VIVIAN ZAGUE

Influência da suplementação com colágeno hidrolisado no metabolismo da matriz extracelular e proliferação de fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas fotoprottegida e fotoexposta, cultivados em monocamada e equivalente dérmico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

VIVIAN ZAGUE

Influência da suplementação com colágeno hidrolisado no metabolismo da matriz extracelular e proliferação de fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas fotoprottegida e fotoexposta, cultivados em monocamada e equivalente dérmico

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Zague, Vivian.

Influência da suplementação com colágeno hidrolisado no metabolismo da matriz extracelular e proliferação de fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas fotoprottegida e fotoexposta, cultivados em monocamada e equivalente dérmico / Vivian Zague. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Cultura de fibroblastos dérmicos humanos em monocamada e modelo tridimensional.

Versão do título para o inglês: Influence of collagen hydrolysate supplementation on extracellular matrix metabolism of human dermal fibroblasts derived from sun-protected and sun-exposed body sites, cultured in monolayer and dermal equivalent models.

1. Colágeno hidrolisado 2. Fibroblastos dérmicos humanos 3. Metabolismo da matriz extracelular 4. Suplemento alimentar 5. Envelhecimento cutâneo 6. Equivalente dérmico humano I. Santelli, Profa. Dra. Gláucia Maria Machado II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0111/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vivian Zague.

Título da Tese: Influência da suplementação com colágeno hidrolisado no metabolismo da matriz extracelular e proliferação de fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas fotoprotegida e fotoexposta, cultivados em monocamada e equivalente dérmico.

Orientador(a): Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 02 de junho de 2011.

PARECER 996/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 26.04.2011, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Estudo do mecanismo de regulação metabólica do colágeno hidrolisado (peptídeos de colágeno) em fibroblastos de pele humana*" sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **GLÁUCIA MARIA MACHADO-SANTELLI** e a aluna **VIVIAN ZAGUE**.

Cabe a pesquisadora executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.04.2012**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO M.A. ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Com amor,

A Deus, pela graça da vida, conforto e direcionamento, a frente de cada passo, permitindo que este trabalho fosse desenvolvido com dedicação e sabedoria.

À minha filha Alice, pelo amor mais puro e incondicional e incomparáveis alegrias.

Ao meu marido Dori, todo meu amor e entrega, por todo apoio, compreensão, paciência e companheirismo.

Aos meus pais, Faber e Umbelina, pela dedicação incansável e amor eterno, incentivos e direcionamentos.

À minha irmã e grande amiga Aline, sempre ao meu lado, me incentivando e me ajudando a não desistir.

AGRADECIMENTOS

Foi uma longa jornada, cheia de emoções, desafios, altos e baixos, e muitas pessoas queridas a quem devo meu 'MUITO OBRIGADA' e todo meu carinho:

À minha orientadora, Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli, pela confiança, paciência, carinho, ensinamentos, por ter aberto as portas do seu laboratório para realização deste trabalho e por acreditar que eu não iria desistir.

À minha orientadora de Iniciação Científica e amiga, Profa. Dra. Gislaine Ricci Leonardi, que despertou em mim o amor pela pesquisa.

Às minhas lindas amigas “jabulanis”, Amanda Brandão (Amandita) e Camila Lauand (Camis), pelo simples fato de existirem e fazerem parte da minha vida. Obrigada por tudo! E Camis, obrigada por ter cuidado das minhas culturas nos últimos experimentos de PCR.

Ao meu querido amigo Evandro Niero (Evandrito), pelo companheirismo, risadas (e choros), pela ajuda nos intermináveis experimentos de proliferação e por dedicar tempo para revisar meu trabalho.

À minha ‘prima’ Marina, pela amizade, conversas, desabafos e companhia até altas horas da madrugada durante os exaustivos e frustrantes experimentos de *Western blot*.

Ao Jônatas do Amaral (Jonatão), pelo sorriso, alegria, gentileza e ajuda com os experimentos de microscopia eletrônica de varredura.

À Paula Rezende, pela ajuda com os experimentos de RT-PCR, ensinamentos e discussões.

Ao colega Ricardo Boggio, pelas dicas sobre cultura primária de fibroblastos e pelo fornecimento dos explantes de pele.

À Michele Menezes (Mich), pelo carinho, incentivo, conversas no fluxo e, claro, dicas de moda e beleza.

À Isis, pela imensa ajuda e dedicação durante seu período de iniciação científica.

Ao Adam Martens, pelas conversas, pelos diferentes pontos de vista, pela ajuda na minha qualificação e por ser tão prestativo.

À Natalia Bazán (peruana), por todas as risadas e aulas de espanhol.

À Raquel Almeida (Keka), pelas risadas e por me deixar 'irritada' ao me chamar carinhosamente de Vivão!

A todos os colegas do laboratório BIOCEM que dividiram suas experiências e expectativas comigo nesta caminhada: Marisa, Marcel, Luana, Bianca, Beatriz, Jorge, Marcelo e Anali.

Ao meu amigo Juliano de Moraes, pela bondade, carinho, incentivo, orações e pela imensa ajuda na revisão da minha tese.

Ao Emerson Santos, pela ajuda nos ensaios de proliferação com o kit *Click-iT EdU Flow Cytometry*.

À Nancy e Marlene, por toda dedicação e cuidado com o laboratório.

Ao Roberto Cabado, pela ajuda com as imagens de imunofluorescência e montagem das pranchas para a minha qualificação.

À Profa. Dra. Patrícia Gama, pela atenção, ensinamentos, discussões e uso de alguns equipamentos em seu laboratório.

À Profa. Dra. Vanessa Moraes Freitas, pela ajuda e ensinamentos nos ensaios de zimografia e doação de algumas alíquotas do anticorpo anti-pró-colágeno I para os ensaios iniciais de imunofluorescência.

Ao Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger, pelo uso do leitor de ELISA do seu laboratório e pelo kit de proliferação *Click-iT EdU Flow Cytometry*.

Ao Prof. Dr. Rui Curi, pelo uso do espectrofotômetro do seu laboratório.

À Secretaria de Pós-Graduação, em especial a Celiana e Regina pelas orientações, atenção e paciência.

A todos os funcionários do ICB que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Às minhas amigas Ana Cláudia, Tânia, Danielli e Talita, pela amizade desde a infância e participação, mesmo que distantes, de todos os momentos importantes da minha vida. "A distância nunca separa os corações que se importam".

A minha querida prima Luciana Hoffmann, por fazer parte de todos os momentos da minha vida.

Ao meu cunhado André, pelo apoio e por todo carinho e atenção dedicados a minha filha durante a reta final da escrita da tese.

Aos meus sogros Dorival e Diverlem, pelo carinho e, em especial, pelo exemplo de marido que permitiram que eu tivesse.

A todos os meus familiares (tios e tias, primos e primas), que vibram comigo a cada conquista.

À empresa GELITA, em especial, Denise Reis (Gerente de Pesquisa e Desenvolvimento), Cláudia Yamana (Presidente) e Paulo Reimann (ex-presidente), por valorizarem a Pesquisa Científica e terem concedido esta oportunidade. Obrigada por acreditarem que eu seria capaz de gerenciar meu tempo e conciliar as reponsabilidades da empresa bem como os experimentos e disciplinas do Doutorado.

Aos queridos amigos da GELITA que participaram desde o início desta jornada: Cáthia Reis, Daniella Serrano, Vagner Sena, Danielle Fernandes, Mariana Milliatti (ex-Gelita), Tais Sereza e Fátima. Obrigada pelo apoio, amizade e pelas palavras de incentivo.

Ao Steffen Oesser, Diretor do *Collagen Research Institute* (CRI), Kiel, Alemanha, pelos valiosos ensinamentos e dicas para execução deste trabalho.

À GELITA, FAPESP, a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A pesquisa científica é algo que só se pode fazer com amor e dedicação. Já dizia George Bernard Shaw “A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”. O desenrolar da pesquisa é ao mesmo tempo encantador e frustrante, por isso nos motiva e nos torna apaixonados.

A escolha de um tema de pesquisa é única, resultado do esforço de um olhar curioso e interessado em enxergar de outro modo o que parecia familiar e evidente.

Vivian Zague

RESUMO

Zague V. Influência da suplementação com colágeno hidrolisado no metabolismo da matriz extracelular e proliferação de fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas fotoprotetida e fotoexposta, cultivados em monocamada e equivalente dérmico. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Nos últimos anos tem havido interesse crescente na relação entre nutrientes e compostos bioativos de alimentos e seus benefícios para a pele. O colágeno hidrolisado (CH) é um destes compostos que vem sendo estudado, demonstrando potencial na melhora dos sinais clínicos do envelhecimento cutâneo. Seu uso como suplemento alimentar vem de longa data, porém poucos estudos têm endereçado os efeitos subjacentes do CH sobre a biologia celular e molecular de células da pele que poderiam elucidar os achados de melhora clínica. Este trabalho investigou, pela primeira vez, a influência do CH na modulação do metabolismo e proliferação de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) derivados de regiões anatômicas acometidas pelo envelhecimento cronológico (fotoprotetida) e fotoenvelhecimento (fotoexposta), cultivados em modelo de monocamada. Explantes de pele de mama e de pele de pálpebra foram utilizados para obtenção das culturas primárias de FDHs de área fotoprotetida e fotoexposta, respectivamente. Além disto, foram investigados os efeitos da suplementação com CH na secreção de colágeno tipo I, em modelo de cultura 3D de equivalente dérmico, derivado de matriz produzida exclusivamente por FDHs. Os achados deste trabalho comprovaram que o tratamento com CH não influenciou a proliferação celular dos fibroblastos derivados de ambas as áreas, porém modulou expressivamente o metabolismo dos FDHs cultivados em monocamada, elevando o conteúdo do precursor e da proteína principal da matriz dérmica, pró-colágeno I e colágeno I, respectivamente. Estes efeitos foram confirmados no modelo de equivalente de derme humana. O aumento do conteúdo de colágeno nas culturas foi atribuído à estimulação da biossíntese e diminuição do metabolismo de colágeno I, por meio a inibição da atividade de metaloproteinases de matriz (MMP) 1 e 2. A modulação do colágeno hidrolisado no metabolismo celular não diferiu entre as células derivadas de áreas protegida ou exposta ao sol. No entanto, concentrações menores de CH foram suficientes para estimular as células de área fotoexposta, sugerindo efeitos mais pronunciados do CH nestas células. Acreditamos que este estudo é uma contribuição importante para compreensão dos efeitos biológicos do CH nas células da pele e viabilidade do seu uso como ingrediente funcional de suplementos alimentares.

Palavras-chave: Colágeno hidrolisado. Peptídeos bioativos de colágeno. Suplemento alimentar. Fibroblastos dérmicos humanos. Metabolismo da matriz extracelular. Proliferação. Equivalente dérmico humano. Matriz dérmica. Envelhecimento cutâneo. Fotoenvelhecimento. Cultura primária.

ABSTRACT

Zague V. Influence of collagen hydrolysate supplementation on extracellular matrix metabolism of human dermal fibroblasts derived from sun-protected and sun-exposed body sites, cultured in monolayer and dermal equivalent models. [PH. D. Thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

In recent years, there has been increasing interest in the relationship between nutrients and food-derived bioactive compounds and their benefits to the skin. Collagen hydrolysate (CH) is one of these compounds has been studied, demonstrating potential for improvement of skin aging clinical signs. Its use as a food supplement has a long history; however, few studies have addressed the underlying purpose of CH on the cellular and molecular biology of skin cells that could elucidate clinical improvement findings. This study investigated, for the first time, the influence of CH on the extracellular matrix metabolism and proliferation of human dermal fibroblasts (HDFs) derived from chronological aged (sun-protected) and photoaged (sun-exposed) body sites, cultured in monolayer in vitro model. Breast and eyelid skin explants were used to obtain HDFs primary cultures of sun-protected and sun-exposed sites, respectively. Moreover, CH effects on the secretion of type I collagen were investigated in dermal equivalent 3D model derived from dermal matrix produced exclusively by HDFs. The findings of this study demonstrated that CH treatment did not affect cellular proliferation of either cell cultures, but notably modulated cell metabolism in monolayer model, increasing the content of dermal matrix precursor and main protein, procollagen I and collagen I, respectively. These effects were confirmed in the human dermal equivalent model. The increase in collagen content in the cultures was attributed to stimulation of biosynthesis and decreased collagen I metabolism through inhibition of metalloproteinase activity (MMP) 1 and 2. Modulation of CH in dermal metabolism did not differ between cells derived from sun-protected and sun-exposed areas, although lower concentrations of CH seemed to be enough to stimulate sun-exposed-derived HDFs, suggesting more pronounced effect in these cells. We believe that this study presents an important contribution to understanding the biological effects of CH in skin cells and viability of its use as a functional ingredient in food supplements.

Keywords: Collagen hydrolysate. Bioactive collagen peptides. Food supplements. Human dermal fibroblasts. Extracellular matrix metabolism. Proliferation. Human dermal equivalent. Dermal matrix. Skin aging. Photoaging. Primary culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Potenciais mecanismos de envelhecimento da pele	22
Figura 2 – Sequência esquemática da síntese de colágeno	25
Figura 3 – Estrutura da molécula de colágeno.....	26
Figura 4 – Aspecto ultraestrutural da pele humana fotoprottegida	29
Figura 5 – Aspecto ultraestrutural da pele fotoenvelhecida	30
Figura 6 – Remodelação da matriz extracelular dérmica na pele fotoprottegida (envelhecimento natural) e fotoexposta (fotoenvelhecimento)	34
Figura 7 – Morfologia celular do principal tipo celular da derme humana, denominado fibroblasto.	35
Figura 8 – Representação do processo de degradação enzimática da molécula do colágeno nativo para obtenção do colágeno hidrolisado.....	42
Figura 9 – Perfil de distribuição de massa molecular do colágeno hidrolisado determinado por cromatografia de permeação em gel.....	61
Figura 10 – Explantes de cultura celular para obtenção da cultura primária de fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas fotoprottegida (explante de pele de mama) e fotoexposta (explante de pele de pálpebra).	63
Figura 11 – Grupos experimentais estabelecidos neste estudo.	63
Figura 12 – Representação esquematizada do ciclo de divisão celular mostrando a intensidade de fluorescência relativa decaindo pela metade em cada geração.	67
Figura 13 – Determinação da concentração ótima de CFSE	68
Figura 14 – <i>Dot plot</i> do ensaio de proliferação pelo kit <i>Guava CellGrowth</i> , indicando a forma de expressão dos dados.	69
Figura 15 – <i>Imunoblotting</i> preliminar para assegurar a especificidade do anticorpo contra a forma nativa do colágeno I, demonstrando ausência de marcação para a forma hidrolisada do colágeno	72
Figura 16 – Bandas de proteínas detectadas por eletroforese em gel SDS-6%, em condições não-redutoras, utilizando colágeno tipo I como padrão positivo	75

Figura 17 – Representação esquemática do método de obtenção das matrizes dérmicas derivadas unicamente de fibroblastos dérmicos humanos.	80
Figura 18 – Representação esquemática do ensaio de estimulação com colágeno hidrolisado (CH) em equivalente dérmico humano	81
Figura 19 – Morfologia característica dos fibroblastos dérmicos humanos utilizados neste estudo.....	83
Figura 20 – Fotomicrografia das culturas primárias de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) utilizados neste estudo.....	84
Figura 21 – Curva de crescimento celular representativa dos fibroblastos dérmicos humanos utilizados neste estudo.....	85
Figura 22 – Confluência da monocamada celular de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs).	86
Figura 23 – Percentual da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos normais (linhagem comercial CCD-1059Sk).	88
Figura 24 – Morfologia dos fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) cultivados por 72h em situação de privação de soro fetal bovino	90
Figura 25 – Contagem do número de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) ao longo de 96h de cultura.....	92
Figura 26 – Análise <i>Dot plot</i> de citometria de fluxo do ensaio de proliferação celular por ciclos de divisão celular de fibroblastos dérmicos humanos.	93
Figura 27 – Histograma de citometria de fluxo da proliferação celular dos fibroblastos dérmicos humanos, por ciclos de divisão celular (kit <i>Guava CellGrowth</i>), referente a intensidade de fluorescência verde (CFSE).	95
Figura 28 – Proliferação celular por ciclos de divisão celular de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs).	97
Figura 29 – Histograma de citometria de fluxo da proliferação celular dos fibroblastos dérmicos humanos, por incorporação de análogo de timidina (EdU) ao DNA (<i>Click-iT EdU Flow Cytometry</i>), referente a intensidade de fluorescência verde (EdU, Alexa Fluor 488 azida).....	99
Figura 30 – Proliferação de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) no ensaio de incorporação de EdU durante a síntese de DNA.....	100

Figura 31 – Deposição de colágeno total nas culturas de fibroblastos derivados de pele humana (FDHs) ao longo de 96h de tratamento com colágeno hidrolisado.....	102
Figura 32 – Curva padrão de colágeno tipo I e percentual de recuperação de colágeno representativos para determinação da quantidade de colágeno I nas culturas de fibroblastos dérmicos humanos tratados ou não (controle) com colágeno hidrolisado.....	103
Figura 33 – Conteúdo de colágeno tipo I relativo na cultura celular de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), detectado por ELISA, após tratamento com colágeno hidrolisado por 48 h	104
Figura 34 – <i>Immunoblottings</i> representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de pró-colágeno I em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48h.	106
Figura 35 – <i>Immunoblottings</i> representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de colágeno I em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48h.....	107
Figura 36 – <i>Immunoblottings</i> representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de decorina em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48h.....	108
Figura 37 – <i>Immunoblottings</i> representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de fibrilina-1 em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48h.....	109
Figura 38 – <i>Immunoblottings</i> representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de MMP-1 em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48h.....	110
Figura 39 – Imagens de imunofluorescência por microscopia confocal de varredura a laser de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs).	112
Figura 40 – Imagens de imunofluorescência por microscopia confocal de varredura a laser de fibroblastos dérmicos humanos derivados de área fotoprotégida (FDHs-FP, mama).....	113
Figura 41 – Expressão de RNAm para colágeno I (COL1A2 RNAm) em cultura de fibroblastos dérmicos humanos após tratamento com CH nas concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL por 12, 24 e 48h.	114
Figura 42 – Curva padrão de MMP-1 utilizada para quantificar os níveis de MMP-1 no meio condicionado de cultura de fibroblastos dérmicos humanos.	115

Figura 43 – Quantidade de MMP-1 ativa no meio condicionado de cultura de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) após 48h de tratamento com concentrações de colágeno hidrolisado de 0,5 a 5,0 mg/mL.....	116
Figura 44 – Zimogramas e densitometria das bandas gelatinolíticas para determinação a atividade das MMPs -2 e -9 em meio condicionado de culturas de fibroblastos dérmicos (FDHs) tratados com colágeno hidrolisado nas concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL por 48 h.....	118
Figura 45 – Conteúdo de colágeno I secretado no meio condicionado da matriz dérmica derivada exclusivamente de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), ao longo de 22 dias..	119
Figura 46 – Ultraestrutura do equivalente dérmico humano derivado de matriz dérmica produzida exclusivamente por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs).	121
Figura 47 – Secreção de colágeno tipo I por fibroblastos dérmicos humanos no modelo 3D de equivalente dérmico humano, após 24 e 48h de tratamento com 0,5 e 5,0 mg/mL em associação ou não com vitamina C.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química percentual do colágeno hidrolisado.. 59

Tabela 2 – Composição de aminoácidos do colágeno hidrolisado 60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Envelhecimento Cutâneo	21
2.1.1 <i>Derme e Matriz Extracelular</i>	23
2.1.2 <i>Alterações no Microambiente da Matriz Extracelular Dérmica</i>	28
2.2 Heterogeneidade dos Fibroblastos	34
2.3 Suplementos Alimentares e Envelhecimento Cutâneo	39
2.4 Suplementação Oral com Colágeno Hidrolisado	40
2.4.1 <i>Colágeno Hidrolisado.....</i>	40
2.4.2 <i>Biodisponibilidade do Colágeno Hidrolisado</i>	42
2.4.3 <i>Efeitos Biológicos do Colágeno Hidrolisado</i>	44
2.4.3.1 <i>Cartilagem Articular.....</i>	44
2.4.3.2 <i>Atividade Antioxidante</i>	46
2.4.3.3 <i>Atividade Anti-hipertensiva.....</i>	46
2.4.3.4 <i>Tecido Ósseo.....</i>	47
2.4.4 <i>Efeitos Biológicos do Colágeno Hidrolisado na Pele.....</i>	49
2.5 Cultura de Fibroblastos Dérmicos Humanos <i>In vitro</i>	54
2.5.1 <i>Cultura de Células Primárias em Monocamada</i>	54
2.5.2 <i>Equivalente Dérmico: Modelo de cultura 3D.....</i>	54
3 OBJETIVOS.....	57
3.1 Objetivo Geral	57
3.2 Objetivos Específicos	57
4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 Colágeno Hidrolisado	58
4.2 Preparação do Meio de Cultura.....	61
4.3 Coleta de Material e Aspectos Éticos.....	62
4.4 Cultura Primária de Fibroblastos Dérmicos Humanos	62
4.5 Suplementação do Meio de Cultura com Colágeno Hidrolisado	63
4.6 Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) por MTT	64
4.7 Aspectos Morfológicos com Privação Total de Soro Fetal Bovino (SFB)	65

4.8 Meio condicionado	65
4.9 Proliferação Celular	66
<i>4.9.1. Número de células</i>	<i>66</i>
<i>4.9.2 Ciclos de Divisão Celular</i>	<i>66</i>
<i>4.9.3 Replicação de DNA.....</i>	<i>70</i>
4.10 Cinética de Deposição de Colágeno Total	70
4.11 Expressão Proteica de Pró-colágeno I e Colágeno I por Western Blot	71
4.12 Expressão Proteica de Decorina, Fibrilina-1 e MMP-1 por Western Blot	73
4.13 Expressão Proteica de Colágeno tipo I na Cultura Celular por ELISA	74
4.14 Sublocalização do Pró-Colágeno I por Imunofluorescência.....	76
4.15 Análise da Atividade da Colagenase (MMP-1).....	77
4.16 Atividade das Enzimas MMP-2 e -9 por Zimografia	77
4.17 Expressão gênica de colágeno I (RNAm COL1A2) por PCR em tempo real	78
4.18 Obtenção do equivalente dérmico	79
4.19 Ensaio de Estimulação com CH em Modelo 3D de Equivalente Dérmico	80
4.20 Microscopia Eletrônica de Transmissão	81
4.21 Análise Estatística	82
5 RESULTADOS	83
5.1 Culturas Primárias de Fibroblastos Dérmicos Humanos	83
5.2 Curva de Crescimento Celular	85
5.3 Viabilidade celular	87
5.4 Aspectos Morfológicos de Privação de SFB.....	88
5.5 Proliferação Celular	91
5.6 Cinética de Deposição de Colágeno Total	101
5.7 Conteúdo de Colágeno Tipo I Depositado na Cultura Celular.....	103
5.8 Expressão de Proteínas da MEC em Meio Condicionado	105
5.9 Distribuição Subcelular de Pró-Colágeno I	111
5.10 Expressão Gênica de Colágeno I (COL1A2 RNAm)	113
5.11 Atividade de MMP-1 e MMP-2 e -9 em Meio Condicionado	115
5.12 Equivalente Dérmico: Obtenção do Modelo 3D de Matriz Dérmica Humana	119
5.13 Equivalente Dérmico – Tratamento com Colágeno Hidrolisado	122
6 DISCUSSÃO	124

7 CONCLUSÃO	134
REFERÊNCIAS.....	135
ANEXOS	146
A – Imunofluorescência evidenciando a estrutura celular (microtúbulos) de fibroblastos dérmicos humanos (linhagem CCD1056sK, ATCC), após tratamento com colágeno hidrolisado (CH) nas concentrações de 0,5 mg/mL (CH0,5) e 5,0 mg/mL (CH0,5) em comparação às células sem tratamento (controle, CO).	146
B – Collagen Hydrolysate Intake Increases Skin Collagen Expression and Suppresses Matrix Metalloproteinase 2 Activity.	147

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem ocorrido interesse crescente nos benefícios da suplementação oral com nutrientes e compostos bioativos de alimentos. Alguns destes compostos têm mostrado capacidade de modular funções celulares e metabolismo da pele, sendo potencialmente eficazes para amenizar e/ou retardar os sinais do envelhecimento cutâneo. O colágeno hidrolisado (CH) está entre os compostos bioativos que têm sido estudados por seus potenciais benefícios biológicos sobre o metabolismo da pele. Contudo, até o momento, poucos estudos têm sido endereçados na investigação dos efeitos subjacentes à suplementação com CH na biologia celular e molecular de fibroblastos dérmicos.

Os fibroblastos são considerados o principal tipo celular que sintetiza matriz extracelular (MEC) nos tecidos conjuntivos. O processo de envelhecimento natural e fotoenvelhecimento da pele causam alterações na morfologia celular, potencial proliferativo, biossíntese de proteínas da MEC e resposta a fatores de crescimento e citocinas. Consistente com a ideia de que fibroblastos cultivados *in vitro* têm regulação coordenada e síntese de MEC característicos de seus locais de origem, com o melhor de nosso conhecimento, nada se sabe sobre os efeitos potenciais do CH sobre o metabolismo e proliferação de cultura de fibroblastos dérmicos de diferentes locais anatômicos. Estimulados pela possibilidade de aquisição de novos conhecimentos nesta área, nós investigamos os efeitos do CH na modulação de respostas celulares e moleculares de fibroblastos dérmicos derivados de áreas fotoexposta e fotoprottegida, cultivados em modelo de monocamada. Além disto, foram investigados os efeitos da suplementação com CH na secreção da principal proteína da MEC, colágeno tipo I, em modelo de cultura tridimensional (3D) de equivalente dérmico derivado de matriz produzida exclusivamente por fibroblastos dérmicos humanos. Acreditamos que este estudo é uma contribuição importante para compreensão dos efeitos biológicos do CH nas células da pele e viabilidade do seu uso como ingrediente funcional de suplementos alimentares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Envelhecimento Cutâneo

O envelhecimento é um processo biológico complexo e contínuo que se caracteriza por alterações celulares e moleculares, com diminuição progressiva da capacidade de homeostase do organismo, levando à senescência e morte celular programada (apoptose). É variável de um indivíduo para outro, bem como de órgão para órgão. (Bagatin, 2008)

A pele humana, assim como outros órgãos, sofre o processo natural de envelhecimento como consequência da passagem do tempo. Além disto, a pele, ao contrário de outros órgãos, está exposta direta e continuamente aos danos ambientais, principalmente a radiação ultravioleta (UV) (Naylor et al., 2011).

Com base em suas causas, o envelhecimento cutâneo é classificado em dois processos independentes, simultâneos e distintos em aspectos clínicos e biológicos: (a) envelhecimento natural, conhecido como envelhecimento intrínseco ou cronológico e (b) envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento, provocado pelos danos causados pela exposição solar crônica. Portanto, o envelhecimento natural da pele é característico de áreas não expostas rotineiramente ao sol, ou seja, áreas fotoprotégidas; enquanto que o fotoenvelhecimento, como o próprio nome sugere, é característico de áreas expostas ao sol ao longo da vida, ou seja, áreas fotoexpostas (Makrantonaki, Zouboulis, 2007). Ambos os processos são cumulativos e, assim sendo, os danos biológicos ocasionados pela radiação UV no fotoenvelhecimento são sobrepostos ao envelhecimento natural, ocasionando alterações drásticas e conduzindo ao envelhecimento precoce (Calleja-Agius et al., 2007; Montagner, 2009; Watson et al., 2014) (**Figura 1**).

Figura 1 – Potenciais mecanismos de envelhecimento da pele. A pele está simultaneamente sujeita a um processo de envelhecimento intrínseco (cronológico, lado esquerdo da figura) e a um processo de envelhecimento extrínseco, principalmente como resultado da exposição à radiação ultravioleta (fotoenvelhecimento, lado direito da figura). Resultados destes processos podem ser verificados nos danos causados ao DNA mitocondrial, no aumento da produção de espécies reativas (radicais livres), no encurtamento dos telômeros e acúmulo de células senescentes com alteração do fenótipo secretor, comprometendo a remodelação da MEC. Em contraste, os mecanismos que conduzem ao fotoenvelhecimento da pele são causados, principalmente, pelo acúmulo da radiação UV que aumenta a expressão de proteases e pode danificar diretamente biomoléculas cromóforas e, ainda, induzir a produção de radicais livres.

(Adaptado de Naylor et al., 2011)

A maior parte das alterações que ocorrem no envelhecimento cutâneo pode ser atribuída à ação de radicais livres quando as defesas naturais deixam de ser eficientes ou tornam-se insuficientes e começam a serem observadas depleções funcionais, processo denominado “estresse oxidativo” (Scotti, Velasco, 2003).

Existem várias teorias e mecanismos postulados na tentativa de elucidar o processo de envelhecimento cutâneo, tais como: (a) encurtamento e ruptura dos

telômeros, (b) radicais livres e estresse oxidativo, (c) mutações no gene P53, (d) erros e mutações no DNA, (e) glicação e (f) danos epidérmicos e dérmicos. Embora algumas destas teorias estejam mais relacionadas a apoptose e neoplasias, enquanto outras aos sinais clínicos do envelhecimento, elas não são excludentes, pelo contrário, são complementares (Scotti, Velasco, 2003; Teixeira, Guariento, 2010).

Tanto no envelhecimento intrínseco quanto no fotoenvelhecimento, alterações estruturais e funcionais importantes ocorrem na epiderme, junção derme-epiderme e derme. No entanto, as modificações mais relevantes relacionadas aos sinais clínicos do envelhecimento resultam do declínio metabólico da derme, além de mudanças morfológicas, físicas e bioquímicas que ocorrem no tecido conjuntivo dérmico (Fisher et al., 1997, 2000; Fligel et al., 2003; Naylor et al., 2011).

2.1.1 Derme e Matriz Extracelular

A derme é a camada da pele localizada imediatamente sob a epiderme, constituída por tecido conjuntivo. O principal tipo celular do tecido conjuntivo dérmico é denominado fibroblasto, responsável pela produção e modulação da MEC (Carneiro, Junqueira, 2013). A integridade estrutural e função da derme são primariamente dependentes da sua MEC, em particular da organização e estrutura das fibras de colágeno (80% do peso seco da pele adulta consiste em colágeno) (Calleja-Agius et al., 2007).

A MEC é composta por proteínas alongadas e fibrosas como o colágeno e a elastina embebidos em um fluido altamente hidrofílico, constituído de glicosaminoglicanas e proteoglicanas e diferentes tipos de metaloproteinases de matriz (MMPs) (Bruni, 2004).

O colágeno tipo I é o principal componente estrutural da MEC dérmica, responsável pela resistência mecânica da pele. O colágeno é primeiramente sintetizado pelos fibroblastos na sua forma precursora solúvel, chamada pró-colágeno, o qual é secretado e sofre ação proteolítica para formar as fibras de

colágeno. Durante o processo de síntese ocorrem modificações pós-traducionais, como hidroxilação e glicosilação, e as cadeias se agregam em forma de tripla hélice. A molécula de pró-colágeno assume aparência de corda arrebitada, cujas extremidades foram desfiadas. Essas extremidades não helicoidais são peptídeos adicionais, que impedem a agregação espontânea das moléculas em fibras no interior das células (Alberts et al., 2008; Bruni, 2004). As moléculas de pró-colágeno são liberadas por exocitose e, assim que atingem o meio extracelular, sofrem a ação de enzimas proteolíticas que clivam os peptídeos de suas extremidades, resultando numa molécula menor, o tropocolágeno. As moléculas de tropocolágeno recém-formadas se associam espontaneamente, num arranjo ordenado, controlado pelos próprios fibroblastos que as compactam em forma de fibras (Bruni, 2004; Carneiro, Junqueira, 2013) (**Figura 2**).

Figura 2 – Sequência esquemática da síntese de colágeno. (Gartner, Hiatt, 1999).

A formação de fibrilas a partir do pró-colágeno I se dá no espaço extracelular, pela tendência desses colágenos de se agruparem, formando ligações covalentes em suas extremidades, após a clivagem dos peptídeos terminais. As unidades de tropocolágeno, agrupadas paralelamente, dão origem às fibrilas colágenas que, por sua vez, se associam formando as fibras colágenas (Alberts et al., 2008).

A fibra típica de colágeno I constitui-se de empacotamento de moléculas de tropocolágeno que se caracteriza por ser longa, rígida e formada por três cadeias polipeptídicas de aproximadamente 1000 aminoácidos cada uma, chamadas cadeias α (subdivididas em α_1 , α_2 , α_3). O colágeno I contém duas cadeias α iguais e uma diferente e sua fórmula molecular é descrita como $[(\alpha_1)I]_2\alpha_2(I)$. As cadeias α se

entrelaçam umas sobre as outras, num arranjo que lembra uma corda torcida formando, portanto, uma tripla hélice (Bruni, 2004).

Cada uma das cadeias α consiste em cerca de 330 sequências repetitivas de aminoácidos Glicina (Gly) – X – Y, em que X e Y podem ser qualquer aminoácido, mas frequentemente X é prolina (Pro) e Y, hidroxiprolina (Hyp). A glicina é o menor dos aminoácidos, possui cadeias laterais compostas apenas por hidrogênio e está presente a cada três posições nas cadeias polipeptídicas do colágeno, possibilitando a união estável dessas cadeias para uma conformação de tripla hélice (Bruni, 2004) (**Figura 3**).

Figura 3 – Estrutura da molécula de colágeno (Alberts et al., 2008).

As fibras elásticas, compostas por elastina e proteínas microfibrilares, também são componentes importantes da MEC (constituem cerca de 5% da derme) e conferem resiliência e elasticidade à derme, equilibrando as propriedades biomecânicas da pele (elasticidade e firmeza). Essas moléculas são sintetizadas pelos fibroblastos na forma de fibras delgadas, longas e enoveladas, que se ramificam por todo o tecido (Bruni, 2004).

A fibra elástica é formada por elastina, uma glicoproteína altamente hidrofóbica cujas moléculas se enovelam, prendendo-se entre si por ligações covalentes em suas extremidades. As moléculas de elastina são cobertas por grande quantidade de microfibrilas elásticas, as quais são constituídas por várias glicoproteínas, mas a mais importante é a fibrilina, uma glicoproteína de massa molecular elevada. A fibrilina é essencial para a montagem das fibras elásticas, pois as moléculas de elastina só são depositadas sobre as estruturas das microfibrilas que se formam previamente (Alberts et al., 2008).

Além das fibras elásticas e do colágeno, proteoglicanas também compõem a MEC, formando ligações entre a rede de colágeno e elastina, e asseguram a turgidez da pele devido a sua capacidade de ligação de água. Proteoglicanas são compostas por um núcleo proteico contendo uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanas. A decorina é uma proteoglicana pequena rica em leucina e tem papel importante na fibrilogênese que ocorre no meio extracelular, regulando a espessura das fibrilas de colágeno, pois se associam à superfície dessas fibrilas, inibindo a adição de novas moléculas de colágeno e impedindo a fusão entre elas (Bruni, 2004; El-Domyati et al. 2002; Vuillermoz et al., 2005). Proporção adequada de decorina e colágeno se faz necessária para formação de fibras resistentes e funcionais. Alterações nesta proporção parecem ter impacto negativo na formação de fibras colágenas e, posteriormente, na estrutura geral da MEC dérmica. Esta hipótese é suportada pela descoberta de que a interrupção da expressão de decorina em ratos *knockout* resultou na flacidez e fragilidade da pele, apresentando rede de fibras colágenas

menos densas e desordenadas, com variação de forma e tamanho em relação às fibras colágenas nos ratos selvagens (Danielson et al., 1997).

A renovação normal do colágeno é mediada pelas MMPs, família de proteinases contendo zinco que especificamente degradam as proteínas da MEC (van Doren, 2015). Na pele humana, a MMP-1 é a principal protease capaz de iniciar a fragmentação de colágenos fibrilares nativos, predominantemente dos tipos I e III (Fisher et al., 2009). MMP-1 cliva fibrilas de colágeno em um único sítio dentro de sua tripla hélice central. Uma vez clivado por MMP-1, o colágeno pode ser ainda posteriormente degradado pelas MMP-3 e MMP-9. Fibras de colágeno contêm muitas ligações cruzadas covalentes, resistentes à clivagem proteolítica. Consequentemente, níveis constitutivamente elevados de MMPs ao longo de décadas resultam em danos ao tecido conjuntivo dérmico, devido à acumulação de fragmentos de colágeno reticulado, prejudicando a estrutura e função da MEC dérmica (Varani et al., 2000).

2.1.2 Alterações no Microambiente da Matriz Extracelular Dérmica

A diminuição do conteúdo de colágeno tipo I é o principal marcador do envelhecimento cutâneo, ocasionando, dentro outros, a perda de elasticidade e firmeza da pele e, consequentemente, o aparecimento de rugas. Com o avanço da idade, a pele passa a apresentar um importante declínio do conteúdo de colágeno. A literatura científica relata redução de cerca de 1% ao ano do conteúdo de colágeno durante o período fértil da mulher, podendo atingir mais de 30% no período pós-menopausa (Affinito et al., 1999; Brincat et al., 1987; Castelo-Branco et al., 1992). Estudo realizado por Affinito e colaboradores (1999) demonstrou que a pele de mulheres pós-menopausadas apresentou diminuição de 22% do colágeno I, em comparação com mulheres pré-menopausadas.

A fragmentação do colágeno é característica proeminente na pele envelhecida. Esta fragmentação prejudica ambas as propriedades mecânicas da pele e funções

celulares (Varani, Spearman, 2001). Na derme jovem, fibras de colágeno longas, bem-organizadas, intactas e compactadas são abundantes (**Figura 4**). Ao contrário, na derme envelhecida, as fibras de colágeno estão fragmentadas, desorganizadas e espaçadas, resultando na aparência de um espaço aberto amorfo (**Figura 5**). Análise bioquímica quantitativa revela que a quantidade de colágeno fragmentado é 4,3 vezes superior na derme envelhecida (>80 anos) comparada com a derme jovem (21-30 anos) *in vivo* (Fisher et al., 2002).

Figura 4 – Aspecto ultraestrutural da pele humana fotoprottegida. (A, B) Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrando a distribuição uniforme das fibras colágenas e pequenos feixes de fibras colágenas (seta). (C, D) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando (C) fibroblasto cercado por MEC e em contato com fibras colágenas intactas, feixes de fibras colágenas em ambas as orientações longitudinal e transversal, (D) bem como a presença de processos celulares (setas) que são sítios frequentes de contato com fibras colágenas intactas. (Fligiel et al., 2003).

Figura 5 – Aspecto ultraestrutural da pele fotoenvelhecida. (A, B) Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrando fibras colágenas fragmentadas. (C, D) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando ausência de fibras colágenas intactas, presença de matriz destruída e grande quantidade de material amorfo. (Fligiel et al., 2003).

Atualmente, sabe-se que o aumento da expressão e da atividade das MMPs é, sem dúvida, responsável por grande parte da redução do colágeno que ocorre durante o envelhecimento natural e fotoenvelhecimento, porém a concomitante redução na síntese de colágeno também contribui notavelmente (Fisher et al., 1996, 1997; Varani et al., 2000).

De acordo com Chung et al., (2001), o balanço entre a síntese e a degradação de colágeno, que resulta na deficiência desta proteína, é diferente na pele fotoprottegida e na pele fotoexposta. Estes investigadores afirmam que o envelhecimento natural diminui a síntese de colágeno e aumenta a expressão de MMPs, enquanto o fotoenvelhecimento resulta em aumento da síntese de colágeno e maior expressão de MMPs na pele humana *in vivo*. Contrariamente, Varani et al., (2001) reportou que a expressão de ambos os RNAm e proteína de pró-colágeno I foi menor na pele fotoenvelhecida (do antebraço) comparada com a pele fotoprottegida

(do quadril) do mesmo indivíduo *in vivo*. Segundo Chung et al., (2001), Varani e colaboradores (2001) não excluíram a possibilidade de que a pele do quadril poderia produzir constitutivamente mais pró-colágeno do que a pele do antebraço. No estudo de Chung et al., (2001), os investigadores confirmaram, *in vivo*, que as áreas fotoprotetida (antebraço) e fotoexposta (parte interna do braço) da pele jovem mostraram os mesmos níveis de expressão de RNAm de pró-colágeno, porém observaram mudanças seriadas da expressão de RNAm de pró-colágeno na pele envelhecida tanto na área fotoprotetida (nádegas) quanto na área fotoexposta (face), justificando suas afirmações.

Chung et al., (2001) também demonstraram maior expressão da proteína MMP-1 e maior atividade de MMP-2 na derme fotoenvelhecida, em comparação com a derme fotoprotetida dos mesmos indivíduos, degradando o pró-colágeno recém-secretado pelos fibroblastos e reduzindo a expressão desta proteína. Os autores concluíram que a deficiência severa de colágeno na pele fotoenvelhecida é resultado da degradação de pró-colágeno recém-secretado devido a maior quantidade de MMP.

Kligman e colaboradores, em 1989, demonstraram que a exposição crônica a radiação UV resultou no aumento da síntese de colágeno total, da 4ª a 16ª semana, na pele de camundongos sem pelos, retornando aos níveis controles na 20ª semana. A diminuição do colágeno total, a partir da 20ª semana, pode ser resultado da degradação causada pela MMP que excedeu a capacidade dos fibroblastos irradiados em sintetizar colágeno novo. Resultados semelhantes foram encontrados por Starcher et al., (1999), também em camundongos sem pelos. Os níveis de RNAm de colágeno na pele aumentaram grandemente em resposta à radiação UV crônica, porém não foi observado aumento nos níveis da proteína, pelo contrário, observaram ligeira tendência de diminuição do conteúdo da proteína colágeno. Os autores justificaram os resultados sugerindo que ou o nível de mensagem elevado não se traduziu em aumento da produção de colágeno, ou as enzimas proteolíticas degradaram o colágeno tão rápido quanto foi produzido.

A radiação UV ativa receptores para fator de crescimento na superfície dos fibroblastos e desencadeia a produção de citocinas. A ativação desses receptores estimula vias de sinalização que induzem a transcrição dos fatores nucleares kappa B (NFkB) AP-1 (este formado pelas proteínas c-Jun + c-Fos). A ativação do NFkB induz a apoptose dos queratinócitos, enquanto a ativação do AP-1 estimula os genes de transcrição das MMPs que são secretadas pelos queratinócitos e fibroblastos. Nos fibroblastos, o AP-1 também inibe a expressão do RNAm para o pró-colágeno tipo I. O reparo imperfeito do dano dérmico prejudica a integridade funcional e estrutural da matriz extracelular.

A diminuição do conteúdo de colágeno, bem como a fragmentação das fibras colágenas, prejudica notavelmente a relação entre os fibroblastos e a MEC, ocasionando mudanças na arquitetura do citoesqueleto dos fibroblastos. Estas mudanças rompem a unidade fibronectina-membrana plasmática-citoesqueleto, o que explica as mudanças metabólicas e secretórias, a disfunção da unidade MEC-célula, e também as mudanças estruturais observadas no envelhecimento (Reed et al., 2001; Wang et al., 1994). Tensão mecânica e formato celular são determinantes críticos da função celular. Na derme humana jovem, fibroblastos aparecem achatados e espalhados e estão em contato íntimo com as fibras de colágeno. Os fibroblastos na derme envelhecida têm aparência colapsada, com pouco citoplasma e sem associação direta com as fibras de colágeno que se apresentam fragmentadas (Fisher et al., 2002; Varani et al., 2006). Análises morfométricas quantitativas revelam que o contato dos fibroblastos com as fibras de colágeno está reduzido em 80% na derme envelhecida *in vivo* (Varani et al., 2006).

Embora as alterações no metabolismo do colágeno sejam os principais achados da pele envelhecida, mudanças no conteúdo e morfologia de glicosaminoglicanas, proteoglicanas e fibras elásticas também contribuem para os sinais clínicos de envelhecimento (Contet-Audonneau et al., 1999). A remodelação da matriz extracelular dérmica nas peles fotoprottegida e fotoexposta está representada na **Figura 6**. De acordo com Makrantonaki e Zouboulis (2007), a exposição à radiação

UV induz a atividade transcricional do gene da elastina por um aumento de quatro vezes na atividade do promotor de elastina e diminui a expressão de fibrilina-1, resultando em densa deposição das fibras elásticas distróficas e truncadas.

Com o avanço da idade, o conteúdo de glicosaminoglicanas diminui e a pele torna-se desidratada, prejudicando a movimentação celular e a nutrição, com perda notável da maleabilidade observada na pele jovem. Além das alterações resultantes do envelhecimento natural, há mudanças drásticas decorrentes da exposição solar. Pele de áreas fotoexpostas apresenta grandes quantidades de material elástico anormal na derme superficial e, paradoxalmente, conteúdo de glicosaminoglicanas elevado depositado sobre este material, constituindo o que é conhecido por elastose solar (Makrantonaki, Zouboulis, 2007; Naylor et al., 2011). Apesar do conteúdo aumentado, a distribuição das glicosaminoglicanas na pele fotoexposta é anormal e não funcional, inversamente ao observado na pele fotoprotegida, na qual as glicosaminoglicanas estão difusamente distribuídas na derme em torno e entre as fibras colágenas, e sua concentração é maior logo abaixo da epiderme e diminui em direção à derme reticular (Bernstein et al., 1996; Naylor et al., 2011).

Deste modo, a MEC representa um agregado de macromoléculas cuja integridade estrutural e funcional é de importância vital para a manutenção da arquitetura, do desenvolvimento e das funções específicas da pele.

Figura 6 – Remodelação da matriz extracelular dérmica na pele fotoprotégida (envelhecimento natural) e fotoexposta (fotoenvelhecimento). Colágenos, fibras elásticas e glicosaminoglicanas (visualizado pela coloração com vermelho de picrossírius, elastina de Miller e ácido periódico, respectivamente) sofrem significativa remodelação na pele fotoprotégida e fotoexpostas (jovem: 23 anos, interior do braço; idoso fotoprotégido: 75 anos, nádega; idoso fotoexposto: 75 anos, antebraço). (Adaptado de Naylor et al., 2011).

2.2 Heterogeneidade dos Fibroblastos

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo de majoritariamente origem mesodérmica, com função de formar a substância fundamental amorfa e as fibras da MEC (Carrascal, 2001; Doljanski, 2004; Kanitakis, 2002), e desempenham funções importantes na regulação estrutural e fisiológica dos tecidos (Mine et al., 2008;

Sorrell, 2009). Os fibroblastos apresentam morfologia fusiforme, com numerosos prolongamentos citoplasmáticos que se estendem entre as fibras do tecido conjuntivo, possuem um núcleo oval com cromatina fina e nucléolo evidente e, no citoplasma, apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, indicando grande atividade de síntese proteica (**Figura 7**) (Carrascal, 2001; Kanitakis, 2002).

Figura 7 – Morfologia celular do principal tipo celular da derme humana, denominado fibroblasto. (https://www.med.umich.edu/DERM/research/res_skinaging.shtml)

Outras funções dos fibroblastos estão relacionadas com: (a) participação no processo de cicatrização de feridas (Darby, Hewitson, 2007; Werner et al., 2007); (b) participação ativa na resposta inflamatória, interagindo com as células dendríticas e outras células do sistema imune; (c) angiogênese, processo dinâmico que ocorre tanto em condições fisiológicas (cicatrização de feridas e crescimento embrionário), como em condições patológicas (crescimento tumoral), e (e) reepitelização por dupla sinalização parácrina, em que os queratinócitos, através de liberação IL-1, induzem os fibroblastos a produzir e secretar fatores de crescimento e citocinas, nomeadamente o fator de crescimento dos queratinócitos e IL-6 que, por sua vez, estimulam a proliferação celular dos queratinócitos (Sorrell, 2009; Werner et al., 2007).

Os fibroblastos compreendem uma população de células heterogênea e dinâmica (Driskell, Watt, 2015) que sintetiza e secreta um conjunto de moléculas precursoras da MEC, particularmente da substância fundamental (glicosaminoglicanas e proteoglicanas), colágeno e elastina, que contribuem para a sustentação estrutural dos tecidos (Kanitakis, 2002; Sorrell, 2009).

Sabe-se que fibroblastos de diferentes regiões anatômicas exibem fenótipos característicos, denominados diferenciação topográfica, a qual é mantida quando os fibroblastos são cultivados *in vitro*. Segundo Nolte et al., (2008), as diferenças fenotípicas entre fibroblastos manifestam-se de diferentes formas, incluindo produção e organização da MEC, assim como secreção de fatores de crescimento. Ainda de acordo com estes autores, fibroblastos dérmicos são populações de células dinâmicas e diversas.

Estudos demonstraram a diversidade na expressão topográfica para os genes envolvidos na síntese de matriz extracelular, crescimento e diferenciação, migração celular, bem como genes envolvidos nas síndromes genéticas de fibroblastos derivados de diferentes regiões anatômicas. Curiosamente, fibroblastos expressam, *in vitro*, genes da MEC apropriados e característicos de seus sítios anatômicos de origem (Chang et al., 2002; Rinn et al., 2006).

A diferenciação topográfica entre fibroblastos derivados de locais diferentes é tão notória que a mesma é a principal fonte de variação na comparação da expressão gênica de fibroblastos em cultura que variam em fonte doadora, local de origem, número de passagem, e mesmo a presença ou ausência de soro (Chang et al., 2002).

A pele, devido à sua acessibilidade, é um dos órgãos mais bem estudados no que diz respeito à diversidade dos fibroblastos. Contudo, outros órgãos e tecidos também já foram estudados neste sentido (Das et al., 2002; Koumas et al., 2002; Van Beurden et al., 2003). Em 1962, Castor¹ e colaboradores apud Chang et al., (2002) alertaram para a heterogeneidade dos fibroblastos *in vitro*, baseando-se nas diferenças metabólicas entre fibroblastos provenientes de diferentes tecidos. Recentemente, estudos realizados por Chang et al., (2002) caracterizaram o perfil de expressão genética de fibroblastos provenientes de diferentes locais anatômicos, demonstrando a existência de padrões transcricionais distintos e característicos, que se mantêm *in vitro*, após os fibroblastos serem isolados da influência de outros tipos de células. Adicionalmente, estes investigadores também demonstraram que esta diferenciação topográfica se mantém ao longo das passagens celulares, isto é, que os fibroblastos apresentam memória posicional (Chang et al., 2002; Driskell, Watt, 2015).

Além da heterogeneidade relativa ao posicionamento anatômico, os fibroblastos de um mesmo tecido não constituem uma população homogênea. Efetivamente, fibroblastos dérmicos podem ser basicamente agrupados em duas subpopulações bem definidas de acordo com a sua localização na derme, sendo uma referente à derme papilar e outra à derme reticular. Estas duas subpopulações apresentam diferenças fenotípicas que se manifestam na produção e organização da MEC, na produção de fatores de crescimento e citocinas, e na participação em respostas inflamatórias (Sorrell, 2004 a,b, 2009). Sorrell e Caplan (2004a) revisaram diferenças entre fibroblastos papilares e fibroblastos reticulares, destacando a diferença na produção de moléculas da MEC destas duas populações celulares

¹ Castor CW, Prince RK, Dorstewitz EL. Characteristics of human "fibroblasts" cultivated in vitro from different anatomical sites. Lab Invest. 1962;11:703-13.

distintas. Segundo os autores, a proteoglicana versicana é produzida em níveis baixos por fibroblastos papilares, enquanto fibroblastos reticulares produzem níveis elevados desta molécula. Em contraste, decorina é produzida em níveis elevados por fibroblastos papilares e em quantidades pequenas por fibroblastos reticulares.

Diversidade de características tem sido relatada em fibroblastos dérmicos derivados de diferentes locais do corpo, que devem ser considerados na triagem de ingredientes farmacológicos ou alimentícios capazes de modular as propriedades celulares. O envelhecimento cutâneo intrínseco, bem como o fotoenvelhecimento, causam alterações na morfologia celular, no potencial proliferativo, na biossíntese da MEC e na resposta a fatores de crescimento e citocinas, que podem aparecer quando as células são cultivadas *in vitro*. Há evidências de que as diferenças na capacidade de sintetizar as proteínas da MEC entre os fibroblastos derivados de áreas de pele protegida e exposta são mantidas *in vitro*. Chung et al., (1996) demonstraram que fibroblastos dérmicos humanos cultivados a partir de fragmentos de pele de área fotoexposta mostraram proliferação e síntese de colágeno aumentados em comparação com os cultivados a partir de fragmentos de pele de área fotoprotegida. Brinckmann et al., (1995) identificaram diferenças na proporção de colágeno I e III sintetizado por fibroblastos derivados de pele fotoprotegida e fotoexposta cultivados *in vitro*. Além disso, Bernstein et al., (1996) investigaram a expressão de RNAm de versicana e decorina em culturas de fibroblastos derivados de fragmentos de pele fotoexposta e fotoprotegida e encontraram aumento significativo de RNAm de versicana nas culturas derivadas de pele fotoexposta, enquanto níveis de RNAm de decorina foram significativamente menores nestas culturas.

Applegate e Frenk (1995) mostraram que os fibroblastos e queratinócitos de pele derivada dos locais de pele fotoenvelhecida apresentaram níveis mais elevados da proteína ferritina do que as células derivadas de áreas fotoprotegidas, sugerindo resposta adaptativa de células expostas a danos externos crônicos. Finalmente, Bernstein e colegas (1994) demonstraram aumento dos níveis de RNAm de elastina e

fibrilina em fibroblastos derivados de fragmentos de pele fotoexposta comparados com os controles de áreas fotoprotegidas.

2.3 Suplementos Alimentares e Envelhecimento Cutâneo

Pesquisas científicas com os chamados “nutracêuticos” e “alimentos funcionais” têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Os nutracêuticos (termo introduzido em 1989 por Stephen DeFelice a partir da junção dos conceitos de Nutrição e Farmacêutica) são compostos bioativos isolados dos alimentos, capazes de influenciar na promoção da saúde, prevenção e tratamento de doenças (Vasconcelos, 2010). O termo “alimento funcional” é definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999) como alimentos ou ingredientes dos alimentos (nutriente ou não nutriente) capazes de exercer papel metabólico ou fisiológico no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (ANVISA, 1999).

A mais nova tendência envolvendo nutrição e pele tem recebido destaque especial, devido aos efeitos benéficos de nutrientes e compostos bioativos no processo de envelhecimento cutâneo.

Durante a última década, progresso substancial foi feito na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que provocam o envelhecimento da pele. Em paralelo, a comunidade científica avançou nas investigações de nutrientes e ingredientes alimentares e seus efeitos na modulação do metabolismo cutâneo (Boelsma et al., 2003; Bouilly-Gauthier et al., 2010; Cosgrove et al., 2007; Draelos, 2010; Heinrich et al., 2007; Izumi et al., 2007; Morganti, 2009; Palombo et al., 2007; Skovgaard et al., 2006; Udompataikul et al., 2009), inclusive investigando a aplicação da nutrigenômica na saúde da pele (Subbiah, 2010). Esse conhecimento proporcionou novas oportunidades para o desenvolvimento de terapias antienvelhecimento, incluindo o uso de suplementos orais. Atualmente, o interesse é

crecente no uso de suplementos alimentares devido aos seus efeitos benéficos para a saúde da pele.

Ingredientes capazes de estimular e/ou regular o metabolismo de fibroblastos senescentes e/ou quiescentes, a fim de elevar a quantidade dos compostos constituintes da MEC dérmica, tornaram-se alvo de pesquisas científicas e estratégias para combater o envelhecimento cutâneo (Zague, 2008). No entanto, esta classe de produtos não encontra uma definição na legislação de muitos países e, atualmente, apenas alguns têm feito progressos notáveis. Prevê-se que os avanços tecnológicos na indústria alimentícia, em conjunto com estudos pré-clínicos e clínicos, poderão garantir a credibilidade das alegações dos alimentos funcionais relacionadas aos benefícios cutâneos (Zague, 2008).

Pesquisadores têm estudado diversos hidrolisados proteicos e seus efeitos biológicos. Em particular, os efeitos do CH têm sido relatados na literatura há algumas décadas e, devido à semelhança bioquímica com o colágeno do tecido conjuntivo, sugere-se que a ingestão de CH possa ter efeitos benéficos, implicando na sua utilização em suplementos alimentares e preparações farmacêuticas.

2.4 Suplementação Oral com Colágeno Hidrolisado

2.4.1 Colágeno Hidrolisado

Colágeno hidrolisado é um suplemento alimentar seguro e biodisponível, composto por mistura de peptídeos de colágeno com massa molecular (MM) reduzida (~3-6 kDa) derivados da degradação enzimática do colágeno nativo da pele de animais (comumente bovino, suíno ou de peixe). O processo industrial de obtenção do CH é complexo e de múltiplas etapas, incluindo hidrólise enzimática, porém primariamente consiste na transformação do colágeno nativo, insolúvel e não digerível, em um produto solúvel e digerível (Djagny, et al., 2001; Nemati, et al., 2004).

O CH possui aprovação pela ANVISA, como um alimento/novo ingrediente. Ele vem sendo utilizado como alimento desde os tempos medievais. A primeira descrição que se conhece dos efeitos benéficos da ingestão de derivados hidrolisados de colágeno por humanos é do ano de 1175, quando S. Hildegard escreveu que comer “caldo de cartilagem bovina” (caldo de mocotó) melhorou as condições das articulações, reduzindo a dor (Hildegard², 1175 apud Moskowitz, 2000). A primeira produção comercial de gelatina se deu na Holanda, perto de 1685 (Moskowitz, 2000). O consumo do CH vem aumentando consideravelmente nos últimos anos na Europa, Estados Unidos, Ásia e América do Sul e, por isso, tem despertado o interesse acadêmico pela comprovação de sua eficácia bem como mecanismo subjacente a seus efeitos.

Há um consenso de que os efeitos biológicos promovidos pelo colágeno estão relacionados com a ingestão de sua forma hidrolisada (Zague et al., 2011). A hidrólise enzimática dá origem a peptídeos de colágeno biologicamente ativos que têm demonstrado diversos efeitos. No entanto, nem todos os colágenos hidrolisados são iguais, pois a composição dos peptídeos pode variar de acordo com a fonte de colágeno e com a tecnologia de hidrólise enzimática utilizada para obtê-los (Liu et al., 2015). O uso de enzimas não específicas, como a alcalase, cliva aleatoriamente a molécula do colágeno nativo gerando peptídeos não específicos e variados. Ao contrário, a utilização de enzimas específicas bem como hidrólise enzimática sequenciada cliva pontos específicos da molécula do colágeno, gerando combinações específicas de peptídeos com atividades biológicas diferenciadas (Liu et al., 2015). A **Figura 8** ilustra resumidamente o processo de obtenção do CH. De acordo com Schadow et al., (2013), CHs obtidos de diferentes fontes e processos de hidrólise variam em relação ao perfil de distribuição de peso molecular, peso molecular médio e atividade biológica.

² The nutritional therapy of St. Hildegard: recipes, cures and diet. 3rd ed. ISBN 3-7626-0383-9. Freiburg, Germany, Verlag Hermann Bauer KG.

Figura 8 – Representação do processo de degradação enzimática da molécula do colágeno nativo para obtenção do colágeno hidrolisado. Processo complexo e de múltiplas etapas que engloba a degradação térmica e química do colágeno nativo, seguido da hidrólise enzimática que resulta em combinações de peptídeos de colágenos que constituem o colágeno hidrolisado.

2.4.2 Biodisponibilidade do Colágeno Hidrolisado

A biodisponibilidade de compostos da dieta é um fator limitante para eficácia em diferentes tecidos biológicos. De acordo com Richelle et al., (2006), biodisponibilidade é definida como a quantidade relativa de compostos bioativos oriundos da dieta que atravessa a barreira intestinal, atinge a circulação sanguínea e está disponível para os processos metabólicos ou armazenamento no corpo. Portanto, para serem biodisponíveis, os compostos devem atravessar a barreira intestinal, atingir a circulação sanguínea e ser distribuído aos tecidos, inclusive a pele.

A biodisponibilidade do CH, após a administração oral em animais e humanos, tem sido descrita na literatura científica. Geralmente e equivocadamente, acredita-se que o CH é totalmente hidrolisado em aminoácidos livres no trato gastrointestinal antes de serem absorvidos na circulação sanguínea. Entretanto, cada vez mais evidências científicas indicam que o CH, além de aminoácidos livres, também é absorvido na forma de peptídeos (Iwai et al., 2005; Oesser et al., 1999; Ohara et al., 2007; Shigemura et al., 2011; Sugihara et al., 2012; Watanabe-Kamiyama et al.,

2010). E estudos ainda revelam que os peptídeos de CH após serem absorvidos, são distribuídos e acumulados em diferentes tecidos, como pele e cartilagem (Kawaguchi et al., 2012; Oesser et al., 1999).

Oesser et al., (1999) investigaram o tempo de absorção do CH e sua posterior distribuição em vários tecidos em modelo animal, por meio do CH marcado radioativamente [^{14}C]-CH. Noventa e cinco por cento do CH administrado oralmente foram absorvidos dentro das primeiras 12 h. A radioatividade na pele atingiu o pico máximo após 12 h da administração do CH permanecendo relativamente elevada por 96 h. Neste mesmo estudo, os investigadores mostraram que peptídeos com MM variando de 1 a 6 kDa foram capazes de transitar da mucosa a serosa intestinal, sugerindo que peptídeos do CH podem ser absorvidos na forma parcialmente intacta.

Em outro experimento com modelo animal, Watanabe-Kamiyama et al., (2010) administraram CH (MM média de 800 Da) a ratos Wistar, contendo Gly-[^{14}C]Pro-Hyp e [^{14}C]Pro como rastreadores radioativos para peptídeos e aminoácidos, respectivamente. O CH foi parcialmente absorvido na forma de peptídeos. A radioatividade no plasma atingiu o nível máximo após 3 h da administração e valor máximo correspondente na pele foi observado durante as 3 h seguintes. E, mesmo após 14 dias da administração, 70% da radioatividade máxima foram detectados na pele, sugerindo acumulação a longo-prazo dos peptídeos de colágeno absorvidos na pele dos ratos.

Diversos peptídeos de colágeno têm sido identificados no sangue humano após a ingestão do CH, incluindo Pro-Hyp, Pro-Hyp-Gly, Ala-Hyp, Hyp-Ala-Gly, Ser-Hyp, Hyp-Ser-Gly, Leu-Hyp, Hyp-Ile, Phe-Hyp e Hyp-Gly, dos quais Pro-Hyp e Hyp-Gly são os principais peptídeos encontrados (Iwai et al, 2005; Ohara et al, 2007; Shigemura et al., 2011; Sugihara et al., 2012). Ohara, et al., (2007) encontraram 345 ± 66 nmol de peptídeos de colágeno presentes no sangue humano após 24 h da ingestão de CH. Destes, 95% corresponderam ao dipeptídeo Pro-Hyp ($327,75 \pm 66$ nmol). Iwai, et al., (2005) encontraram 25 nmol/mL de Pro-Hyp no plasma humano após a ingestão de 9,4 g de CH.

Embora o mecanismo de ação do CH ainda não tenha sido completamente elucidado, é possível assumir que os peptídeos de colágeno no sangue podem estar envolvidos em várias atividades biológicas.

2.4.3 Efeitos Biológicos do Colágeno Hidrolisado

O CH é fonte promissora de peptídeos com atividade biológica devido a sua estrutura e elevado teor de Pro, Gly e Hyp. Vários trabalhos têm reportado a bioatividade do CH e de seus peptídeos derivados, incluindo atividade antioxidante e anti-hipertensiva e potencial de estimular o metabolismo de diferentes tecidos conjuntivos como cartilagem, ossos e pele. Segundo diversos autores, fatores como o posicionamento específico dos resíduos de aminoácidos na sequência peptídica do CH, frações peptídicas específicas, perfil de peso molecular e presença de aminoácidos hidrofóbicos nas posições N ou C terminais influenciam nas diferentes atividades biológicas (Liu et al., 2015; Proksch et al., 2014a; Schadow et al., 2013; Zhuang et al., 2009).

2.4.3.1 Cartilagem Articular

A suplementação com CH ganhou enorme atenção pública inicialmente devido a um estudo *in vitro* publicado por Oesser et al., (2003), no qual o CH estimulou a síntese de colágeno tipo II e proteoglicanas (versicana) em condrócito articular de bovinos, indicando que a suplementação com CH poderia antagonizar a degradação e perda da matriz durante a progressão de osteoartrite (OA).

No tratamento e prevenção da OA, a suplementação oral com CH tem sido muito estudada nos últimos tempos. Do ponto de vista pré-clínico, estudos demonstram que o CH está envolvido na síntese da MEC de culturas de condrócitos, elevando em até 1,6 vezes a síntese de proteoglicanas totais em relação às células controle, a expressão do RNAm de agrecana, além de pronunciado acúmulo de agrecanas na MEC (Schunck, et al., 2007). No ensaio conduzido por Oesser e Seifert

(2003), a suplementação com CH promoveu aumento dose-dependente na biossíntese de colágeno tipo II, mas não teve efeito significativo na atividade de MMPs.

Ohara et al., (2010b) observaram aumento da produção de ácido hialurônico em cultura de células sinoviais estimuladas pelo peptídeo Pro-Hyp derivado de CH. Os mesmos autores mostraram que a administração oral de Pro-Hyp, em suínos, aumentou o conteúdo de proteoglicanas na epífise e também reduziu as alterações associadas com a destruição da cartilagem na OA da articulação dos joelhos.

Outro estudo revelou que tanto o CH quanto o peptídeo derivado de CH (Pro-Hyp) inibiram a perda de condrócitos e degeneração da cartilagem de camundongos, porém não influenciaram a proliferação de condrócitos *in vitro* (Nakatani et al., 2009). Nakatani e colegas (2009) também revelaram aumento de glicosaminoglicanas e da expressão do RNAm de agrecana e diminuição da expressão de RNAm de Runx1 e osteocalcina em cultura celular da linhagem ATDC5 tratadas com CH e seu derivado peptídico.

Ensaio clínico com CH consistentemente mostraram efeitos no alívio de sintomas da OA após a ingestão diária de CH, melhorando assim a função articular (Clark et al., 2008; Moskowitz, 2000). Clark e colaboradores (2008), em um estudo prospectivo, duplo-cego, aleatorizado e controlado por placebo, reportaram que uma ingestão diária de 10 g de CH por 24 semanas foi eficaz na redução dos sintomas de desconforto na articulação, tais como dor e imobilidade devido ao esforço extenuante de exercício físico em jovens atletas.

Um estudo clínico piloto, aleatorizado, controlado por placebo, com 30 pacientes diagnosticados com OA no joelho, foi capaz de detectar após 24 semanas, por ressonância magnética, aumento no conteúdo de proteoglicanas na cartilagem dos pacientes que receberam 10 g de CH diariamente (Maclindon et al., 2011).

2.4.3.2 Atividade Antioxidante

Peptídeos bioativos do CH, obtidos a partir do colágeno bovino, suíno ou de peixe, têm mostrado atividade antioxidante em diferentes sistemas oxidativos (Kim et al., 2001 a,b; Li et al., 2007; Lin et al., 2010; Mendis et al., 2005 a,b).

Mendis e colaboradores (2005a) investigaram a atividade sequestrante de radicais livres por peptídeos de CH de pele de peixe, que exibiram potente atividade sequestrante de radicais superóxido e DPPH.

Yang et al., (2008) investigaram os perfis de pesos moleculares e atividade antioxidante do CH e seus derivados obtidos por diferentes tratamentos enzimáticos e ultrafiltração. Tanto o CH quanto seus derivados apresentaram potencial antioxidante anti-radicalar e de inibição da peroxidação lipídica. Mendis e colaboradores (2005b) também detectaram forte inibição da peroxidação lipídica pelo CH, superior àquela apresentada pelo antioxidante α -tocoferol, e capacidade de eliminar os radicais livres altamente reativos em sistemas oxidantes. Estes autores também observaram maior viabilidade de fibroblastos pulmonares humanos após o tratamento com CH em meio oxidativo induzido por radicais.

2.4.3.3 Atividade Anti-Hipertensiva

Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* também reportaram a atividade anti-hipertensiva do CH. Faria et al., 2008, Kim et al., (2001c) e Saiga et al., (2008) e relataram atividade anti-hipertensiva de alguns peptídeos derivados de CH por meio da inibição da enzima conversora da angiotensina I (ECA).

No estudo de Saiga et al., (2008), diminuição da pressão arterial foi observada em ratos espontaneamente hipertensos após 2 h da administração do CH de peixe e redução significativa na pressão arterial (-50 mm Hg) foi observada após 6 h. Além disso, estudos de administração de longo prazo indicaram que o CH mostrou supressão significativa de aumento da pressão arterial. Faria et al., (2008) também reportaram atividade anti-hipertensiva do CH bovino e suíno.

2.4.3.4 Tecido Ósseo

Alguns estudos experimentais sugerem que a suplementação oral com CH estimula o metabolismo do colágeno nos ossos (Kim et al., 2013; Kimira et al., 2014; Leem et al., 2013), aumenta a densidade óssea (Takeda et al., 2013), especialmente em condições de deficiência de cálcio (Wu et al., 2004) e evita a perda óssea relacionada a deficiência de estrogênio (Han et al., 2009; Kim et al., 2013; Nomura et al., 2005).

Wu et al., (2004) examinaram a efetividade da ingestão do CH no metabolismo ósseo de ratos adolescentes e ratos adultos deficientes em cálcio. Os autores encontraram resultados interessantes, demonstrando aumento da densidade óssea nos animais adolescentes tratados com CH, após 4 semanas em relação aos ratos adultos também tratados com CH e ao grupo controle. Nos animais adultos deficientes em cálcio, o tratamento com CH resultou em aumento da densidade óssea após 9 semanas, superior ao controle (sem tratamento) e similar ao encontrado no grupo tratado com dieta normal de cálcio.

Segundo os achados de Leem e colaboradores (2013), a ingestão de CH promoveu crescimento ósseo longitudinal em ratos machos adolescentes, elevando a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (*insulin-like growth factor-1*) e da proteína morfogenética óssea-2 (*bone morphogenetic protein-2*).

Takeda et al., (2013) reportaram os efeitos da ingestão do CH associada ao treino de corrida na densidade óssea e força em ratos adolescentes. A ingestão de CH (dieta contendo 20% de proteína, das quais 30% foi CH), associada ou não ao exercício, promoveu aumento da massa óssea em relação à dieta referência contendo caseína, sendo ainda mais pronunciada nos animais submetidos ao treino de corrida.

Experimentos recentes *in vivo* realizados por Kim et al., (2013) confirmaram os efeitos positivos da ingestão de CH em ratas ovariectomizadas. O tratamento com CH aumentou a densidade óssea, elevou a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina de forma dose-dependente, aumentou a síntese de colágeno tipo I e a

expressão do gene COL1A1. A expressão do gene COL1A1 induzida pelo CH foi completamente abolida pelo inibidor de ERK, sugerindo o envolvimento da via de sinalização ERK/MAPK para os efeitos transcricionais na expressão de COL1A1. Neste estudo, a ingestão de CH apresentou efeito osteoprotetor, pois a densidade óssea nas ratas suplementadas com CH foi aumentada em comparação com o controle e o CH preveniu a perda óssea trabecular induzida pela ovariectomia. O CH também diminuiu os níveis séricos do pró-peptídeo amino terminal do pró-colágeno I, os quais foram elevados nos animais ovariectomizados.

Nomura et al., (2005) e Han et al., (2009) também relataram os efeitos positivos da ingestão do CH em ratas ovariectomizadas com osteopenia estabelecida, sendo que os estudos de Nomura e colaboradores (2005) também mostraram aumento da densidade óssea e do conteúdo de colágeno I e glicosaminoglicanas na epífise femoral de ratas ovariectomizadas tratadas com CH. Posteriormente, Han e colaboradores (2009) reportaram que o tratamento com CH foi eficaz na prevenção da perda óssea, por modular o ligante do receptor ativador do fator nuclear KB (RANKL) e do receptor de osteoprotegerina (OPG) e suprimir a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Do ponto de vista de modulação da proliferação e diferenciação celular, Kimira et al., (2014) investigaram os efeitos do di-peptídeo derivado do CH (Pro-Hyp) em células osteoblásticas MC3T3-E1. O peptídeo não afetou a proliferação e a mineralização da matriz, porém elevou a atividade da fosfatase alcalina, marcador do metabolismo ósseo. As células tratadas com Pro-Hyp elevaram a expressão dos genes RUNX2, OSTERIX e COL1A1 indicando que o di-peptídeo promoveu diferenciação dos osteoblastos.

Em termos de achados clínicos, a ingestão diária de 10 g de CH durante 24 semanas por mulheres pós-menopausadas com osteopenia não se demonstrou eficaz na alteração dos níveis dos marcadores de reabsorção e formação em relação ao grupo placebo, no estudo clínico conduzido por Cúneo et al., (2010). No entanto, a ingestão oral de CH associada com a injeção de calcitonina apresentou efeito de

inibição da reabsorção óssea maior do que a calcitonina sozinha em pacientes com osteoporose (Fugita et al., 2002).

2.4.4. Efeitos Biológicos do Colágeno Hidrolisado na Pele

Efeitos positivos da administração oral de CH e derivados na pele também têm sido observados ao longo das últimas décadas. Estes efeitos incluem melhoria na qualidade das unhas (Rosenberg, 1957; Tyson, 1950) e na espessura e crescimento dos cabelos (Morganti, Randazzo, 1984; Scala, et al., 1976). Um estudo recente publicado por Le Vu e colaboradores (2015) mostrou que a suplementação oral com CH por 6 semanas, em camundongos, elevou significativamente a expressão de genes de queratina e proteínas associadas a queratina. Considerando que as proteínas associadas a queratina são produzidas na fase anágena (crescimento) do ciclo capilar, a regulação positiva destes genes pode estar relacionada à indução desta fase do ciclo, sugerindo efeitos positivos do CH na biologia capilar (Le Vu et al., 2015).

Alguns estudos sugerem que o perfil de peptídeos e aminoácidos exclusivos do CH pode ser responsável pelos seus CH na fisiologia da pele. Postlethwaite et al., (1978) quantificaram a atividade quimiotática *in vitro* de peptídeos derivados de colágeno em cultura celular de fibroblastos humanos. Colágenos tipos I, II e III foram digeridos por collagenase bacteriana e os peptídeos resultantes apresentaram efeito quimiotático pelos fibroblastos. Segundo os autores, a degradação de colágeno nativo gera peptídeos de colágeno que podem atuar como um estímulo quimiotático de fibroblastos e atrair essas células para reparação de danos teciduais.

Usando modelo de cultura celular de fibroblastos humanos, Ohara et al., (2010a) investigaram a influência de vários peptídeos derivados do CH nos componentes da MEC e proliferação celular. Eles reportaram que os peptídeos de colágeno estimularam a proliferação celular e a produção de ácido hialurônico, mediada pela ativação da transcrição do gene hialuronato sintase 2 (HAS2).

Minaguchi et al., (2005) investigaram efeitos da ingestão diária de duas doses (0,2 g/kg e 1,0 g/kg de peso vivo) de CH sobre a MEC de tendão de coelho, por 56 dias. O diâmetro das fibras colágenas e a quantidade de glicosaminoglicanas foram quantificadas nos animais alimentados com CH, lactoalbumina ou água (controle). A ingestão de CH ou lactoalbumina induziu um aumento significativo do diâmetro da fibra colágena, exceto a maior dose de lactoalbumina, comparado com o grupo controle. No grupo controle, fibras com diâmetro de 20-60 nm corresponderam à percentagem mais elevada. Vale ressaltar que a ingestão da dose elevada de CH resultou numa elevada percentagem das fibras de colágeno com diâmetro em torno 160-180 nm, e que a frequência de diâmetro superior a 200 nm foi mais elevada para a dose baixa de CH. Foi demonstrado que os efeitos do CH sobre as fibras colágenas deste tecido foram diferentes dos observados com a lactoalbumina e que estes diferiram entre as doses. A quantidade de dermatan sulfato aumentou nos grupos que receberam as doses elevadas, enquanto a quantidade de ácido hialurônico diminuiu nos coelhos alimentados com CH ou lactoalbumina em qualquer dose. Embora os efeitos fossem observados em tecido conjuntivo de tendões, os resultados podem apoiar os benefícios na pele, uma vez que em ambos os tecidos o fibroblasto é o principal tipo celular e o colágeno do tipo I é o principal componente da MEC.

A fim de saber se os efeitos da ingestão de CH na pele são colágeno-específicos ou meramente devido à ingestão de proteínas, Matsuda e colegas (2006) investigaram a influência da suplementação oral com colágeno na derme de suínos. Colágeno hidrolisado foi administrado por via oral para os suínos na dose 0,2 g/kg de peso corporal por dia, durante 62 dias, e seus efeitos foram comparados com os grupos lactoalbumina e água (controle). A densidade de fibroblasto, a densidade e diâmetro das fibras de colágeno foram significativamente maiores no grupo alimentado com CH em relação aos demais grupos. Isto demonstrou que o efeito do CH foi específico e não dependeu apenas de um aumento na ingestão de aminoácidos. O nível de dermatan sulfato e ácido hialurônico, as principais glicosaminoglicanas da derme, não diferiu significativamente entre os três grupos. A

razão entre dermatan sulfato e ácido hialurônico foi maior no grupo CH. Estes resultados sugeriram que a ingestão de CH induziu aumento na densidade de fibroblastos, portanto, proliferação celular, e aumentou a síntese de colágeno na derme de maneira colágeno-específica.

Experimentos realizados por Zague e colaboradores (2011) também revelaram efeitos específicos da ingestão do CH na pele de ratos. Os autores compararam a influência da dieta suplementada com caseína ou CH no metabolismo da pele de ratos. Os resultados obtidos mostraram que a ingestão de CH resultou no aumento da produção de colágeno I e IV e diminuição dos níveis de MMP-2, o que não foi observado no grupo caseína.

O estudo conduzido por Liang et al., (2010) revelou os efeitos positivos da ingestão de CH em longo prazo no envelhecimento cronológico da pele de camundongos. Os achados demonstraram que o CH (a) inibiu a perda e a fragmentação de colágeno, (b) elevou a expressão proteica de colágeno I e III e expressão gênica de pró-colágeno I e III por ativar a via de sinalização Smad/TGF β , (c) atenuou a expressão de MMP-1 e aumentou a expressão do inibidor da MMP-1 (TIMP-1) e (d) reduziu o estresse oxidativo.

Estudos em animais têm demonstrado o potencial da ingestão do CH em reduzir os danos causados pela radiação UV na pele. A exposição aguda (dose única) à radiação UVB promove perda da função de barreira da pele dos animais, elevando a perda de água transepidérmica e diminuindo o conteúdo de água no estrato córneo. Exposição crônica (doses repetidas) à radiação UVB provoca a degradação das proteínas da MEC, prejudicando a elasticidade da pele. Oba et al., (2013) mostrou que a ingestão de CH suprimiu notadamente a perda de água transepidérmica, aumentou o conteúdo de água no estrato córneo, elevou o conteúdo de ácido hialurônico dérmico e melhorou a elasticidade da pele de camundongos expostos a doses únicas e repetidas de radiação UVB. Tanaka et al., (2009) também comprovaram que a ingestão de CH suprimiu a diminuição da hidratação da pele,

hiperplasia da epiderme e redução do colágeno tipo I induzidos pela exposição crônica à radiação UVB, na pele de camundongos.

Seguindo a investigação contra os danos provocados pela radiação UV, Fan et al., (2013) mostraram que a ingestão do CH protegeu a pele de camundongos por aumentar a imunidade, reduzir a perda de água, reparar as fibras colágenas e elásticas e manter a proporção de colágeno III e I.

Shimizu et al., (2014) investigaram os efeitos da suplementação oral com dois di-peptídeos de colágeno sintéticos (Pro-Hyp e Hyp-Gly), simulando aqueles normalmente encontrados no sangue após a ingestão do CH, na disfunção da barreira em camundongos HR-1 sem pelos. Após 35 dias de suplementação, houve diminuição da perda de água transepidermica e aumento do conteúdo de água no estrato córneo da pele dos animais suplementados em relação ao grupo controle. A análise de DNA por *microarray* da pele revelou diferenças na expressão gênica entre os grupos suplementados e controle, no entanto nenhum gene foi relacionado à função cutânea. Os autores concluíram que a suplementação aumentou a função de barreira cutânea, porém sem alteração da expressão de genes relacionados a funções da pele.

É sabido que enzimas antioxidantes endógenas têm papel crucial na proteção da pele contra os danos causados pela radiação UV, devido à capacidade de neutralizar os radicais livres. No entanto, a exposição à radiação UV diminui os níveis destas enzimas, alterando os mecanismos de equilíbrio redox dos processos fisiológicos na pele. Estudos realizados por Zhuang e colaboradores (2009) e Hou e colaboradores (2009) demonstraram que a ingestão de CH protegeu contra a diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes endógenas (superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase) na pele de camundongos expostos à radiação UVAB.

Em um estudo piloto, aberto, Matsumoto et al., (2006) investigaram os efeitos do suplemento comercial contendo 5 g de CH, vitamina C e glucosamina nas propriedades da pele de 25 mulheres japonesas. Após 6 semanas de ingestão diária

do suplemento, houve aumento da hidratação e das propriedades viscoelásticas da pele destas mulheres.

Em outro estudo clínico aberto, piloto, Schwartz e Park (2012) investigaram o efeito de um suplemento comercial contendo CH, ácido hialurônico de baixo peso molecular e condroitina em 26 mulheres com sinais de envelhecimento natural e fotoenvelhecimento. Após 12 semanas da ingestão oral diária de 1 g deste suplemento, houve diminuição da pontuação visual das linhas e rugas faciais e do ressecamento da pele.

Efeitos clínicos significativos da ingestão do CH que resultaram em melhora da aparência geral da pele têm sido confirmados em dois estudos clínicos duplo-cegos, randomizados, controlados por placebo. Proksch et al., (2014a) comprovaram melhora significativa na elasticidade da pele de mulheres que ingeriram diariamente 2,5 g de CH específico por 8 semanas, em contraste com o grupo placebo. A melhora da elasticidade da pele foi mantida mesmo após 4 semanas da interrupção do tratamento. Além disto, os efeitos positivos na elasticidade foram ainda mais pronunciados em mulheres acima de 50 anos, subgrupo no qual também foi observado influência positiva do CH na hidratação e perda transepidermica de água.

No segundo estudo clínico, Proksch et al., (2014b) investigaram os efeitos da ingestão de 2,5 g/dia de CH específico no volume de rugas periorcárias (ao redor dos olhos) e no conteúdo dos principais componentes da MEC, como elastina, biglicana e pró-colágeno I. Os pesquisadores reportaram redução de mais de 30% do volume das rugas após 8 semanas de tratamento com CH e aumento em torno de 60% do conteúdo de pró-colágeno I. O efeito positivo na redução das rugas foi mantido mesmo 4 semanas após o término do tratamento.

Considerando os achados de literatura, o CH pode apresentar atividade biológica na pele, atuando como mensageiro biológico e desencadeando a síntese de novas fibras colagênicas e da MEC e estimulando a proliferação dos fibroblastos.

2.5 Cultura de Fibroblastos Dérmicos Humanos In vitro

2.5.1 Cultura de células primárias em monocamada

As células em cultura têm se apresentado como um modelo de estudo muito útil em várias áreas de investigação das ciências da saúde. Particularmente, na fase pré-clínica, nos estudos de resposta a diferentes compostos endógenos e a xenobióticos, já há muito que se utiliza como ferramenta inicial o modelo de cultura celular. Os fibroblastos dérmicos humanos em cultura constituem, entre outras linhagens celulares, um modelo de estudo muito utilizado em testes de toxicidade, na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, na engenharia genética e terapia gênica (Takashima, 1998).

Além disto, fibroblastos dérmicos humanos cultivados *in vitro* são muito utilizados para a pesquisa dos aspectos fundamentais da biologia celular, para investigar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao processo de envelhecimento cutâneo, bem como investigar os efeitos de compostos endógenos e xenobióticos sobre as células e no processo de envelhecimento (Ryan, 2008).

Curiosamente, grande diversidade de características tem sido relatada para os fibroblastos dérmicos derivados de diferentes locais do corpo, que devem ser considerados na busca de ingredientes funcionais com o propósito de modular funções celulares.

2.5.2 Equivalente Dérmico: Modelo de cultura 3D

Sistemas *in vitro* de cultura de células em monocamada são convencionais e muito utilizados. No entanto, são sistemas simplificados e muitas vezes não preditivos do que ocorre *in vivo*.

Equivalentes dérmicos (ED) são modelos tridimensionais que possuem um microambiente onde os processos celulares estão normalizados em relação às

culturas convencionais em monocamada, simulando a situação *in vivo* (Ahlfors, Billiar, 2007; Boyce et al., 1998). Estes modelos são ferramentas atraentes para ensaios farmacológicos e para o estudo de interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Além disto, são fundamentais para a geração de equivalentes de pele humana, designados como co-culturas e gerados pela semeadura de queratinócitos humanos em ED povoado por fibroblastos humanos. No entanto, a qualidade do ED pode ser comprometida por serem comumente constituídos de matriz dérmica não humana, por exemplo, colágeno proveniente de rato ou tendão bovino. Embora a utilização de matrizes acelulares ou matrizes contendo colágeno para crescimento simultâneo de células dérmicas e epidérmicas terem mostrado resultados promissores (Archambault et al., 1995; Auger et al., 1998; Boyce³, 1998 apud Ghalbzouri et al., 2009; Hoeller et al., 2001; Vaissiere et al., 2000), fornecem um ED com características incompletas em relação àquelas encontradas na derme humana *in vivo*, que contém glicosaminoglicanas e proteoglicanas, além de colágeno como constituinte principal.

O uso de derme humana acelular desepidermizada (substrato natural) pode constituir uma alternativa a ED derivado de matriz de colágeno de animais (Bessou et al., 1995; Pruniéras et al., 1983), no entanto, a aplicação deste método é limitada pela variação incontrollável da espessura do material e baixa disponibilidade do tecido nativo. Além disso, também precisa ser povoada com células para fornecer um microambiente permissivo à formação do ED, aumentando a característica artificial.

Diversos estudos científicos têm focado na geração e aperfeiçoamento de novas matrizes tridimensionais para melhor representar a geometria, química e sinalização do ambiente da MEC nativa (Lee et al., 2008). A obtenção de ED gerado por uma matriz derivada exclusivamente de fibroblastos humanos normais empregando diferentes condições de cultura celular tem sido reportada. Durante a homeostase e reparação tecidual, os fibroblastos sintetizam, organizam e mantêm o tecido conjuntivo, produzindo MEC e remodelação. Esta função essencial de

³ Boyce ST, Christianson DJ, Hansbrough JF. Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. J Biomed Mater Res 1988;22(10):939-57.

fibroblastos pode ser utilizada *in vitro* para produzir equivalentes dérmicos baseados exclusivamente em células (Ghalbzouri et al., 2009; Grinnell⁴ et al., 1989 apud Ghalbzouri et al., 2009). Nestes estudos, fibroblastos humanos foram estimulados a acumular concentração elevada de MEC, a organizar a fibronectina fibrilar e a formar fibras de estresse de actina (Kessler et al., 2001). O principal estimulante aditivo nestas culturas foi o ácido ascórbico, promovendo *in vitro* o processamento de pró-colágeno a colágeno. As alterações morfológicas, bioquímicas e características físicas destas matrizes foram superiores àquelas dos fibroblastos povoados em MEC reconstituída (Ahlfors, Billiar, 2007; Ishikawa et al., 1997). Estes achados são corroborados pelo fato de a formação dos feixes fibrilares de colágeno ser caracterizada pela biossíntese da MEC, uma vez que fibroblastos semeados em biopolímeros isolados não formam feixes de fibras de colágeno, considerando que os fibroblastos produzem sua própria matriz para formar estes importantes elementos estruturais da MEC funcional (Grinnell et al., 1989). Ghalbzouri et al., (2009) reportaram a geração de ED derivado de fibroblastos humanos que, sob condições específicas, secretaram pró-colágeno tipo I durante todo o período de cultura (8 semanas) e concluíram que, após três semanas da preparação, o conteúdo de pró-colágeno secretado foi suficiente para formar um equivalente dérmico nos quais queratinócitos humanos pudessem ser semeados.

⁴ Grinnell F, Fukamizu H, Pawelek P, Nakagawa S. Collagen processing, crosslinking, and fibril bundle assembly in matrix produced by fibroblasts in long-term cultures supplemented with ascorbic acid. *Exp Cell Res* 1989;181(2):483–91

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a influência da suplementação com CH na modulação de respostas celulares e moleculares de fibroblastos dérmicos humanos obtidos de áreas fotoprottegida e fotoexposta.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Avaliar a capacidade do CH de modular (a) proliferação celular (número de células em cultura, ciclos de divisão celular e replicação de DNA); (b) biossíntese de proteínas de MEC e (c) atividade de MMPs em fibroblastos dérmicos humanos obtidos de áreas fotoprottegida e fotoexposta cultivados em monocamada.
- ii. Obtenção e caracterização de um equivalente de derme humana reconstituída, gerado por uma matriz derivada exclusivamente de fibroblastos humanos normais em modelo de cultura tridimensional.
- iii. Avaliar os efeitos da suplementação com CH na secreção da principal proteína da MEC dérmica, colágeno tipo I, no modelo 3D de equivalente dérmico humano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Colágeno Hidrolisado

O colágeno hidrolisado utilizado neste estudo foi fornecido pela empresa GELITA (Cotia, SP, Brasil). Trata-se de CH grau alimentício, comercialmente disponível, obtido a partir da hidrólise enzimática especial do colágeno tipo I de pele bovina e previamente caracterizado por Zague et al., (2011). A composição química básica do CH está demonstrada na **Tabela 1**, enquanto a composição de aminoácidos na **Tabela 2**. Segundo Zague et al., (2011), o CH é basicamente composto por proteína (>90%) (**Tabela 1**) e contém todos os aminoácidos, exceto triptofano, com alto teor de glicina (24,5%), ácido glutâmico (10,1%), arginina (8,1%), prolina (13,8%) e hidroxiprolina (7,4%) e pequenas quantidades de tirosina, cisteína, histidina e metionina (**Tabela 2**). Os autores também descreveram o perfil de distribuição de MM, reportando que o CH utilizado neste estudo é composto por uma combinação de peptídeos de colágeno com massa molecular média de 3,55 kDa e frações peptídicas com MM variando de 1,00 a 3,00 kDa (66,06% da proteína total), com pico principal de MM de 1,55 kDa (proporção relativa > 90%) (**Figura 9**).

Tabela 1 – Composição química percentual do colágeno hidrolisado.

Adaptado de: Zague et al., (2011)

Composição básica	Colágeno Hidrolisado (%)
Proteína	90,00
Proteína (base seca)	98,60
Gordura	0,05
Cinzas	1,00
Umidade	8,70
Carboidrato	0,25

Tabela 2 – Composição de aminoácidos do Colágeno Hidrolisado.

Adaptado de: Zague et al., (2011)

Concentração (g/100g)	
Aminoácido	Colágeno Hidrolisado
Ácido aspártico	6,02 ± 0,2
Ácido glutâmico	10,12 ± 0,2
Serina	3,43 ± 0,2
Glicina	24,47 ± 0,2
Histidina	0,70 ± 0,2
Arginina	8,05 ± 0,2
Treonina	1,79 ± 0,2
Alanina	9,74 ± 0,2
Prolina	13,81 ± 0,2
Tirosina	0,58 ± 0,2
Valina	2,36 ± 0,2
Metionina	0,98 ± 0,2
Cisteína	0,24 ± 0,2
Isoleucina	1,60 ± 0,2
Leucina	3,08 ± 0,2
Fenilalanina	1,94 ± 0,2
Lisina	3,68 ± 0,2
Triptofano	ND
Hidroxiprolina	7,41 ± 0,2

ND: não determinado.

Figura 9 – Perfil de distribuição de massa molecular do colágeno hidrolisado determinado por cromatografia de permeação em gel. Adaptado de: Zague et al., 2011.

4.2 Preparação do Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* (DMEM) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultlab, Campinas, SP, Brasil) e designado meio completo. Para o preparo de 250 mL de meio de cultura, 3,9 g de DMEM foram solubilizados, sob agitação moderada, em água Milli-Q (Millipore, Darmstadt, Alemanha) com adição de 0,3 g de bicarbonato de sódio para ajuste de pH 6,5 - 7,0. Em câmara de fluxo laminar, a esterilização do meio de cultura foi feita por meio de um sistema de filtração em membrana de 0,22 μm (Millipore).

4.3 Coleta de Material e Aspectos Éticos

Os descartes de peles foram obtidos de pacientes (mulheres caucasianas, não fumantes, híidas, entre 20 e 45 anos) submetidas a cirurgia de mamoplastia (área fotoprottegida, n=3) e blefaroplastia (área fotoexposta, n=3), após aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Boas Práticas Clínicas (Resolução nº 196/1996 CNS) e conforme a Declaração de Helsinki de 1975, aperfeiçoada em 1983. Todo o material coletado foi utilizado no projeto, não havendo descartes.

4.4 Cultura Primária de Fibroblastos Dérmicos Humanos (FDHs)

As culturas primárias de FDHs foram obtidas de amostras de pele humana, descritas acima, por meio de explante de cultura celular (**Figura 10**). O material foi submetido a dissociação mecânica sendo, então, fragmentos de aproximadamente 1 mm² transferidos para garrafas de cultura (25 cm²) contendo 2 mL de meio de cultura completo acrescido de antibióticos (estreptomicina 100 µg/mL/ penicilina 100 UI/mL e 2,5 µg/mL de anfotericina B). Após 24 h, o meio de cultura foi completado para 5 mL. O material foi mantido em estufa a 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO₂, sendo o meio de cultura trocado a cada 72 h, até formação de uma monocamada confluenta. Ao atingirem a confluência, as culturas foram submetidas a dissociação enzimática com tripsina 0,05% + EDTA 0,02%. Para obtenção do estoque de células, as mesmas foram congeladas na presença de 10% do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) em meio de cultura completo. Todos os experimentos foram realizados entre a terceira e a quinta passagem. As imagens das culturas foram obtidas pelo microscópio de luz invertido digital EVOS AME-3302 (AMG, Bothell, WA, EUA). As células de FDHs isoladas a partir de explantes de áreas fotoprottegida e fotoexposta foram denominadas FDHs-FP e FDHs-FE, respectivamente.

Figura 10 – Explantes de cultura celular para obtenção da cultura primária de fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas fotoprottegida (explante de pele de mama) e fotoexposta (explante de pele de pálpebra).

4.5 Suplementação do Meio de Cultura com Colágeno Hidrolisado

Para todos os ensaios de estimulação, dois grupos de estudos foram determinados: controle e tratado. O grupo controle foi mantido em meio de cultura completo e o grupo tratado incubado em meio de cultura completo suplementado com CH nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL (**Figura 11**). O intervalo de concentração foi baseado nos trabalhos de Oesser et al., (2003) e Rodrigues (2008) e validado pelo ensaio de viabilidade celular por MTT. O CH foi dissolvido a frio no meio de cultura com agitação moderada e posterior filtração em membrana de 0,22 μ m (Millipore).

Figura 11 – Grupos experimentais estabelecidos neste estudo. CH = colágeno hidrolisado.

4.6 Ensaio de Viabilidade Celular (citotoxicidade) por MTT

Para o ensaio de viabilidade celular, foi utilizada linhagem comercial de FDHs normais designada CCD-1059Sk (ATCC n° CRL=2072TM, Manassas, VA, USA). Para a análise da viabilidade dos FDHs suplementados com diferentes concentrações de CH, empregou-se o método de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) brometo 2,5-difeniltetrazólio], descrito por Mosmann (1983). Este método avalia a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, capazes de reduzir o sal MTT por desidrogenases mitocondriais a cristais de formazan. Alíquotas de 100 µL/poço da suspensão de fibroblastos foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células/mL e incubadas por 24 h em estufa de CO₂ a 37 °C. Após o período de incubação, foram adicionados 100 µL/poço das soluções de CH nas concentrações 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg/mL, exceto no grupo controle, que recebeu somente 200 µL/poço da suspensão de fibroblastos, na mesma densidade. Após o tratamento as placas foram incubadas por 24 h em estufa de cultura a 37 °C e 5% de CO₂. Após a incubação, foram adicionados em cada poço 10 µL de MTT (solução 5 mg/mL), e incubadas por 3 h em estufa de cultura a 37 °C e 5% de CO₂. Então, o sobrenadante foi removido e acrescentou-se 100 µL de DMSO a 10% para a dissolução dos cristais de formazan, que se formaram e se apresentaram como precipitado. Os resultados foram adquiridos em espectrofotômetro (Thermo Plate – TR-Reader) para a obtenção da densidade óptica (DO) determinada a uma absorbância no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados expressam a porcentagem média de células viáveis. O valor de DO do grupo controle não tratado foi considerado como 100% de viabilidade celular e os resultados das demais células tratadas foram comparadas a este valor. Todas as concentrações foram realizadas em triplicata em três ensaios independentes.

4.7 Aspectos Morfológicos com Privação Total de SFB

Neste ensaio, os FDHs foram cultivados em garrafas de cultura celular (25 cm²), contendo 2 mL de meio completo. No segundo dia de cultura, meio de cultura foi removido, a cultura foi lavada com PBS (3 vezes) e 2 mL de meio de cultura sem SFB e suplementados com CH (0,5 - 5,0 mg/mL) foram adicionados nas garrafas. As células do grupo controle foram mantidas em meio de cultura sem SFB. Após 24, 48 e 72 h de privação total de SFB, a morfologia celular foi avaliada por microscópio de luz invertido EVOS AME-3302.

4.8 Meio condicionado

Nos ensaios de estimulação nos quais a expressão de proteínas da MEC no meio condicionado foi avaliada, as células foram plaqueadas (1×10^5) em garrafas de 25 cm² e cultivadas por 48 h em meio completo. Em seguida, o meio foi removido e as células lavadas por três vezes com PBS, sendo então mantidas em meio livre de SFB, suplementado ou não com CH por 48 h. Após este período o meio foi coletado, acrescido de 2 µl/mL da mistura de inibidor de protease e fostatase (NaF e ortovanadato, Sigma), exceto nos casos em que as MMPs foram avaliadas, dializado e concentrado empregando sistema de centrifuga e filtro de 30K acoplado (Amicon Ultra-4, Millipore, Bedford, MA, EUA). O sobrenadante foi congelado a -80 °C até a quantificação de proteína total pelo método BCA (Pierce Inc Rockford, IL, EUA).

4.9 Proliferação Celular

4.9.1 Número de células

Os fibroblastos foram semeados em placas de 12 poços (densidade inicial 2×10^4), contendo 1 mL de meio completo e no segundo dia de cultura, as células foram tratadas com CH por 24, 48, 72 e 96 h. Após cada período de tratamento, as culturas foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS (tampão fosfato de sódio sem cálcio e magnésio) submetidas a dissociação enzimática com 500 μ L de tripsina/EDTA. A tripsina foi inativada com 1 mL de meio completo e o número de células na cultura foi obtido por citômetro de fluxo *Guava EasyCyte mini* (Millipore Biosciences Tessicula, CA, EUA). Cinco mil células de cada grupo foram quantificadas e a quantidade de células por mL na placa foi calculada. Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos duas vezes. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro de média do número de células.

4.9.2 Ciclos de Divisão Celular

Os ciclos de divisão celular foram determinados pelo kit *Guava CellGrowth* (Millipore) baseado na utilização de um corante permeável à membrana celular (CFSE, diacetato de carboxifluoresceína éster de succinimidilo) e outro não permeável (PI, iodeto de propídio) para distinção de células vivas e mortas. O CFSE difunde-se livremente nas células em que esterasas intracelulares clivam os grupos acetato, convertendo-o em corante fluorescente impermeável a membrana celular. O CFSE é distribuído igualmente entre as células-filhas devido à reticulação covalente com proteínas intracelulares através dos seus grupos succinimidilo. A intensidade de fluorescência diminui pela metade a cada geração (**Figura 12**). A marcação é de longa duração, permitindo a resolução de, pelo menos, três ou quatro ciclos de divisão celular. O PI é, então, adicionado para distinguir as células vivas das células mortas.

Figura 12 – Representação esquematizada do ciclo de divisão celular mostrando a intensidade de fluorescência relativa decaindo pela metade em cada geração.

Neste experimento as células foram primeiramente coradas e posteriormente plaqueadas para o tratamento. A concentração ótima do corante CFSE para o tipo celular utilizado neste estudo foi determinada e ajustada na intensidade de fluorescência verde em 10^2 , segundo as orientações do manual do fabricante do kit (**Figura 13**). A concentração ótima de CFSE neste experimento foi de $0,01 \mu\text{M}$.

Figura 13 – Determinação da concentração ótima de CFSE. (A) células não coradas. (B) células coradas adequadamente.

Para a coloração, as células mantidas em cultura em garrafas de 25 cm² foram submetidas a dissociação enzimática com 1 mL de tripsina/EDTA seguida da neutralização com 1 mL de PBS, contadas em citômetro de fluxo e centrifugadas a 500 rpm durante 7 min. O sobrenadante foi aspirado e o sedimento celular foi ressuspenso em 1 mL de PBS contendo 0,1% de BSA. 200 µL de células não coradas foram reservados como um controle negativo e submetidas a todos os passos igualmente às células coradas. Em seguida, 1,6 mL de solução CFSE (0,01 µM) foram adicionados ao tubo contendo 800 µL de suspensão de células a serem coradas e misturou-se suavemente. As células foram incubadas a 37 ° C durante 15 minutos num tubo hermeticamente fechado na posição horizontal. Após a incubação, 10 mL de meio completo contendo 10% de SFB foram adicionados aos tubos e misturados suavemente. As células foram incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 500 rpm durante 7 minutos. O meio foi aspirado e adicionou-se 5 mL de meio completo para ressuspenso o sedimento celular. As células foram centrifugadas, adicionado meio completo para ressuspenso o sedimento de células por mais três vezes consecutivas. Finalmente, o sedimento de

MATERIAL E MÉTODOS

células foi ressuspendido em 2 mL de meio completo e as células foram contadas. A cultura de células foi tratada com diferentes concentrações de CH pela adição de 100 μL por poço da solução de CH ou apenas meio completo (grupo controle). Cem microlitros de células (1×10^4) de cada suspensão de células (não coradas ou coradas) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas durante 48 h a 37 °C, 5% CO_2 . Após o período de estimulação, 5 μL de PI foram adicionados a cada poço. As amostras foram incubadas no escuro a temperatura ambiente por 5 min e adquiridas no citômetro de fluxo. Dados obtidos foram analisados pelo *software CytoSoft™*, analisados por *Dot Plot* e agrupados em quadrantes, sendo expressos como percentagem de células que proliferaram, em repouso, mortas ou morte estimulada (Figura 14).

Figura 14 – *Dot plot* do ensaio de proliferação pelo kit *Guava CellGrowth*, indicando a forma de expressão dos dados. Células coradas, vivas, negativas para iodeto de propídio (IP) e que proliferaram aparecem no quadrante inferior esquerdo (verde). Células coradas, vivas, negativas para IP, quiescentes, aparecem no quadrante inferior direito (azul). Células coradas, positivas para IP, mortas e não estimuladas aparecem no quadrante superior direito (rosa). Células coradas, positivas para IP, estimuladas e mortas aparecem no quadrante superior esquerdo (roxo).

4.9.3 Replicação de DNA

A atividade de replicação de DNA (fase S) foi avaliada pelo ensaio *Click-iT EdU Flow Cytometry* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA) que utiliza EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) como análogo do nucleotídeo timidina, o qual é incorporado ao DNA na síntese de DNA. A detecção baseia-se numa reação catalisada por cobre covalente entre azida do corante fluoróforo (Alexa Fluor488) e alcino do EdU.

As células foram semeadas (2×10^4) em placas de 35 mm e tratadas com CH. Após 46 h de tratamento, as células foram incubadas com 10 μ M de EdU por mais 2 h. Para o controle negativo, as células da mesma população não foram tratadas com EdU. As células foram ressuspensas, lavadas uma vez com BSA 1% em PBS e centrifugadas a 500 x g durante 5 min. Depois, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 min, permeabilizadas em Triton X - 100 durante 30 min e incubadas com o *cocktail* de reação durante 30 min. Para a detecção de EdU, Alexa Fluor 488 azida foi usada e detectado com amplificação logarítmica por citometria de fluxo. A percentagem de células na população que estavam na fase S foi determinada.

4.10 Cinética de Deposição de Colágeno Total

Os fibroblastos foram semeados sobre lâmina de vidro estéril redonda colocada no fundo dos poços individuais de placas de 24 poços a uma densidade de 2×10^4 células/poço. No segundo dia de cultura, as células foram tratadas por 24, 48, 72 e 96 h com meio suplementado ou não (controle) com CH.

A deposição de colágeno foi avaliada pelo microensaio quantitativo *Sirius Red/Fast Green Collagen Staining Kit* (Chondrex Inc, Redmond, WA, EUA) que quantifica colágeno total e proteínas não-colagênicas por coloração diferencial com *Sirius Red* e *Fast Green*. O corante *Sirius Red* liga-se especificamente ao colágeno, enquanto o *Fast Green* liga-se às demais proteínas. Após cada período de tratamento,

o meio de cultura foi removido e a lamínula foi lavada com PBS. As culturas foram fixadas em etanol por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram coradas com 0,2 mL de solução de corante (0,1% de vermelho *Sirius* e 0,1% de *Fast Green* dissolvidos em água saturada com ácido pícrico) e incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Cuidadosamente, a solução corante foi removida e a cultura lavada com água deionizada até que o fluido se tornasse incolor. Em seguida, 1 mL de solução de extração do corante (NaOH 0,1 N e metanol (1: 1)) foi adicionado e misturado suavemente até a remoção da coloração da camada celular. A DO foi detectada a 540 e 605 nm em espectrofotômetro.

O conteúdo de colágeno (μg) em cada poço foi calculado usando a equação:

$$\text{Collagen } (\mu\text{g/poço}) = [\text{OD } 540 - (\text{OD } 605 \times 0.291)] / 37.8 \times 1000$$

Primeiramente, o valor de DO 540 nm foi corrigido por subtrair a contribuição do *Fast Green*, que interfere na absorbância a 540 nm. *Fast Green* contribui com 29,1% do valor DO 540. A equivalência de cor (valores de DO/ mg de proteína) é de 37,8 para o colágeno e 2,04 para proteínas não colagênicas a 540 e 640 nm, respectivamente. A sensibilidade do ensaio para o colágeno é maior que 3 μg / poço.

4.11 Expressão Proteica de Pró-colágeno I e Colágeno I por *Western Blot*

O conteúdo de pró-colágeno I e colágeno I em meio condicionado foi detectado por *Western blot*. Neste ensaio fez-se necessária a utilização de anticorpos que reconhecessem a forma nativa da proteína (não denaturada), a fim de evitar a detecção dos peptídeos de colágeno do CH utilizado no tratamento das células. Teste preliminar foi feito com FDHs da linhagem CCD1059Sk (ATCC), usando como controle positivo o colágeno tipo I nativo (Sigma), para assegurar a especificidade do anticorpo para a proteína nativa e consequentemente ausência de marcação para o CH, conforme representado na **Figura 15**.

Figura 15 – *Imunoblotting* preliminar para assegurar a especificidade do anticorpo contra a forma nativa do colágeno I, demonstrando ausência de marcação para a forma hidrolisada do colágeno. CH = colágeno hidrolisado, ausência de marcação. CO(+) = controle positivo, colágeno nativo tipo I, marcação positiva. CO = controle, meio condicionado de células do grupo controle. 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 = concentrações (mg/mL) do CH, meio condicionado de células do grupo tratado com CH. Ensaio realizado com fibroblastos dérmicos humanos da linhagem comercial CCD1059Sk (ATCC).

Após a quantificação de proteína pelo método BCA, 2,5 μ L do aditivo NativePAGE 5% G-250 (Invitrogen) foram adicionados às amostras em gelo. Em seguida, as amostras (30 μ g de proteínas) foram carregadas em gel nativo de poliacrilamida (Novex NativePAGE 3-12% Bis-Tris do gel, Invitrogen) e a eletroforese foi executada de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas foram transferidas (100 V, 250 mA por 2 h) para membrana de PVDF, que foi embebida em tampão de bloqueio (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, KCl a 2 mM, pH 7,4, 0,1% de Tween-20 contendo 5% de leite desnatado) durante 1 h. Para detecção das proteínas pró-colágeno I e colágeno I, anticorpos monoclonais anti-pró-colágeno I de camundongo (QED Bioscience Inc, San Diego, CA, EUA) e anti-colágeno I de camundongo (Sigma-Aldrich) foram utilizados a uma diluição de 1:500 em tampão de bloqueio. O protocolo de quimioluminescência (ECL kit, Amersham, Arlington Heights, IL, EUA) foi utilizado para revelar a reação em filme radiográfico (GE Technology, Boston, Massachusetts, EUA), conforme especificações do fabricante. A análise densitométrica das bandas foi realizada pelo programa *Image J* (criado por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, NIH, USA) e normalizada pela concentração total de proteína segundo Fisher et al., (1997), Sabatier et al., (2009) e Tandara et al., (2007). Foram realizados três experimentos independentes.

4.12 Expressão Proteica de Decorina, Fibrilina-1 e MMP-1 por Western Blot

Os níveis de expressão proteica das proteínas decorina, fibrilina-1 e MMP-1 em meio condicionado, dos grupos tratados e controles, foram analisados por *Western blot*. Após a quantificação de proteína pelo método BCA, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra contendo 0,3 M Tris-HCl, 5% SDS, 50% glicerol, 100 mM dithiothreitol (DTT) (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Para a detecção de decorina, as amostras foram pré-digeridas com condroitinase ABC (0,02 unidade/mL) a 37 °C durante 1 h.

Amostras (30 µg de proteínas) foram carregadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Novex NuPAGE 4-12% Bis-Tris do gel, Invitrogen) seguido da eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas (100 V, 250 mA por 2 h) para membranas de PVDF (Amersham). As membranas foram lavadas 3 vezes (10 min/cada) em TBS (0,02 M) e bloqueadas em tampão de bloqueio (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7,4, 0.1% Tween-20 contendo 5% leite desnatado) por 1 h. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-decorina (monoclonal de camundongo, 1:500, Sigma) ou anti-fibrilina-1 (monoclonal de camundongo, 1:500, Chemicon, Temecula, CA, EUA) ou anti-MMP-1 (monoclonal de coelho, 1:500, Chemicon).

Os anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho conjugados com peroxidase-HRP (Amersham) (1:2000 em tampão de bloqueio por 12 h a 4 °C sob agitação). O protocolo de quimioluminescência (ECL kit, Amersham) foi utilizado para revelar a reação em filme radiográfico (GE Technology), conforme especificações do fabricante. A análise densitométrica das bandas foi realizada pelo programa *Image J* e normalizada pela concentração total de proteína segundo Tandara et al., (2007). Foram realizados três experimentos independentes.

4.13 Expressão Proteica de Colágeno tipo I na Cultura Celular por ELISA

A quantidade de colágeno I depositado na cultura celular foi determinada pelo kit *Human Type I Collagen Detection* (Chondrex), baseado no método ELISA indireto. Um par de anticorpos monoclonais, IgM de rato anti-colágeno I humano nativo, foram utilizados como anticorpos de captura e detecção. Ambos os clones foram altamente específicos para a conformação nativa do colágeno de tipo I. Testes preliminares foram realizados a fim de assegurar que os peptídeos de colágeno do CH não pudessem ser detectados.

As células foram semeadas em placas de 6 poços (1×10^5 células/poço), sendo um poço reservado para a recuperação de colágeno (células + 2,5 µg de colágeno I padrão). As células foram tratadas com CH e depois de 48 h a camada celular foi dissociada extensivamente com 0,1 mL de ácido acético 0,05 M e transferida para tubo de microcentrifugado pré-bloqueado e, em seguida, digerido sequencialmente com pepsina (0,1 mg/mL em ácido acético 0,05 M) durante 24 h a 4 °C e elastase de pâncreas (0,1 mg / mL em ácido acético 0,05 M) durante 30 min a 37 °C. Após centrifugação (10 000 g durante 5 min), alíquota do sobrenadante foi colhida e imediatamente avaliada por ELISA. A condição ideal de digestão das amostras foi assegurada antes da análise por ELISA. Para tal, as amostras foram analisadas em gel SDS-6%, em condições não redutoras, utilizando colágeno tipo I como padrão. Amostras contendo bandas entre 100 e 300 kDa foram consideradas para adequadas para quantificação por ELISA (**Figura 16**).

Figura 16 - Bandas de proteínas detectadas por eletroforese em gel SDS-6%, em condições não redutoras, utilizando colágeno tipo I como padrão positivo (CO+). Amostras contendo bandas entre 100 e 300 kDa foram consideradas adequadas para quantificação por ELISA. CO = controle, amostras de células do grupo controle. 0,5 e 5,0 = concentrações (mg/mL) do CH, amostras de células do grupo tratado com CH.

A quantidade de colágeno tipo I foi determinada de acordo com o protocolo do fabricante. Cinquenta microlitros do anticorpo de captura foram adicionados aos poços apropriados da placa de 96 poços e incubou-se a 4 °C durante a noite. A placa foi lavada cuidadosamente com o tampão de lavagem. Diluições seriadas do colágeno I padrão foram preparadas variando entre 0,08 e 5 µg / mL. As amostras foram usadas sem diluição. 50 µL de amostras e padrões foram adicionados aos poços adequados e incubou-se a temperatura ambiente por 2 h. A placa foi lavada cuidadosamente com o tampão de lavagem. Em seguida, 50 µL de solução do anticorpo de detecção foram adicionados a cada poço e incubou-se a temperatura ambiente por 2 h. A placa foi novamente lavada com o tampão de lavagem. Subsequentemente, 50 µL de solução de peroxidase de estreptavidina foram adicionados a cada poço e incubou-se a temperatura ambiente por 1 hora, seguida da lavagem da placa e imediata adição de 100 µL de solução de OPD e incubação por 30 min a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2 N e a coloração detectada por espectrofotometria a 490 nm. Os valores de DO dos padrões contra a concentração de colágeno (µg/mL) foram traçados utilizando log/log para linearizar os dados. A concentração de colágeno I nas amostras foi calculada por meio

de análise de regressão. A recuperação de colágeno padrão foi calculada como se segue:

$$\% \text{ recuperação} = (\text{Col I}_{\text{poço de recuperação}} - \text{Col I}_{\text{controle}})/2.5 \times 100$$

4.14 Sublocalização do Pró-colágeno I por Imunofluorescência

Fibroblastos controles e tratados foram cultivados sobre lamínulas em placas de 35 mm de diâmetro, em densidade inicial de 2×10^4 células por placa, por 48 h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e submetidas a fixação com formaldeído 3,7%. As células utilizadas na análise do pró-colágeno tipo I foram permeabilizadas com 0,5% Triton X - 100, por 10 min. As células foram então bloqueadas com 1,0% de BSA por 30 min e subsequentemente incubadas com os anticorpos primário anti-pró-colágeno I 1:50 (policlonal de rato, Millipore) overnight em câmara úmida e escura a 4 °C. Em seguida, foram lavadas com PBS, acrescidas do anticorpo secundário (anti-rato Alexa488, 1:250) (Sigma), por 90 min, nas mesmas condições anteriores, porém em temperatura ambiente. Filamentos de actina foram corados usando faloidina TRITC. A seguir, as lamínulas foram montadas em lâminas com solução *anti-fading*.

As imagens foram obtidas por meio do microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), com lasers de argônio e hélio-neônio ligados a um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 100 M, usando lente objetiva com aumento de 40 x. A fluorescência emitida foi selecionada por um filtro LP 505 nm e exibida com uma resolução de 512 x 512 pixels, em modo RGB.

4.15 Análise da Atividade da Colagenase (MMP-1)

A análise da atividade da MMP-1 foi realizada no meio condicionado das culturas controle e tratadas por meio do kit ECM 710 (Chemicon), seguindo as orientações do fabricante. Este kit utiliza colágeno bovino biotinilado como substrato, o qual é prontamente clivado pela forma ativa da enzima MMP-1. Com a adição de um promotor de reação, fragmentos biotinilados são então detectados pela reação enzima-estreptavidina.

Numa placa de 96 poços, 50 µL de amostras de meio condicionado foram adicionados a cada poço, seguido de 30 µL de diluente de amostra 5X. Em seguida, 60 µL do colágeno tipo I nativo e biotinilado foram adicionados e incubados por 2 h a 37 °C. Após a adição do promotor de reação (10 µL) a placa foi incubada por mais 30 minutos a 37 °C. A placa contendo biotina foi reidratada e mantida a temperatura ambiente por 1 min. Em seguida, 100 µL da mistura (amostra + substrato de colagenase biotinilado) foram transferidos para a placa reidratada e incubados por 30 min a 37 °C. Após lavagem da placa, 100 µL da solução do conjugado enzima-estreptavidina (1:3000) foram adicionados a cada poço e incubou-se durante 30 min a 37 °C. Placa foi novamente lavada e 100 µL de solução do substrato foram adicionados e incubados a temperatura ambiente por 20 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução de bloqueio a cada poço e a DO foi detectada em espectrofotômetro a 450 nm. Os valores de DO do controle positivo (padrão de MMP-1 pré-ativado com p-Aminophenylmercuric acetate, APMA) em função da concentração de MMP-1 foram representados graficamente para calcular a quantidade de MMP-1 em ng nas amostras, utilizando análise de regressão.

4.16 Atividade das Enzimas MMP-2 e -9 por Zimografia

A atividade das enzimas MMP-2 e -9 nos meios condicionados dos fibroblastos tratados ou não com CH foi determinada por zimografia. Após a quantificação de

proteína, as amostras foram carregadas em gel de poliacrilamida contendo de 10% de gelatina. Foram carregados também os padrões de pesos moleculares e de MMPs (Chemicon). Após a eletroforese, o gel foi lavado com 2,5% Triton X-100 por 30 min, equilibrado com 10 mM Tris (pH 8,0), para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida, foi incubado a 37 °C em solução tampão reveladora contendo 50 mM Tris (pH 8,0), 5 mM CaCl₂ e 0,02% NaN₃, por 24 h. Depois de corado com 0,2% *Comassie Blue* (Amersham, USA) *overnight* e descorado com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada, o gel revelou as metaloproteinases ativas, que foram identificadas como bandas claras de lise em fundo azul.

Nas amostras controle e tratadas, as bandas de degradação enzimática obtidas na zimografia foram comparadas por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público *Image J*. Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos duas vezes. Os dados densitométricos foram expressos como média ± erro de média.

4.17 Expressão Gênica de Colágeno I (RNAm COL1A2) por PCR em tempo real

Fibroblastos foram semeados em garrafas de 25 mL na densidade de 1×10^5 células. No segundo dia de cultura, as células foram tratadas com CH por 12, 24 e 48 h ou mantidas em meio completo (controle) pelo mesmo período.

Os RNAs das culturas dos grupos controle e tratados foram extraídos utilizando o kit de extração *ChargeSwitch total RNA Cell Kit* (Invitrogen) e quantificados em um *NanoDrop ND1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

Para a análise do perfil de expressão, foram realizadas reações de RT-PCR em tempo real em um aparelho da Corbett Research *modelo Rotor Gene 6000 real-time cyclor* e o kit *AgPath-ID One-Step RT-PCR kit* (Applied Biosystems). As condições das PCRs em tempo real foram 45 °C por 10 min; 95 °C por 15 min, 40 ciclos [95 °C por 15 seg; 53 °C por 20 seg; 72 °C por 30 seg], seguindo então o *melting*. As temperaturas de anelamento foram determinadas especificamente para o par de primers utilizado.

Os primers utilizados foram: qCol2-left CTGCAAGAACAGCATTGCAT; qCol2-right GGCGTGATGGCTTATTTGTT que amplificam fragmentos de até 250 bases e a normalização foi feita pela massa total de RNA utilizada por reação, como sugerido por Bustin (2000, 2002).

4.18 Obtenção do equivalente dérmico

As matrizes dérmicas derivadas de FDHs foram geradas de acordo com a metodologia proposta por El Ghalbzouri et al., (2009), representada na **Figura 19**. FDH-FP foram semeados (4×10^5) em suporte de poliéster permeável (placas de 6 poços com 0,4 mm de tamanho do poro) (Transwell, Corning Incorporated, NY, EUA). As matrizes foram cultivadas por 3 semanas em meio de cultura de fibroblastos suplementado com 5% de SFB e 100 µg/mL de fosfato de ácido ascórbico (vitamina C fosfatada) (Sigma-Aldrich) sob condições submersas e por mais 2 semanas em meio de cultura sem fatores de crescimento, sob condições submersas. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias durante todo período da cultura e coletado, dializado e concentrado para a quantificação de colágeno I por ELISA conforme descrito no item 4.13.

Figura 17 – Representação esquemática do método de obtenção das matrizes dérmicas derivadas unicamente de fibroblastos dérmicos humanos. SFB= soro fetal bovino. VitC= fosfato de ácido ascórbico. MET= microscopia eletrônica de transmissão.

4.19 Ensaio de Estimulação com CH em Modelo 3D de Equivalente Dérmico

Para os ensaios de estimulação (no 22º dia de cultura), as matrizes dérmicas foram mantidas em meio livre de SFB, suplementado com 0,5 ou 5,0 g/mL de CH em associação ou não com 100 mg/mL de vitamina C fosfatada por 24 e 48 h. As matrizes controles foram mantidas em meio livre de SFB suplementado com vitamina C, mas sem CH, conforme mostra a **Figura 20**.

Figura 18 – Representação esquemática do ensaio de estimulação com colágeno hidrolisado (CH) em equivalente dérmico humano. SFB= soro fetal bovino. VitC= fosfato de ácido ascórbico.

4.20 Microscopia Eletrônica de Transmissão

No 22º dia de cultura, as matrizes dérmicas foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) a fim de assegurar a formação adequada do equivalente dérmico. As matrizes foram cortadas em blocos pequenos de 1 mm³, lavadas 2 vezes (por 5 min cada) em temperatura ambiente com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,5) e fixadas em 2% de glutaraldeído (em 0,1 M de tampão de cacodilato de sódio pH 7,5) por 2 h. Em seguida, as matrizes foram lavadas em 0,1 M de tampão de cacodilato de sódio (pH 7,5) e pós-fixadas em 1% tetróxido de ósmio no mesmo tampão. As matrizes foram desidratadas gradualmente em etanol (30, 50, 70, 95 e 100%, 15 min/cada). A infiltração em resina foi realizada pela mistura de etanol e EPON812 (75%:25%) por 30 min, seguida pela resina graduada (50 e 100% 3 vezes no misturador em todo processo). As matrizes permaneceram na resina (100%) *overnight*. Posteriormente, seguiu-se a polimerização por 48 h. Secções finas foram produzidas usando ultramicrotomo e estas foram coradas com *Toluidine Blue* e visualizados ao microscópio de luz. Escolhida a região de interesse no bloco, foram feitos cortes na espessura de 70 a 90 nm, sendo posteriormente colocados em telas de cobre (200 *mesh*). O material foi contrastado em uma solução de acetato de

uranila a 4% por 30 minutos, posteriormente lavado em água e colocado em uma solução de citrato de chumbo a 10%. Após ser novamente lavado, retirou-se o excesso de água destilada e as telas de cobre foram acondicionadas em porta-telas e mantidas em ambiente resfriado. O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

4.21 Análise Estatística

Dados foram analisados usando o programa Minitab, versão 15.1.1.0 (Minitab Inc, State Collage, PA, USA). Todas as variâncias nas medições dos dados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média, foram checados para homogeneidade pelo teste de Normalidade. Diferenças entre os grupos controle e tratados foram avaliadas por ANOVA, seguida de comparação múltipla Tukey-Kramer's. Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle (sem tratamento).

5 RESULTADOS

5.1 Culturas Primárias de Fibroblastos Dérmicos Humanos (FDHs)

Os FDHs-FP e -FE foram isoladas a partir de explantes de pele, estabelecendo-se, portanto, culturas primárias de curta duração. Ao microscópio invertido de contraste de fases, os FDHs apresentaram morfologia característica, apresentando-se como células alongadas, fusiformes, núcleos claros e ovais e com numerosas expansões citoplasmáticas irregulares (**Figura 19**).

Figura 19 – Morfologia característica dos fibroblastos dérmicos humanos utilizados neste estudo. Imagem representativa das culturas derivadas de áreas fotoprotegida (FDHs-FP) e fotoexposta (FDHs-FE), ao microscópio invertido de contraste de fases. As células apresentaram-se com formato alongado, fusiforme, núcleos claros e ovais (setas) e expansões citoplasmáticas irregulares (estrela).

Embora o objetivo deste trabalho não tenha sido caracterizar as culturas primárias de ambas as áreas, alguns achados interessantes foram observados durante a obtenção destas culturas que merecem ser apresentados (**Figura 20**).

Como esperado, as primeiras células a migrarem dos explantes de pele de mama foram os fibroblastos, que apareceram na terceira semana, e nenhum outro tipo celular foi observado durante todo o período de cultura (**Figura 20A**). Ao contrário, e surpreendentemente, as primeiras células a crescerem dos explantes de pele de pálpebra foram células com morfologia típica de célula epitelial em cultura, formando grupos de células justapostas, provavelmente queratinócitos (**Figura 20B**).

RESULTADOS

Neste caso, estas células apareceram naturalmente logo na segunda semana de cultura, sem qualquer alteração do meio de cultura utilizado, enquanto os fibroblastos começaram a migrar e a aderir na terceira semana. À medida que os fibroblastos proliferavam, os queratinócitos sofriam processo de morte celular e se desprendiam da garrafa.

Figura 20 – Fotomicrografia das culturas primárias de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) utilizados neste estudo. Imagens representativas, ao microscópio invertido de contraste de fase. **(A)** FDHs-FP, derivados de área fotoprotegida (mama). **(B)** FDHs-FE, derivados de área fotoexposta (pálpebra). Nas culturas de FDHs-FP **(A)**, os fibroblastos foram as primeiras células a migrarem do explante e aderirem na garrafa de cultivo e o único tipo celular presente durante todo o período de cultura; enquanto nas culturas de FDHs-FE **(B)**, células do tipo epitelial, denominadas queratinócitos, foram as primeiras células a migrarem e aderirem e, posteriormente, os fibroblastos.

5.2 Curva de Crescimento Celular

Relativamente ao perfil de crescimento de ambas as culturas, após subcultura, as células apresentaram padrão de crescimento característico no período de 12 dias de cultivo, passando fundamentalmente pelas três fases (**Figura 21**), fase *lag* ou de adaptação, fase *log* ou exponencial, e fase platô ou estacionária.

Durante a fase *lag* não houve variação relevante no número de células. Após esta fase, os FDHs proliferam exponencialmente até o 6º dia atingindo a confluência da monocamada celular (**Figura 22**), seguida da fase estacionária, ou seja, platô, no número de células. A fase exponencial é o período no qual a multiplicação celular é máxima e constante e de maior viabilidade e atividade metabólica e, por isso, a densidade inicial de células para realização dos ensaios de estimulação e o tempo para os tratamentos foram estabelecidos com base na fase exponencial da curva de crescimento.

Figura 21 - Curva de crescimento celular representativa dos fibroblastos dérmicos humanos utilizados neste estudo. **Fase lag**: fase de adaptação; **Fase log**: fase exponencial; **Platô**: fase estacionária.

Figura 22 – Confluência da monocamada celular de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs). Fotomicrografias representativas, ao microscópio investido de contraste de fase, após 6 dias em cultura. As imagens mostram toda superfície de crescimento disponível na garrada de cultura ocupada pelas células e todas as células em contato com células vizinhas. **(A)** FDHs derivados de área fotoprotetida. **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta.

5.3 Viabilidade celular

A viabilidade de FDHs tratados com CH no intervalo de concentração de 0,05 a 20,0 mg/mL pelo período de 24, 48 e 72 h está apresentada na **Figura 23**. O ensaio de MTT é um indicador colorimétrico da viabilidade celular, avaliando-se a função mitocondrial da célula. Este ensaio permitiu avaliar a citotoxicidade do CH, sendo possível determinar, a priori, a concentração a ser utilizada e o tempo de tratamento, além de fornecer informações quanto a possíveis danos celulares.

Conforme podemos observar na **Figura 23**, nenhuma concentração do CH diminuiu a viabilidade celular em nenhum dos períodos de tratamento, excluindo-se qualquer efeito citotóxico do CH sobre os FDHs. Ao contrário, após 48 h de tratamento, concentrações superiores a 0,5 mg/mL promoveram aumento significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular em relação às células do grupo controle. Na concentração de 0,05 mg/mL e no tempo de 48 h, a viabilidade celular aumentou em 27% em relação ao grupo controle, atingindo 50% de aumento na concentração de 5,0 mg/mL. E este padrão de resultado foi mantido após 72 h de tratamento. Nas concentrações acima de 5,0 mg/mL (10, 15 e 20 mg/mL), o percentual de viabilidade celular decresceu, porém se manteve significativamente superior ao controle. Desta forma, o intervalo de concentração determinado para os ensaios de estimulação com o CH foi de 0,5 mg/mL a 5,0 mg/mL e o período de tratamento estipulado foi de 48 h.

Figura 23 – Percentual da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos normais (linhagem comercial CCD-1059Sk). Tratamento com colágeno hidrolisado no intervalo de concentração de 0,05 a 20 mg/mL por 24, 48 e 72 h. Percentual de viabilidade relativo ao controle 100%. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes em triplicata de amostras. * P<0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle.

5.4 Aspectos Morfológicos de Privação de SFB

A morfologia dos fibroblastos após 24, 48 e 72 h de tratamento com CH em meio privado de SFB foi avaliada. Não houve alteração da morfologia dos FDHs-FP e -FE nos períodos de 24 e 48 h de privação de SFB associado ao tratamento com CH (dados não mostrados). As células mantiveram formato fusiforme, prolongamentos citoplasmáticos irregulares, núcleo grande, claro e ovóide, indicando a manutenção do padrão morfológico e, conseqüentemente, de sua atividade essencial de síntese. A morfologia das células -FP também foi mantida inalterada no tempo de 72 h (**Figura 24A**). No entanto, após 72 h, os FDHs-FE dos grupos controle e CH 0,5 e 1,0 mg/mL sofreram alteração do padrão morfológico, conforme apresentado na **Figura 24B**. As células assumiram forma ovalada, menor número de prolongamentos citoplasmáticos, núcleo pequeno e escuro, tornando-se aparentemente células quiescentes do tipo fibrócitos, sugerindo diminuição da atividade de síntese. Já os FDHs-FE tratados com as concentrações mais elevadas de CH (2,5 e 5,0 mg/mL) não

RESULTADOS

apresentaram alteração morfológica (**Figura 24B**). Estes dados auxiliaram na validação do período de tratamento para os ensaios de proliferação e estimulação do metabolismo em 48 h, garantindo a manutenção da morfologia das células mediante a privação de SFB por 48 h.

RESULTADOS

Figura 24 – Morfologia dos fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) cultivados por 72h em situação de privação de soro fetal bovino. (A) FDHs derivados de área fotoprotegida (-FP, mama). (B) FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). Controle = células não tratadas. CH (0,5 - 5,0 mg/mL) = tratadas com colágeno hidrolisado.

5.5 Proliferação Celular

A influência da suplementação com CH na proliferação celular foi avaliada pela contagem do número de células nas culturas, ciclos de divisão celular e replicação de DNA, por citometria de fluxo.

A **Figura 25** nos mostra os resultados referentes ao número de células nas culturas. Podemos notar que o número de células aumentou exponencialmente ao longo do período de tratamento de 96 h em todos os grupos controles e tratados, como esperado. Porém, o CH não aumentou de forma estatisticamente significativa ($p > 0,05$) o a densidade celular em relação ao controle em ambas as culturas.

RESULTADOS

A **B**

Figura 25 – Contagem do número de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) ao longo de 96 h de cultura. Meio suplementado ou não com colágeno hidrolisado nas concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL. (A) FDHs derivados de área fotoprottegida (-FP, mama). (B) FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO = controle (células não tratadas). Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em duplicata.

RESULTADOS

Além disto, a modulação da proliferação pelo tratamento com CH foi avaliada pela análise dos ciclos de divisão celular, usando marcação das células com o corante CFSE. Este corante é distribuído igualmente entre células-filhas por até quatro ciclos de divisão celular. A **Figura 26** ilustra a análise de *Dot Plot* dos dados (*Green fluorescence versus Red fluorescence*) obtidos com o grupo controle e CH 5,0 mg/mL, sendo representativo para os demais grupos. Os dados foram agrupados em quatro quadrantes, sendo inferior esquerdo, inferior direito, superior esquerdo e superior direito, definidos para contagem do percentual das células em proliferação, repouso, morte e morte estimulada, respectivamente.

Figura 26 – Análise *Dot plot* de citometria de fluxo do ensaio de proliferação celular por ciclos de divisão celular de fibroblastos dérmicos humanos. Ensaio realizado usando o corante CFSE (kit *Guava CellGrowth*). Quadrante inferior esquerdo: **Proliferação**= células coradas, negativas para iodo de propídio (IP) e que proliferaram. Quadrante inferior direito: **Repouso**= células coradas, negativas para IP, quiescentes. Quadrante superior esquerdo: **Morte**= células coradas, positivas IP, mortas. Quadrante superior direito: **Morte estimulada**= células coradas, positivas IP, estimuladas e mortas. **CH** = colágeno hidrolisado. **Controle**= células sem tratamento. **CH 5,0 mg/mL**= células tratadas com 5,0 mg/mL de CH por 48 h. Resultados representativos das demais concentrações de CH e de ambas as culturas celulares.

Na **Figura 27**, está representado o histograma de citometria de fluxo referente à fluorescência do CFSE (verde). As células foram coradas com CFSE na intensidade de fluorescência ajustada em 10^2 , previamente ao plaqueamento e tratamento, mantendo um grupo de células sem coloração (branco, entre 10^0 e 10^1). Podemos observar que os histogramas dos grupos controle e tratados com CH foram muito similares. Em todos os grupos, inclusive no grupo controle, ocorreu decaimento da fluorescência ($< 10^2$) após 48 h do período de tratamento, indicando proliferação normal das células, porém sem influência da suplementação com CH.

RESULTADOS

Figura 27 – Histograma de citometria de fluxo da proliferação celular dos fibroblastos dérmicos humanos, por ciclos de divisão celular (kit *Guava CellGrowth*), referente a intensidade de fluorescência verde (CFSE). **Branco**= células controle sem coloração. **Coloração**= células coradas e plaqueadas antes do tratamento. **CO**= Controle, células coradas e mantidas em meio completo sem tratamento com colágeno hidrolisado (**CH**). **CH (0,5 a 5,0 mg/mL)** = células coradas e tratadas com CH nas concentrações de 0,5 a 5,0 mg/ml. Histograma representativo das duas culturas celulares.

Conforme o gráfico representado na **Figura 28**, a suplementação com CH não alterou o percentual de células em nenhum dos quadrantes, em nenhuma das concentrações estudadas, em relação ao controle. Portanto, o CH não induziu divisão celular nem morte em ambas as culturas de células, já que a porcentagem de células não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) do controle (**Figura 28**).

Figura 28 – Proliferação celular por ciclos de divisão celular de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs). Porcentagem de células que proliferaram, em repouso, em morte celular ou morte estimulada, após 48 h de tratamento com colágeno hidrolisado nas concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL. **(A)** FDHs derivados de área fotoprotegida (-FP, mama). **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (sem tratamento).

RESULTADOS

Finalmente, a porcentagem de células que incorporaram o análogo da timidina – EdU – durante a síntese de DNA (fase S) também foi determinada após 48 h de tratamento e, novamente, o CH não teve influência na proliferação dos fibroblastos de ambas as regiões do corpo. A **Figura 29** mostra a semelhança do perfil de histograma do grupo controle e dos grupos tratados com CH, enquanto a **Figura 30** mostra que não houve alteração significativa ($p>0.05$) do percentual de células que proliferaram entre os grupos controle e tratados com CH.

RESULTADOS

Figura 29 – Histograma de citometria de fluxo da proliferação celular dos fibroblastos dérmicos humanos, por incorporação de análogo de timidina (EdU) ao DNA (*Click-iT EdU Flow Cytometry*), referente a intensidade de fluorescência verde (EdU, Alexa Fluor 488 azida). **Branco**= células controle sem coloração. **Controle**= células coradas e mantidas em meio completo sem tratamento com colágeno hidrolisado (CH). **CH (0,5 a 5,0g/mL)**= células coradas e tratadas com CH. Histograma representativo das duas culturas celulares.

RESULTADOS

Figura 30 – Proliferação de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) no ensaio de incorporação de EdU durante a síntese de DNA. Percentual de células que proliferaram e que não proliferaram (positivas para iodeto de propídio), após 48 h de tratamento com colágeno hidrolisado. **(A)** FDHs derivados de área fotoprotegida (-FP, mama). **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (células não tratadas). Cada coluna representa a média $\pm$ DP de três experimentos feitos em duplicata.

5.6 Cinética de Deposição de Colágeno Total

A quantificação do conteúdo de colágeno total depositado na cultura celular ao longo de 96 h de tratamento com CH está apresentada na **Figura 31**.

A quantidade de proteínas colágenas depositada no grupo controle, de ambas as culturas celulares, aumentou gradualmente ao longo de 96 h, conforme esperado. No entