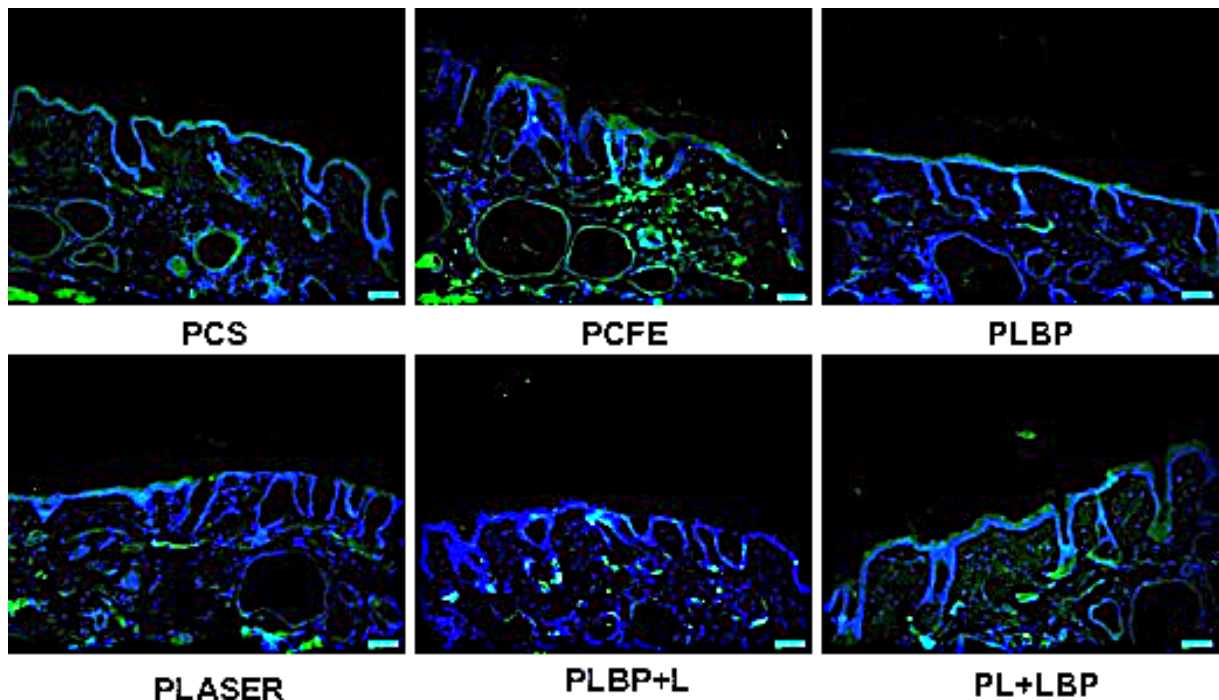
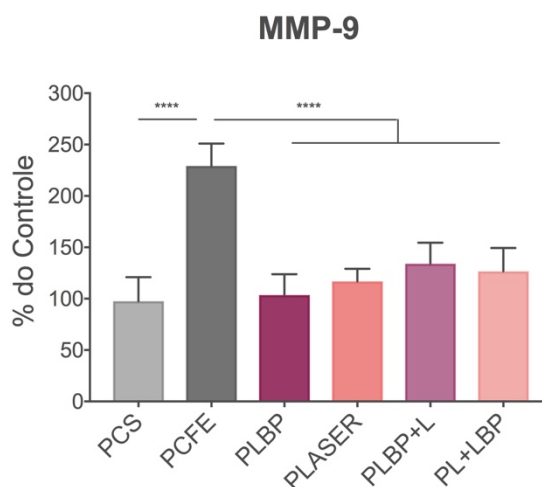


FIGURA 45: Análise quantitativa dos níveis de expressão da enzima MMP-9 após a indução do fotoenvelhecimento e aplicação dos tratamentos.



Análise quantitativa dos níveis de expressão da enzima MMP-9 após a indução do fotoenvelhecimento e aplicação dos tratamentos. Os valores estão representados como médias \pm DPs. **** ($p < 0,0001$) indica diferença significativa entre os grupos de animais que foram fotoenvelhecidos (PCFE) e o grupo de animais não foram fotoenvelhecidos (PCS) e entre o grupo PCFE e os grupos PLBP, PLASER, PLBP+L e PL+LBP. Os resultados foram analisados por One-way (ANOVA) e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

3.4 Imunohistoquímica do Colágeno I, III e FGF2

A expressão das proteínas estruturais mais abundantes da matriz extracelular, os colágenos I e III, foi encontrada reduzida após a indução do fotoenvelhecimento. O colágeno I apresentou valor de $p < 0,01$ e o colágeno III com valor de $p < 0,05$ na comparação realizada entre os grupos controles (PCS e PCFE). O grupo de animais tratado com a fração de LBP isoladamente (PLBP) apresentou valores similares as grupo de animais que foram fotoenvelhecidos e não foram tratados (PCFE) demonstrando que a fração LBP isolada não promove uma biomodulação da expressão desses dois tipos de colágeno. O grupo de animais que recebeu tratamento isolado com laser vermelho apresentou uma quantidade significativamente menor de expressão dos colágenos I ($p < 0,05$) e III ($p < 0,01$) quando comparados com o grupo PCFE, revelando que a fotobiomodulação promoveu um aumento na degradação desses dois tipos de colágeno. O grupo PLBP+L manteve seus níveis de expressão

dos colágenos I e III similares aos do grupo PCFE, não apresentando diferença significativa. Diferentemente do grupo PL+LBP, no qual os tratamentos foram realizados de maneira inversa. A aplicação do laser vermelho antes da fração LBP promoveu um aumento da expressão de colágeno I ($p<0,05$) e III ($p<0,01$) quando comparados com o grupo PCFE. Esses achados sugerem que um possível sinergismo pode ter ocorrido nessa ordem de aplicação, onde a fotobiomodulação pode ter potencializado os efeitos protetores e antioxidantes da fração LBP e/ou aumentado o potencial de permeação da fração, aplicada após a irradiação do laser (FIGURA 46 – 48).

A expressão de FGF2 foi significativamente menor no grupo PCFE quando comparado com o grupo PCS ($p<0,05$). Os tratamentos realizados promoveram diferentes respostas. O grupo PLBP apresentou um aumento na expressão de FGF2 de 10,8%, mas sem diferença significativa em relação ao grupo PCFE. O grupo PLASER apresentou valores similares ao grupo PCFE, não apresentando efeito sobre a expressão deste fator de crescimento. Os grupos tratados associadamente promoveram uma biomodulação da expressão de FGF2. Os níveis se encontraram significativamente aumentados nos grupos PLBP+L ($p<0,05$) e PL+PLBP ($p<0,0001$) quando foram comparados ao grupo de animais fotoenvelhecidos que não receberam tratamento (PCFE). Novamente, a associação de tratamentos do grupo PL+LBP se apresentou efetiva na recuperação do fotodano induzido pela radiação ultravioleta (FIGURAS 46 e 49).

FIGURA 46: Fotomicrografias da técnica de imunohistoquímica para análise dos níveis de expressão de Colágeno I (COL I), III (COL III) e FGF2 (marcados em marrom) em amostras de pele dos camundongos *hairless* dos grupos experimentais PCS, PCFE, PLBP, PLBP+L e PL+LBP. Bar = 20 μ m.

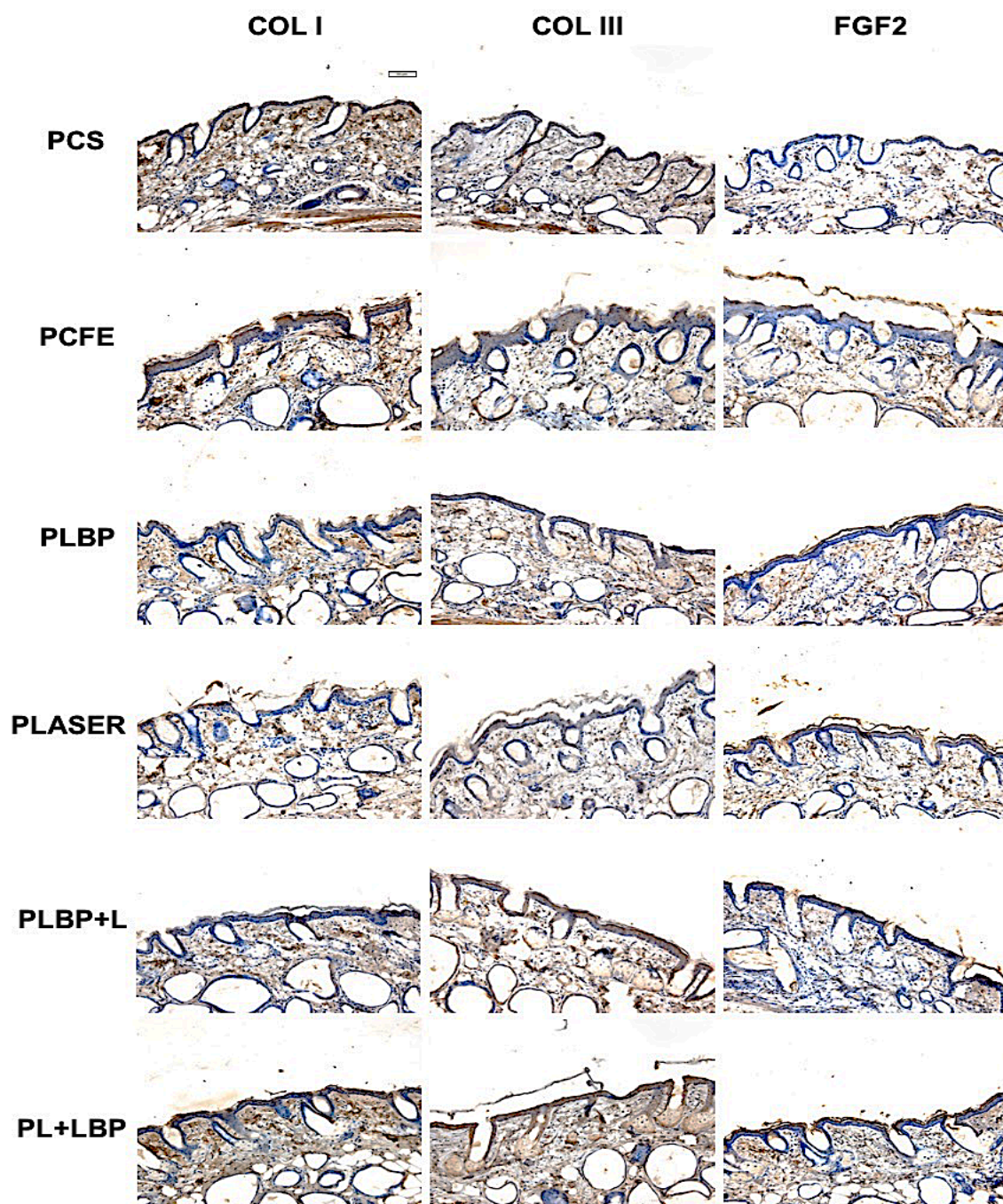
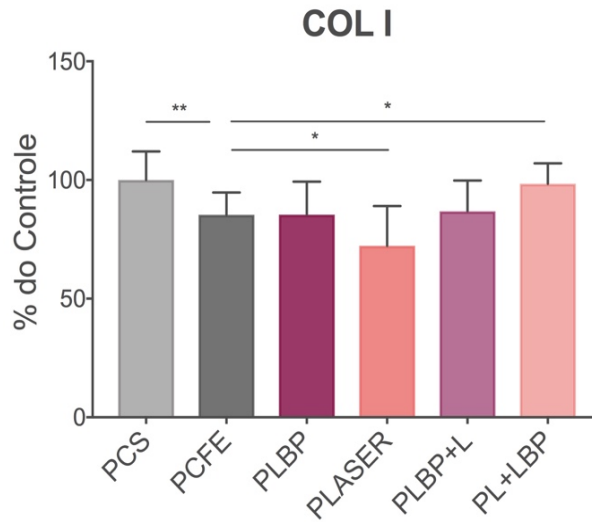
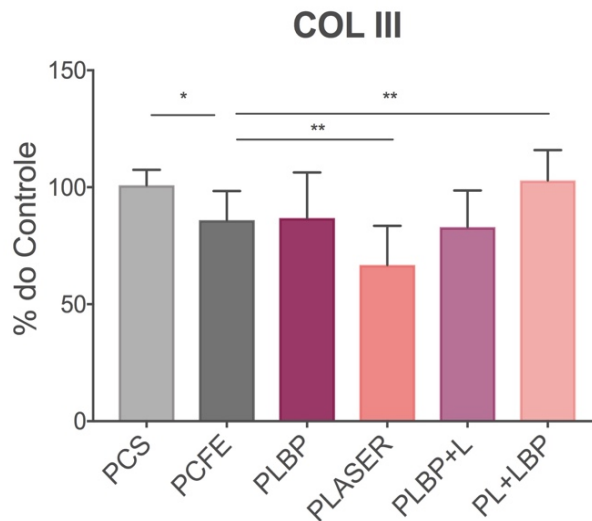


FIGURA 47: Análise quantitativa dos níveis de expressão de colágeno I (COL I), após a indução do fotoenvelhecimento e subsequente aplicação dos tratamentos.



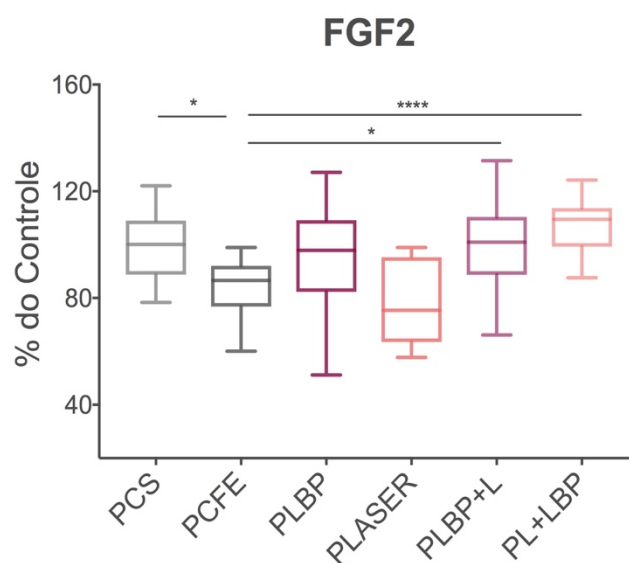
Os valores estão representados como médias \pm DPs. * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$) indicam diferenças significativas entre os grupos de animais que foram fotoenvelhecidos (PCFE) e o grupo de animais não foram fotoenvelhecidos (PCS) e entre o grupo PCFE e os grupos PLASER e PL+LBP. Os resultados foram analisados por One-way (ANOVA) e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

FIGURA 48: Análise quantitativa dos níveis de expressão de colágeno III (COL III), após a indução do fotoenvelhecimento e subsequente aplicação dos tratamentos.



Os valores estão representados como médias \pm DPs. * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$) indicam diferenças significativas entre os grupos de animais que foram fotoenvelhecidos (PCFE) e o grupo de animais não foram fotoenvelhecidos (PCS) e entre o grupo PCFE e os grupos PLASER e PL+LBP. Os resultados foram analisados por One-way (ANOVA) e pós-teste de Tukey para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

FIGURA 49: Análise quantitativa dos níveis de expressão de FGF2, após a indução do fotoenvelhecimento e subsequente aplicação dos tratamentos.



Os valores estão representados como médias \pm DPs. * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$) indicam diferenças significativas entre os grupos de animais que foram fotoenvelhecidos (PCFE) e o grupo de animais não foram fotoenvelhecidos (PCS) e entre o grupo PCFE e os grupos PLBP+L e PL+LBP. Os dados apresentaram distribuição não normal e, portanto, foram analisados por Kuskal-Wallis e pós-teste de Dunn para comparação entre grupos, usando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou a aplicação isolada e associada de dois métodos de tratamento da pele fotodanificada pela radiação ultravioleta, a fitoterapia e a fotobiomodulação. A fração de polissacarídeos (LBP) e o laser vermelho promoveram uma expressiva redução na espessura da epiderme após todos os tratamentos aplicados de modo isolado e associado, com diferença significativa entre os grupos PLBP e PLBP+L e o grupo PCFE, apresentando medidas da espessura da epiderme dos animais pertencentes a esses grupos próximas ao grupo de animais que não foram fotoenvelhecidos (PCS). A similaridade da resposta aos dois tratamentos se dá devido ao uso da fração LBP isolada e a aplicação da mesma seguida da fotobiomodulação, na qual o sinergismo da associação parece ter sido benéfico.

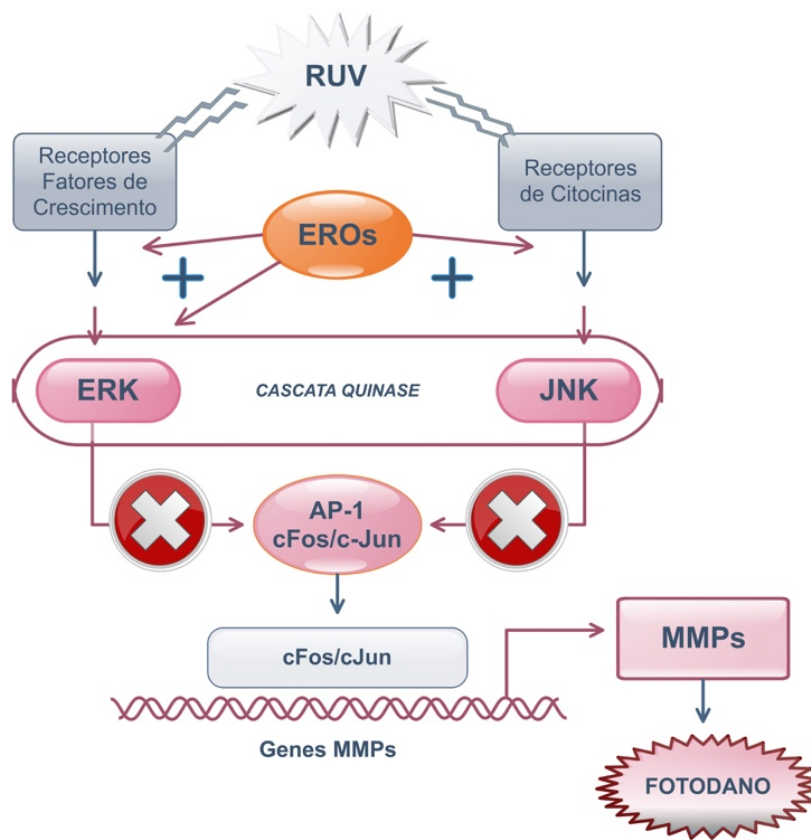
Uma variedade de novos métodos para o tratamento do fotoenvelhecimento foi recentemente introduzida. Um crescente interesse em comparar a eficácia relativa de múltiplos métodos para o tratamento do fotoenvelhecimento tem ocorrido (Lee, Park *et al.* 2008). A pesquisa vem continuamente demonstrando que vários fitofármacos oferecem proteção significativa contra diferentes patologias e o envelhecimento da pele. O tratamento primário do fotoenvelhecimento é a fotoproteção, sendo o secundário o tratamento que pode ser alcançado com o uso de antioxidantes e alguns compostos novos como polifenóis (Pandel, Poljsak *et al.* 2013) e também o uso de fotobiomodulação. (Ye, Wang *et al.* 2012) testaram três dosagens diferentes (0,6; 1,5 e 2,5 J/cm²) de laser infravermelho (1064 nm) na pele dorsal de ratos Sprague-Dawley e observaram um aumento na quantidade de colágeno, bem como a regulação positiva da expressão gênica de colágenos tipo I e III, TIMP-1 e 2, e uma diminuição significativa na expressão das enzimas MMP-2 e 3, concluindo que a irradiação com laser infravermelho poderia aumentar significativamente a produção de colágeno e evitar a degradação das fibras.

Antioxidantes exógenos têm sido investigados quanto aos seus efeitos e achados que corroboram com os nossos resultados revelaram que a espessura epidérmica, que mostrou maiores valores em camundongos *hairless* irradiados, foi revertida após tratamento com uma formulação contendo peptídeos e outra com uma combinação de ácido ascórbico, α -tocoferol e ácido ferúlico (Bhattacharyya, Pathria *et al.* 2014). Alguns autores estudaram o mecanismo antirrugas da melatonina em queratinócitos HaCaT e em camundongos *hairless*, ambos tratados com UVB. A melatonina suprimiu a expressão de proteínas inflamatórias tais como COX-2, ERK e MMP-1 em queratinócitos tratados com UVB e protegeu a pele de camundongos *hairless* irradiados com RUVB por 8 semanas, da formação de rugas através da inibição de EROs e da perda de água transdermal. Notavelmente, a melatonina protegeu a pele dos camundongos contra o aumento da espessura da epiderme e a degradação do colágeno dérmico (Park, Lee *et al.* 2018).

As radiações ultravioletas dos tipos A e B induzem ativação de uma ampla gama de fatores de transcrição em células da pele, incluindo a proteína ativadora de fator-1 (AP-1) (Halliwell e Gutteridge 2015). A proteína AP-1 é um termo coletivo que se refere a fatores de transcrição diméricos, compostos de subunidades c-Jun, c-Fos ou ATF (fator ativador de transcrição) que se ligam a um sítio de DNA comum, o sítio de ligação AP-1 (Karin, Liu *et al.* 1997). A RUV gera um fotodano na pele como resultado da indução da expressão genes que codificam para metaloproteinases de matriz, as quais podem degradar o colágeno e outros componentes do tecido conjuntivo. Tal indução é regulada por AP-1 (Fisher, Wang *et al.* 1997), conforme demonstrado na figura 50. Em nossos achados a expressão das subunidades c-Fos e c-Jun, que compõem o fator de transcrição AP-1, foi suprimida significativamente após aplicação dos tratamentos isolados e associados. Os níveis de expressão se aproximaram dos níveis encontrados no grupo de animais que não foram fotoenvelhecidos (PCS), produzindo consequentemente o mesmo efeito sobre os níveis de expressão das enzimas MMP-1, 2 e 9 em

todos os tratamentos realizados. Esses resultados revelam que os tratamentos, tanto isolados quanto associados com a fração LBP e a fotobiomodulação, poderiam estar interferindo na via que gera o fotodano (FIGURA 50), evidenciando efeitos positivos na recuperação da integridade da pele fotodanificada de camundongos *hairless*, uma vez que o grupo PCFE aumentou significativamente os níveis de expressão após o fotodano induzido.

FIGURA 50: Esquema de indução do fotodano gerado pela radiação ultravioleta (RUV).



Fonte: Figura adaptada de Kang, Chung et al. 2003.

Os sinais circulares em vermelho e cinza indicam os prováveis pontos de atuação dos tratamentos na interrupção da via que gera o fotodano.

Um estudo sobre a expressão das MMPs na epiderme da pele de camundongos *hairless*, após um longo período de irradiação UV demonstrou que os níveis de MMP-2 e 9, também foram encontrados significativamente maiores na pele de camundongos submetidos à irradiação UVB do que na pele de camundongos não expostos (Inomata, Matsunaga *et al.* 2003),

corroborando com os nossos achados. Estudos *in vitro* demonstraram que a expressão das metaloproteinases de matriz 2 e 9 foi significativamente reduzida quando células de linhagem tumoral BIU87 foram tratadas com diferentes concentrações da fração LBP, os autores correlacionaram positivamente a redução da expressão com um efeito dose-dependente (Zhang, Yu *et al.* 2017). Outros autores investigaram o efeito protetor do extrato etanólico de *Eucalyptus globulus* a 50%, sobre o fotoenvelhecimento induzido por RUV *in vitro* e *in vivo*. Fibroblastos dérmicos humanos normais foram tratados com *Eucalyptus globulus* após irradiação com RUVB. Os achados *in vitro* revelaram uma supressão na expressão de MMPs e IL-6, um aumento na expressão de TGF- β 1 e procolágeno tipo 1 e ainda a inibição da ativação do fator de transcrição AP-1, um indutor de MMPs. Por fim, estudos *in vivo* mostraram que a aplicação tópica de *Eucalyptus globulus* regulou negativamente a expressão de MMP-1 e regulou positivamente a expressão de elastina, TGF- β 1 e procolágeno tipo 1 (Park, Hwang *et al.* 2018).

Além dos efeitos benéficos dos fitofármacos no tratamento do dano gerado pela RUV, a fotobiomodulação também tem sido amplamente usada com este propósito. Em um estudo *in vitro*, relatou-se que um aumento da secreção de procolágeno por fibroblastos, promoveu uma redução da expressão de metaloproteinases de matriz após tratamentos com fototerapia usando LED (660 nm) (Barolet, Roberge *et al.* 2009). Outro estudo demonstrou que o laser modulou a expressão gênica e a atividade de metaloproteinases de matriz em células de músculo liso aórtico suíno (Gavish, Perez *et al.* 2006). Esses achados podem justificar a redução significativa dos níveis de expressão das enzimas MMP-1, 2 e 9 nos grupos de animais fotoenvelhecidos e tratados com fotobiomodulação. (Migliario, Rizzi *et al.* 2013), observaram uma diminuição da expressão de MMP-9 em queratinócitos normais tratados com laser vermelho (635 nm). Devido as MMPs desempenharem um papel importante na degradação da matriz extracelular (MEC) e na remodelação de tecidos, é possível considerar a fotobiomodulação produzida pelo laser vermelho em nossos achados como uma nova medida

terapêutica para restaurar significativamente o equilíbrio entre a MEC e as enzimas de degradação.

As MMPs são responsáveis pela degradação das proteínas da MEC, como colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicanos, contribuindo para o fotoenvelhecimento (Quan, Qin *et al.* 2009, Kim, Lee *et al.* 2011). A análise das imunomarcações de colágeno I e III demonstrou que os tratamentos realizados nos grupos PLBP e PLBP+L não produziram efeito sobre a expressão dessas fibras estruturais. Diferentemente do grupo PL+LBP, no qual a expressão de colágeno I e III aumentou significativamente quando comparado com o grupo PCFE. Atribuímos esse aumento de expressão a um provável sinergismo ocorrido na ordem de aplicação dos tratamentos. É conhecido que a fotobiomodulação promove angiogênese e aumenta a síntese de colágeno, promovendo o reparo de feridas agudas (Hopkins, McLoda *et al.* 2004) e crônicas (Yu, Naim *et al.* 1997). O laser vermelho aplicado antes da fração LBP pode ter produzido, além dos seus efeitos supracitados, um sinergismo com o potencial antioxidante da fração LBP, uma vez que (Li, Li *et al.* 2017) propuseram seu potencial uso para cuidados da pele, contra danos oxidativos gerados por insultos ambientais. O grupo de animais que recebeu tratamento com a fotobiomodulação isolada (PLASER) apresentou uma redução significativa da expressão de colágeno I e III. A diminuição da espessura do epitélio apresentada neste grupo pode ter influenciado no processo de síntese e degradação desses dois tipos de colágeno. O efeito inibitório da neocolagênese também foi observado em um estudo com camundongos *hairless* fotoenvelhecidos que foram tratados com retinóides (tretinoína e adapaleno) e lasers (585 nm e CO₂) isolados e associados, onde os lasers de 585 nm e o CO₂ aplicados de maneira isolada não induziram neocolagênese. Além disso, nenhum efeito sinérgico foi observado com os tratamentos combinados, a zona de reparação observada foi principalmente atribuída ao adapaleno (Lee, Park *et al.* 2008). Um modelo de reparo de lesões demonstrou que a fotobiomodulação proporcionou aceleração da cicatrização de feridas

cutâneas em ratos com uma dose/resposta bifásica, favorecendo doses mais baixas (Corazza, Jorge *et al.* 2007). A hipótese que levantamos para os níveis de expressão de colágeno I e III terem sido menores do que o PCFE, foi de que a dose aplicada do laser possa ter promovido um efeito inibitório que culminou em uma resposta bifásica neste grupo experimental (Huang, Sharma *et al.* 2011). O mesmo ocorreu com a expressão do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) no grupo PLASER, uma vez que os níveis de expressão se apresentaram abaixo do grupo PCFE.

Em nossos achados somente os tratamentos realizados em associação, em ambas as ordens de aplicação, promoveram um aumento significativo na expressão de FGF2, um fator de crescimento que estimula a proliferação e migração de fibroblastos e queratinócitos, atraindo células inflamatórias e circundantes para a da região em reparo, induzindo várias citocinas (Huang, Kong *et al.* 2017). O aumento deste fator de crescimento sugere um efeito sinérgico produzido pela associação dos tratamentos sobre a expressão desta proteína, uma vez que os tratamentos isolados não promoveram o mesmo efeito. Provavelmente, um estímulo a migração e proliferação das células mais abundantes na pele, como fibroblastos e queratinócitos pode ter ocorrido, aumentando assim a capacidade de reparo e reorganização da matriz extracelular do tecido fotodanificado. Um estudo que corrobora com os nossos achados investigou os efeitos da fotobiomodulação na cicatrização de feridas cutâneas em um modelo animal de diabetes tipo II e concluiu que o laser vermelho melhorou significativamente as características histológicas e o fechamento de feridas no grupo diabético em comparação com o grupo diabético não irradiado. A análise quantitativa da expressão de FGF2 revelou um aumento de três vezes nos animais diabéticos e não-diabéticos após fotobiomodulação (Byrnes, Barna *et al.* 2004). Os efeitos protetores da antioxidina-RL, um peptídeo antioxidante purificado das secreções da rã *Odorrana lívida* na resposta induzida por UVB foram examinados *in vitro* e *in vivo*. Nos estudos *in vitro*, células HaCaT e HSF tratadas com antioxidina-RL produziram uma

regulação positiva na expressão de FGF, procolágeno tipo I e TGF- β 1. Já nos estudos *in vivo*, a antioxidina-RL preveniu eficazmente o eritema induzido por UVB na pele de camundongos, inibindo assim o espessamento e a inflamação da pele induzidos por UVB e aumentando a deposição de colágeno (Qin, Lee *et al.* 2018). Esses estudos demonstram que a aplicação de fotobiomodulação e compostos antioxidantes tem efeito reparador da pele danificada, e que em nosso estudo, a associação dos tratamentos potencializou os efeitos benéficos de ambos, produzindo um efeito sinérgico.

Baseados nos achados que corroboram com os nossos resultados, é possível concluir que tanto a associação quanto a forma de aplicação dos tratamentos produziram diferentes efeitos biomodulatórios utilizando o modelo de indução do fotoenvelhecimento em pele de camundongos *hairless*. Estudos futuros se fazem necessários, testando diferentes concentrações da fração LBP, variando também os parâmetros da fotobiomodulação, elucidando os mecanismos que produzem uma resposta bifásica, a fim de buscar uma dose ótima para o tratamento da pele fotodanificada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS/ CONCLUSÕES

Através dos nossos achados é possível concluir que a fração LBP isolada do fruto de *Lycium barbarum* no presente trabalho é predominantemente composta por moléculas bioativas de polissacarídeos que foram identificados como possíveis unidades glicosídicas de arabinose, glucose, galactose, contendo ainda traços de ácidos graxos de cadeia longa.

Este estudo mostrou que a fração LBP possui um potencial antioxidante e de ótima permeação na pele de orelha suína, podendo assim ser futuramente incorporado em formulações cosméticas.

O presente estudo também mostrou que os tratamentos com a fração LBP e a fotobiomodulação (isolados e associados), realizados durante a indução do fotodano na pele de camundongos *hairless*, promoveram uma proteção como o espessamento da epiderme em todos os grupos e a degradação das fibras colágenas, com exceção do grupo LBP+L. Contudo, os tratamentos não foram capazes de reduzir a expressão das MMP-1, 2 e 9, quando aplicados de forma isolada ou associada.

Este estudo ainda mostrou que, tanto a associação dos tratamentos com a fração LBP e a fotobiomodulação quanto a forma de aplicação, produziram a diminuição do espessamento da epiderme, dos níveis de expressão de p (c-Fos) e p (c-Jun) (AP-1) e dos níveis de expressão das MMP-1, 2 e 9, na pele fotodanificada de camundongos *hairless*. Os tratamentos ainda promoveram um aumento dos níveis de colágeno I, III e FGF2 no grupo onde o laser vermelho foi aplicado antes da fração LBP (PL+LBP), sugerindo um sinergismo nesta ordem de aplicação.

Estudos adicionais se fazem necessários para complementar a elucidação dos efeitos isolados e associados dessas terapias não invasivas na fotoproteção e no tratamento da pele fotodanificada.

Os resultados obtidos nos levam a propor uma possível utilização da fração LBP em formulações cosméticas devido ao seu potencial antioxidante e facilitador de permeação e ainda seu uso em associação com laser vermelho para fim de tratamento fotorejuvenescedor em procedimentos estéticos.

REFERÊNCIAS

- Abd, E., S. A. Yousef, M. N. Pastore, K. Telaprolu, Y. H. Mohammed, S. Namjoshi, J. E. Grice and M. S. Roberts (2016). "Skin models for the testing of transdermal drugs." Clinarmacol **8**: 163-176.
- Abergel, R. P., R. F. Lyons, J. C. Castel, R. M. Dwyer and J. Uitto (1987). "Biostimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures." J Dermatol Surg Oncol **13**(2): 127-133.
- Afaq, F. and H. Mukhtar (2002). "Photochemoprevention by botanical antioxidants." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **15**(5): 297-306.
- Agrawal, P. K. (1992). "NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides." Phytochemistry **31**(10): 3307-3330.
- Akhalaya, M. Y., G. V. Maksimov, A. B. Rubin, J. Lademann and M. E. Darvin (2014). "Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin." Ageing Res Rev **16**: 1-11.
- Amagase, H. and D. M. Nance (2008). "A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study of the general effects of a standardized *Lycium barbarum* (Goji) Juice, GoChi." J Altern Complement Med **14**(4): 403-412.
- Amaro-Ortiz, A., B. Yan and J. A. D'Orazio (2014). "Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation." Molecules **19**(5): 6202-6219.
- Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." Biochim Biophys Acta **1072**(2-3): 129-157.
- Angel, P., A. Szabowski and M. Schorpp-Kistner (2001). "Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology." Oncogene **20**(19): 2413-2423.
- Avci, P., A. Gupta, M. Sadasivam, D. Vecchio, Z. Pam, N. Pam and M. R. Hamblin (2013). "Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring." Semin Cutan Med Surg **32**(1): 41-52.
- Avci, P., M. Sadasivam, A. Gupta, W. C. De Melo, Y. Y. Huang, R. Yin, R. Chandran, R. Kumar, A. Otufowora, T. Nyame and M. R. Hamblin (2013). "Animal models of skin disease for drug discovery." Expert Opin Drug Discov **8**(3): 331-355.
- Barolet, D., C. J. Roberge, F. A. Auger, A. Boucher and L. Germain (2009). "Regulation of skin collagen metabolism in vitro using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study." J Invest Dermatol **129**(12): 2751-2759.
- Bhattacharyya, T. K., M. Pathria, C. Mathison, M. Vargas and J. R. Thomas (2014). "Cosmeceutical effect on skin surface profiles and epidermis in UV-B-irradiated mice." JAMA Facial Plast Surg **16**(4): 253-260.
- Brandwilliams, W., M. E. Cuvelier and C. Berset (1995). "USE OF A FREE-RADICAL METHOD TO EVALUATE ANTIOXIDANT ACTIVITY." Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie **28**(1): 25-30.
- Byrnes, K. R., L. Barna, V. M. Chenault, R. W. Waynant, I. K. Ilev, L. Longo, C. Miracco, B. Johnson and J. J. Anders (2004). "Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes." Photomed Laser Surg **22**(4): 281-290.
- Cavinato, M., B. Waltenberger, G. Baraldo, C. V. C. Grade, H. Stuppner and P. Jansen-Durr (2017). "Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging." Biogerontology **18**(4): 499-516.
- Chang, R. C. and K. F. So (2008). "Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far?" Cell Mol Neurobiol **28**(5): 643-652.

Chiang, H. M., H. C. Chen, H. H. Chiu, C. W. Chen, S. M. Wang and K. C. Wen (2013). "Neonuclea reticulata (Havil.) Merr Stimulates Skin Regeneration after UVB Exposure via ROS Scavenging and Modulation of the MAPK/MMPs/Collagen Pathway." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 324864.

Chiang, H. M., T. J. Lin, C. Y. Chiu, C. W. Chang, K. C. Hsu, P. C. Fan and K. C. Wen (2011). "Coffea arabica extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway." Food Chem Toxicol **49**(1): 309-318.

Chung, H., T. Dai, S. K. Sharma, Y. Y. Huang, J. D. Carroll and M. R. Hamblin (2012). "The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy." Ann Biomed Eng **40**(2): 516-533.

Chung, J. H., S. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher and J. J. Voorhees (2000). "Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo." J Invest Dermatol **115**(2): 177-182.

Chung, J. H., J. Y. Seo, H. R. Choi, M. K. Lee, C. S. Youn, G. Rhie, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park and H. C. Eun (2001). "Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo." J Invest Dermatol **117**(5): 1218-1224.

Claret, F. X., M. Hibi, S. Dhut, T. Toda and M. Karin (1996). "A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors." Nature **383**(6599): 453-457.

Corazza, A. V., J. Jorge, C. Kurachi and V. S. Bagnato (2007). "Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources." Photomed Laser Surg **25**(2): 102-106.

Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki and J. S. Gutkind (1995). "The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway." Cell **81**(7): 1137-1146.

Darby, I. A., B. Laverdet, F. Bonté and A. Desmoulière (2014). "Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing." Clin Cosmet Investig Dermatol **7**: 301-311.

de Souza, R. O., G. de Assis Dias Alves, A. L. S. Aguilera, H. Rogez and M. J. V. Fonseca (2018). "Photochemoprotective effect of a fraction of a partially purified extract of *Byrsonima crassifolia* leaves against UVB-induced oxidative stress in fibroblasts and hairless mice." J Photochem Photobiol B **178**: 53-60.

Dierickx, C. C. and R. R. Anderson (2005). "Visible light treatment of photoaging." Dermatol Ther **18**(3): 191-208.

Dreno, B., E. Araviiskaia, E. Berardesca, T. Bieber, J. Hawk, M. Sanchez-Viera and P. Wolkenstein (2014). "The science of dermocosmetics and its role in dermatology." J Eur Acad Dermatol Venereol **28**(11): 1409-1417.

Farris, P., M. Yatskayer, N. Chen, Y. Krol and C. Oresajo (2014). "Evaluation of efficacy and tolerance of a nighttime topical antioxidant containing resveratrol, baicalin, and vitamin e for treatment of mild to moderately photodamaged skin." J Drugs Dermatol **13**(12): 1467-1472.

Fisher, G. J., S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta and J. J. Voorhees (2002). "Mechanisms of photoaging and chronological skin aging." Arch Dermatol **138**(11): 1462-1470.

Fisher, G. J., H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, F. McPhillips, Z. Wang, X. Li, Y. Wan, S. Kang and J. J. Voorhees (1998). "Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo." J Clin Invest **101**(6): 1432-1440.

Fisher, G. J., H. S. Talwar, J. Lin and J. J. Voorhees (1999). "Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid." Photochem Photobiol **69**(2): 154-157.

- Fisher, G. J., Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang and J. J. Voorhees (1997). "Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light." N Engl J Med **337**(20): 1419-1428.
- Fitzpatrick, T. B. (1988). "The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI." Arch Dermatol **124**(6): 869-871.
- Gao, Y., Y. Wei, Y. Wang, F. Gao and Z. Chen (2017). "Lycium Barbarum: A Traditional Chinese Herb and A Promising Anti-Aging Agent." Aging Dis **8**(6): 778-791.
- Gao, Z., Z. Ali and I. A. Khan (2008). "Glycerogalactolipids from the fruit of Lycium barbarum." Phytochemistry **69**(16): 2856-2861.
- Gavish, L., L. Perez and S. D. Gertz (2006). "Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells." Lasers Surg Med **38**(8): 779-786.
- Gilchrest, B. A. (1989). "Skin aging and photoaging: an overview." J Am Acad Dermatol **21**(3 Pt 2): 610-613.
- Gilchrest, B. A. (2013). "Photoaging." J Invest Dermatol **133**(E1): E2-6.
- Gilchrest, B. A., M. S. Eller and M. Yaar (2009). "Telomere-mediated effects on melanogenesis and skin aging." J Investig Dermatol Symp Proc **14**(1): 25-31.
- Gillardone, F., C. Eschenfelder, E. Uhlmann, W. Hartschuh and M. Zimmermann (1994). "Differential regulation of c-fos, fosB, c-jun, junB, bcl-2 and bax expression in rat skin following single or chronic ultraviolet irradiation and in vivo modulation by antisense oligodeoxynucleotide superfusion." Oncogene **9**(11): 3219-3225.
- Gonçalves, V. d. P. (2014). Ação do curcumin sobre os períodos iniciais da carcinogênese bucal induzida po 4-NQO em modelo murino. Mestrado Dissertação, Universidade Estadual Paulista.
- Gupta, A., P. Avci, M. Sadasivam, R. Chandran, N. Parizotto, D. Vecchio, W. C. de Melo, T. Dai, L. Y. Chiang and M. R. Hamblin (2013). "Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration." Biotechnol Adv **31**(5): 607-631.
- Gupta, A., T. Dai and M. R. Hamblin (2014). "Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice." Lasers Med Sci **29**(1): 257-265.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford, United Kingdom ;, Oxford University Press.
- Ham, S. A., T. Yoo, J. S. Hwang, E. S. Kang, K. S. Paek, C. Park, J. H. Kim, J. T. Do and H. G. Seo (2014). "Peroxisome proliferator-activated receptor delta modulates MMP-2 secretion and elastin expression in human dermal fibroblasts exposed to ultraviolet B radiation." J Dermatol Sci **76**(1): 44-50.
- Hardaway, C. A. and E. V. Ross (2002). "Nonablative laser skin remodeling." Dermatol Clin **20**(1): 97-111, ix.
- He, N., X. Yang, Y. Jiao, L. Tian and Y. Zhao (2012). "Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits." Food Chemistry **133**(3): 978-989.
- Hess, J., P. Angel and M. Schorpp-Kistner (2004). "AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings." J Cell Sci **117**(Pt 25): 5965-5973.
- Hopkins, J. T., T. A. McLoda, J. G. Seegmiller and G. David Baxter (2004). "Low-Level Laser Therapy Facilitates Superficial Wound Healing in Humans: A Triple-Blind, Sham-Controlled Study." J Athl Train **39**(3): 223-229.
- Hossy, B. H., A. A. da Costa Leitao, F. B. Luz, E. P. dos Santos, S. Allodi, M. de Padula and N. C. de Oliveira Miguel (2013). "Effects of a sunscreen formulation on albino hairless mice: a morphological approach." Arch Dermatol Res **305**(6): 535-544.

Huang, H., D. Kong, Y. Liu, Q. Cui, K. Wang, D. Zhang, J. Wang, M. Zhai, J. Yan, C. Zhang and G. Wu (2017). "Sapylin promotes wound healing in mouse skin flaps." Am J Transl Res **9**(6): 3017-3026.

Huang, Y. Y., A. C. Chen, J. D. Carroll and M. R. Hamblin (2009). "Biphasic dose response in low level light therapy." Dose Response **7**(4): 358-383.

Huang, Y. Y., S. K. Sharma, J. Carroll and M. R. Hamblin (2011). "Biphasic dose response in low level light therapy - an update." Dose Response **9**(4): 602-618.

Hwang, E., T. H. Lee, S. Y. Park, T. H. Yi and S. Y. Kim (2014). "Enzyme-modified Panax ginseng inhibits UVB-induced skin aging through the regulation of procollagen type I and MMP-1 expression." Food Funct **5**(2): 265-274.

Hwang, E., S. Y. Park, H. J. Lee, T. Y. Lee, Z. W. Sun and T. H. Yi (2014). "Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice." Phytother Res **28**(12): 1778-1788.

Hwang, E., Z. W. Sun, T. H. Lee, H. S. Shin, S. Y. Park, D. G. Lee, B. G. Cho, H. Sohn, O. W. Kwon, S. Y. Kim and T. H. Yi (2013). "Enzyme-processed Korean Red Ginseng extracts protects against skin damage induced by UVB irradiation in hairless mice." J Ginseng Res **37**(4): 425-434.

Hwang, Y. P., J. H. Choi, H. G. Kim, J. M. Choi, S. K. Hwang, Y. C. Chung and H. G. Jeong (2012). "Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappaB/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts." Nutr Res **32**(6): 428-438.

Inomata, S., Y. Matsunaga, S. Amano, K. Takada, K. Kobayashi, M. Tsunenaga, T. Nishiyama, Y. Kohno and M. Fukuda (2003). "Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse." J Invest Dermatol **120**(1): 128-134.

Jeon, H., D. H. Kim, Y. H. Nho, J. E. Park, S. N. Kim and E. H. Choi (2016). "A Mixture of Extracts of Kochia scoparia and Rosa multiflora with PPAR alpha/gamma Dual Agonistic Effects Prevents Photoaging in Hairless Mice." Int J Mol Sci **17**(11).

Jin, M., Q. Huang, K. Zhao and P. Shang (2013). "Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from Lycium barbarum L." International Journal of Biological Macromolecules **54**: 16-23.

Jung, S. K., K. W. Lee, H. Y. Kim, M. H. Oh, S. Byun, S. H. Lim, Y. S. Heo, N. J. Kang, A. M. Bode, Z. Dong and H. J. Lee (2010). "Myricetin suppresses UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by inhibiting Raf." Biochem Pharmacol **79**(10): 1455-1461.

Kang, S., J. H. Chung, J. H. Lee, G. J. Fisher, Y. S. Wan, E. A. Duell and J. J. Voorhees (2003). "Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo." J Invest Dermatol **120**(5): 835-841.

Kanitakis, J. (2002). "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin." Eur J Dermatol **12**(4): 390-399; quiz 400-391.

Karin, M. and T. Hunter (1995). "Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus." Curr Biol **5**(7): 747-757.

Karin, M., Z. Liu and E. Zandi (1997). "AP-1 function and regulation." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 240-246.

Karu, T. (1989). "Laser biostimulation: a photobiological phenomenon." J Photochem Photobiol B **3**(4): 638-640.

Ke, M., X.-J. Zhang, Z.-H. Han, H.-Y. Yu, Y. Lin, W.-G. Zhang, F.-H. Sun and T.-J. Wang (2011). "Extraction, purification of Lycium barbarum polysaccharides and bioactivity of purified fraction." Carbohydrate Polymers **86**(1): 136-141.

Kim, J., C. W. Lee, E. K. Kim, S. J. Lee, N. H. Park, H. S. Kim, H. K. Kim, K. Char, Y. P. Jang and J. W. Kim (2011). "Inhibition effect of Gynura procumbens extract on UV-B-

induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts." J Ethnopharmacol **137**(1): 427-433.

Kim, T. H., H. N. Ananthaswamy, M. L. Kripke and S. E. Ullrich (2003). "Advantages of using hairless mice versus haired mice to test sunscreen efficacy against photoimmune suppressions." Photochem Photobiol **78**(1): 37-42.

Kostyuk, V., A. Potapovich, A. R. Albuhaydar, W. Mayer, C. De Luca and L. Korkina (2018). "Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics." Rejuvenation Res **21**(2): 91-101.

Kruglikov, I. L. and P. E. Scherer (2016). "Skin aging: are adipocytes the next target?" Aging (Albany NY) **8**(7): 1457-1469.

Lautenschlager, S., H. C. Wulf and M. R. Pittelkow (2007). "Photoprotection." Lancet **370**(9586): 528-537.

Le Pillouer-Prost, A. and H. Cartier (2016). "Photodynamic Photorejuvenation: A Review." Dermatol Surg **42**(1): 21-30.

Lee, C. J., J. H. Park, T. E. Ciesielski, J. G. Thomson and J. A. Persing (2008). "Retinoids, 585-nm laser, and carbon dioxide laser: a numeric comparison of neocollagen formation in photoaged hairless mouse skin." Aesthetic Plast Surg **32**(6): 894-901.

Lee, H. J., A. R. Im, S. M. Kim, H. S. Kang, J. D. Lee and S. Chae (2018). "The flavonoid hesperidin exerts anti-photoaging effect by downregulating matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression via mitogen activated protein kinase (MAPK)-dependent signaling pathways." BMC Complement Altern Med **18**(1): 39.

Lee, S. Y., K. H. Park, J. W. Choi, J. K. Kwon, D. R. Lee, M. S. Shin, J. S. Lee, C. E. You and M. Y. Park (2007). "A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blinded, and split-face clinical study on LED phototherapy for skin rejuvenation: clinical, profilometric, histologic, ultrastructural, and biochemical evaluations and comparison of three different treatment settings." J Photochem Photobiol B **88**(1): 51-67.

Li, H., Z. Li, L. Peng, N. Jiang, Q. Liu, E. Zhang, B. Liang, R. Li and H. Zhu (2017). "Lycium barbarum polysaccharide protects human keratinocytes against UVB-induced photo-damage." Free Radic Res **51**(2): 200-210.

Liang, B., M. Jin and H. Liu (2011). "Water-soluble polysaccharide from dried Lycium barbarum fruits: Isolation, structural features and antioxidant activity." Carbohydrate Polymers **83**(4): 1947-1951.

Lin, C. L., C. C. Wang, S. C. Chang, B. S. Inbaraj and B. H. Chen (2009). "Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from Lycium barbarum Linnaeus." Int J Biol Macromol **45**(2): 146-151.

Mao, F., B. Xiao, Z. Jiang, J. Zhao, X. Huang and J. Guo (2011). "Anticancer effect of Lycium barbarum polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest." Med Oncol **28**(1): 121-126.

Mata, K. M., C. Tefe-Silva, E. M. Floriano, C. R. Fernandes, E. Rizzi, R. F. Gerlach, M. Q. Mazzuca and S. G. Ramos (2015). "Interference of doxycycline pretreatment in a model of abdominal aortic aneurysms." Cardiovasc Pathol **24**(2): 110-120.

Menter, J. M., R. M. Sayre, A. A. Etemadi, P. P. Agin and I. Willis (1996). "Chronic exposure of Sk-1 hairless mice to narrow-band ultraviolet A (320-355 nm)." Photodermatol Photoimmunol Photomed **12**(1): 7-11.

Migliario, M., M. Rizzi, V. Rocchetti, M. Cannas and F. Reno (2013). "In vitro toxicity of photodynamic antimicrobial chemotherapy on human keratinocytes proliferation." Lasers Med Sci **28**(2): 565-569.

Minden, A., A. Lin, F. X. Claret, A. Abo and M. Karin (1995). "Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs." Cell **81**(7): 1147-1157.

Naylor, E. C., R. E. Watson and M. J. Sherratt (2011). "Molecular aspects of skin ageing." Maturitas **69**(3): 249-256.

Neves, L. M. G., R. L. Matheus, G. M. T. Santos, M. A. M. Esquisatto, M. E. C. Amaral and F. A. S. Mendonca (2013). "Effects of microcurrent application and 670 nm InGaP low-level laser irradiation on experimental wound healing in healthy and diabetic Wistar rats." Laser Physics **23**(3).

Oikarinen, A. (1990). "The aging of skin: chronoaging versus photoaging." Photodermatol Photoimmunol Photomed **7**(1): 3-4.

Omi, T., S. Kawana, S. Sato and M. Honda (2003). "Ultrastructural changes elicited by a non-ablative wrinkle reduction laser." Lasers Surg Med **32**(1): 46-49.

OyetaKinWhite, P., H. Tribout and E. Baron (2012). "Protective mechanisms of green tea polyphenols in skin." Oxid Med Cell Longev **2012**: 560682.

Pandel, R., B. Poljsak, A. Godic and R. Dahmane (2013). "Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention." ISRN Dermatol **2013**: 930164.

Park, B., E. Hwang, S. A. Seo, J. G. Cho, J. E. Yang and T. H. Yi (2018). "Eucalyptus globulus extract protects against UVB-induced photoaging by enhancing collagen synthesis via regulation of TGF-beta/Smad signals and attenuation of AP-1." Arch Biochem Biophys **637**: 31-39.

Park, E. K., H. J. Lee, H. Lee, J. H. Kim, J. Hwang, J. I. Koo and S. H. Kim (2018). "The Anti-Wrinkle Mechanism of Melatonin in UVB Treated HaCaT Keratinocytes and Hairless Mice via Inhibition of ROS and Sonic Hedgehog Mediated Inflammatory Proteins." Int J Mol Sci **19**(7).

Pedrosa, S. S., C. Goncalves, L. David and M. Gama (2014). "A novel crosslinked hyaluronic acid nanogel for drug delivery." Macromol Biosci **14**(11): 1556-1568.

Perez-Sanchez, A., E. Barrajon-Catalan, M. Herranz-Lopez and V. Micol (2018). "Nutraceuticals for Skin Care: A Comprehensive Review of Human Clinical Studies." Nutrients **10**(4).

Petruk, G., R. Del Giudice, M. M. Rigano and D. M. Monti (2018). "Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging." Oxid Med Cell Longev **2018**: 1454936.

Pittayapruerk, P., J. Meephansan, O. Prapapan, M. Komine and M. Ohtsuki (2016). "Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis." Int J Mol Sci **17**(6).

Poljsak, B., R. Dahmane and A. Godic (2013). "Skin and antioxidants." J Cosmet Laser Ther **15**(2): 107-113.

Poon, F., S. Kang and A. L. Chien (2015). "Mechanisms and treatments of photoaging." Photodermatol Photoimmunol Photomed **31**(2): 65-74.

Potterat, O. (2010). "Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity." Planta Med **76**(1): 7-19.

Praca, F. S., M. V. Bentley, M. G. Lara and M. B. Pierre (2011). "Celecoxib determination in different layers of skin by a newly developed and validated HPLC-UV method." Biomed Chromatogr **25**(11): 1237-1244.

Pyun, H. B., M. Kim, J. Park, Y. Sakai, N. Numata, J. Y. Shin, H. J. Shin, D. U. Kim and J. K. Hwang (2012). "Effects of Collagen Tripeptide Supplement on Photoaging and Epidermal Skin Barrier in UVB-exposed Hairless Mice." Prev Nutr Food Sci **17**(4): 245-253.

Qin, D., W. H. Lee, Z. Gao, W. Zhang, M. Peng, T. Sun and Y. Gao (2018). "Protective effects of antioxidin-RL from *Odorrana livida* against ultraviolet B-irradiated skin photoaging." Peptides **101**: 124-134.

Quan, T., T. He, S. Kang, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2002). "Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smad pathway in human skin in vivo." J Invest Dermatol **119**(2): 499-506.

Quan, T., Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2009). "Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging." J Investig Dermatol Symp Proc **14**(1): 20-24.

Rijken, F., P. L. Bruijnzeel, H. van Weelden and R. C. Kiekens (2004). "Responses of black and white skin to solar-simulating radiation: differences in DNA photodamage, infiltrating neutrophils, proteolytic enzymes induced, keratinocyte activation, and IL-10 expression." J Invest Dermatol **122**(6): 1448-1455.

Rinnerthaler, M., J. Bischof, M. K. Streubel, A. Trost and K. Richter (2015). "Oxidative stress in aging human skin." Biomolecules **5**(2): 545-589.

Rojas, J. C. and F. Gonzalez-Lima (2011). "Low-level light therapy of the eye and brain." Eye Brain **3**: 49-67.

Romanhole, R. C., J. A. Ataide, P. Moriel and P. G. Mazzola (2015). "Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effects on skin." Int J Cosmet Sci **37**(4): 366-370.

Roy, A., R. K. Sahu, M. Matlam, V. K. Deshmukh, J. Dwivedi and A. K. Jha (2013). "In vitro techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations." Pharmacogn Rev **7**(14): 97-106.

Ruland, J. and T. W. Mak (2003). "Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB." Immunol Rev **193**: 93-100.

Saewan, N. and A. Jimtaisong (2015). "Natural products as photoprotection." J Cosmet Dermatol **14**(1): 47-63.

Sbardella, D., G. F. Fasciglione, M. Gioia, C. Ciaccio, G. R. Tundo, S. Marini and M. Coletta (2012). "Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes." Mol Aspects Med **33**(2): 119-208.

Scharffetter-Kochanek, K., M. Wlaschek, P. Brenneisen, M. Schauen, R. Blandschun and J. Wenk (1997). "UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging." Biol Chem **378**(11): 1247-1257.

Senftleben, U. and M. Karin (2002). "The IKK/NF-kappaB pathway." Crit Care Med **30**(1 Supp): S18-S26.

Serafini, M. R., C. B. Detoni, P. o. P. Menezes, R. N. Pereira Filho, V. S. Fortes, M. J. Vieira, S. S. Guterres, R. L. Cavalcanti de Albuquerque Junior and A. A. Araújo (2014). "UVA-UVB photoprotective activity of topical formulations containing Morinda citrifolia extract." Biomed Res Int **2014**: 587819.

Serre, C., V. Busutil and J. M. Botto (2018). "Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation." Int J Cosmet Sci **40**(4): 328-347.

Sharma, M. R., B. Werth and V. P. Werth (2011). "Animal models of acute photodamage: comparisons of anatomic, cellular and molecular responses in C57BL/6J, SKH1 and Balb/c mice." Photochem Photobiol **87**(3): 690-698.

Silva, E. S., G. B. Machado, A. Lino-Dos-Santos-Franco and C. Pavani (2018). "Combination of Natural Extracts and Photobiomodulation in Keratinocytes Subjected to UVA Radiation." Photochem Photobiol.

Sjerobabski Masnec, I. and S. Poduje (2008). "Photoaging." Coll Antropol **32 Suppl 2**: 177-180.

Soriani, M., V. Hejmadi and R. M. Tyrrell (2000). "Modulation of c-jun and c-fos transcription by UVB and UVA radiations in human dermal fibroblasts and KB cells." Photochem Photobiol **71**(5): 551-558.

Sun, Z. W., E. Hwang, H. J. Lee, T. Y. Lee, H. G. Song, S. Y. Park, H. S. Shin, D. G. Lee and T. H. Yi (2015). "Effects of *Galla chinensis* extracts on UVB-irradiated MMP-1 production in hairless mice." J Nat Med **69**(1): 22-34.

Tsai, S. R. and M. R. Hamblin (2017). "Biological effects and medical applications of infrared radiation." J Photochem Photobiol B **170**: 197-207.

Varani, J., D. Spearman, P. Perone, S. E. Fligiel, S. C. Datta, Z. Q. Wang, Y. Shao, S. Kang, G. J. Fisher and J. J. Voorhees (2001). "Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro." Am J Pathol **158**(3): 931-942.

Vierkotter, A. and J. Krutmann (2012). "Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations." Dermatoendocrinol **4**(3): 227-231.

Weiherrmann, A. C., M. Lorencini, C. A. Brohem and C. M. de Carvalho (2017). "Elastin structure and its involvement in skin photoageing." Int J Cosmet Sci **39**(3): 241-247.

Wen, K. C., P. C. Fan, S. Y. Tsai, I. C. Shih and H. M. Chiang (2012). "*Ixora parviflora* Protects against UVB-Induced Photoaging by Inhibiting the Expression of MMPs, MAP Kinases, and COX-2 and by Promoting Type I Procollagen Synthesis." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 417346.

Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." J Mol Med (Berl) **74**(10): 589-607.

Woodruff, L. D., J. M. Bounkeo, W. M. Brannon, K. S. Dawes, C. D. Barham, D. L. Waddell and C. S. Enwemeka (2004). "The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature." Photomed Laser Surg **22**(3): 241-247.

Wu, S. J., L. T. Ng and C. C. Lin (2004). "Antioxidant activities of some common ingredients of traditional chinese medicine, *Angelica sinensis*, *Lycium barbarum* and *Poria cocos*." Phytother Res **18**(12): 1008-1012.

Xin, Y. F., L. L. Wan, J. L. Peng and C. Guo (2011). "Alleviation of the acute doxorubicin-induced cardiotoxicity by *Lycium barbarum* polysaccharides through the suppression of oxidative stress." Food Chem Toxicol **49**(1): 259-264.

Yaar, M. and B. A. Gilchrist (2007). "Photoageing: mechanism, prevention and therapy." Br J Dermatol **157**(5): 874-887.

Ye, X., L. Wang, Y. Dang, B. Liu and D. Zhao (2012). "Investigation of the 1064 nm Q-switched Nd:YAG laser on collagen expression in an animal model." Photomed Laser Surg **30**(10): 604-609.

Yu, W., J. O. Naim and R. J. Lanzafame (1994). "The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts." Photochem Photobiol **59**(2): 167-170.

Yu, W., J. O. Naim and R. J. Lanzafame (1997). "Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice." Lasers Surg Med **20**(1): 56-63.

Yuan, X. Y., W. Liu, J. C. Hao, W. J. Gu and Y. S. Zhao (2012). "Topical grape seed proanthocyanidin extract reduces sunburn cells and mutant p53 positive epidermal cell formation, and prevents depletion of Langerhans cells in an acute sunburn model." Photomed Laser Surg **30**(1): 20-25.

Yuan, Y., Y. B. Wang, Y. Jiang, K. N. Prasad, J. Yang, H. Qu, Y. Wang, Y. Jia, H. Mo and B. Yang (2016). "Structure identification of a polysaccharide purified from *Lycium barbarum* fruit." Int J Biol Macromol **82**: 696-701.

Zelickson, B. D., S. L. Kilmer, E. Bernstein, V. A. Chotzen, J. Dock, D. Mehregan and C. Coles (1999). "Pulsed dye laser therapy for sun damaged skin." Lasers Surg Med **25**(3): 229-236.

Zhang, L., J. Gu, Y. Chen and L. Zhang (2013). "A study on four antioxidation effects of lycium barbarum polysaccharides in vitro." Afr J Tradit Complement Altern Med **10**(6): 494-498.

Zhang, M., H. Chen, J. Huang, Z. Li, C. Zhu and S. Zhang (2005). "Effect of lycium barbarum polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis." Life Sci **76**(18): 2115-2124.

Zhang, Q., X. Lv, T. Wu, Q. Ma, A. Teng, Y. Zhang and M. Zhang (2015). "Composition of Lycium barbarum polysaccharides and their apoptosis-inducing effect on human hepatoma SMMC-7721 cells." Food Nutr Res **59**: 28696.

Zhang, X. J., H. Y. Yu, Y. J. Cai and M. Ke (2017). "Lycium barbarum polysaccharides inhibit proliferation and migration of bladder cancer cell lines BIU87 by suppressing Pi3K/AKT pathway." Oncotarget **8**(4): 5936-5942.

Zhang, X. R., W. X. Zhou, Y. X. Zhang, C. H. Qi, H. Yan, Z. F. Wang and B. Wang (2011). "Macrophages, rather than T and B cells are principal immunostimulatory target cells of Lycium barbarum L. polysaccharide LBPF4-OL." J Ethnopharmacol **136**(3): 465-472.

Zhou, F., X. Jiang, T. Wang, B. Zhang and H. Zhao (2018). "Lyciumbarbarum Polysaccharide (LBP): A Novel Prebiotics Candidate for Bifidobacterium and Lactobacillus." Front Microbiol **9**: 1034.

Received: 9 March 2018 | Accepted: 19 April 2018
 DOI: 10.1002/jbio.201800077



FULL ARTICLE

Photobiomodulation of a flowable matrix in a human skin ex vivo model demonstrates energy-based enhancement of engraftment integration and remodeling

Lia M. G. Neves¹ | Nivaldo A. Parizotto^{2,3,4} | Marcia R. Cominetti^{1*} | Ardeshtir Bayat^{5*}

¹Laboratory of Biology of Aging (LABEN), Department of Gerontology, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

²Physical Therapy Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

³Biotechnology Post-Graduation Program, University of Araraquara, Araraquara, Brazil

⁴Post-Graduation in Biomedical Engineering, University of Brazil, São Paulo, SP, Brazil

⁵School of Biological Sciences and Health/ Division of Musculoskeletal and Dermatological Sciences, University of Manchester, Manchester, UK

*Correspondence

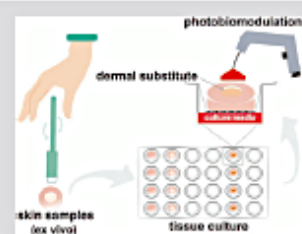
Marcia R. Cominetti, Laboratory of Biology of Aging (LABEN), Department of Gerontology, Federal University of São Carlos, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil.
 Email: mcominetti@ufscar.br

Ardeshtir Bayat, School of Biological Sciences and Health/ Division of Musculoskeletal and Dermatological Sciences – University of Manchester, Manchester, UK.
 Email: ardeshtir.bayat@manchester.ac.uk

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2013270218, 2015249405, 201624907-3

The use of dermal substitutes to treat skin defects such as ulcers has shown promising results, suggesting a potential role for skin substitutes for treating acute and chronic wounds. One of the main drawbacks with the use of dermal substitutes is the length of time from engraftment to graft take, plus the risk of contamination and failure due to this prolonged integration. Therefore, the use of adjuvant energy-based therapeutic modalities



to augment and accelerate the rate of biointegration by dermal substitute engraftments is a desirable outcome. The photobiomodulation (PBM) therapy modulates the repair process, by stimulating cellular proliferation and angiogenesis. Here, we evaluated the effect of PBM on a collagen-glycosaminoglycan flowable wound matrix (FWM) in an ex vivo human skin wound model. PBM resulted in accelerated rate of re-epithelialization and organization of matrix as seen by structural arrangement of collagen fibers, and a subsequent increased expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) leading to an overall improved healing process. The use of PBM promoted a beneficial effect on the rate of integration and healing of FWM. We therefore propose that the adjuvant use of PBM may have utility in enhancing engraftment and tissue repair and be of value in clinical practice.

KEYWORDS

flowable matrix, low-level laser therapy, photobiomodulation therapy, skin substitute, tissue remodeling, wound repair

1 | INTRODUCTION

Tissue repair following injury is a well-orchestrated yet complex biological process involving many local and systemic factors. For this to occur, dynamic interactions between different cell types and intra- and extracellular pathways are activated to restore integrity and functionality of the tissue [1, 2].

Complete understanding of the role of cellular and molecular mechanisms that orchestrate skin repair remain poorly understood and thus, current targeted therapies are limited. The imperfect wound repair process that occurs following chronic wounds formation is a clinical and therapeutic challenge [3, 4]. Therefore, identifying the relevant therapeutic modalities to improve cutaneous repair, are a clinical necessity.

Skin tissue engineering through the use of dermal substitutes is an attractive approach to rebuild lost and damaged tissue [4]. A variety of dermal substitutes are utilized in the

Marcia Regina Cominetti and Ardeshtir Bayat are co-senior authors.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
TERMO DE OUTORGA E ACETAÇÃO DE BOLSAS NO EXTERIOR
PROCESSO 2016/24907-3

<p>Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede aos OUTORGADO(S), a seguir qualificado(s), Bolsa para a realização de Projeto de Pesquisa a seguir especificado, em Instituição no Exterior, com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passa a ser parte integrante deste Termo.</p>	
1. OUTORGADOS	
1.1 BOLSISTA:	Lia Mara Grosso Neves
1.2 ORIENTADOR/SUPERVISOR:	Márcia Regina Cominetti
2. Correspondência	
2.1 BOLSISTA:	A/C Lia Mara Grosso Neves, liamarabiologia@hotmail.com
2.2 ORIENTADOR/SUPERVISOR:	mcominetti@ufscar.br
3. Instituição Sede:	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/CCBS Universidade Federal de São Carlos/UFSCAR
4. Instituição no Exterior:	The University of Manchester Manchester Inglaterra
5. Projeto de Pesquisa:	Efeitos da fotobiomodulação e do modelo dermal Integra® suplementado com fração de polissacarídeos de <i>Lycium barbarum</i> em um modelo de cicatrização de ferida ex vivo
6. Linha de Fomento:	Programas Regulares / Bolsas / No Exterior / Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior / BEPE - Doutorado
7. Área/Subárea:	Medicina Outra Subárea Medicina
8. Coordenação:	Saúde I
9. Período da vigência:	01/03/2017 a 31/08/2017

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

n° 040/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa *Efeitos do extrato do fruto de Lycium barbarum L. e do laser vermelho na prevenção do fotoenvelhecimento cutâneo em camundongos sem pelos SKH:hr-1*, submetido pelo pesquisador **Lia Mara Grosso Neves**.

São Carlos, 27 de outubro de 2014

Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais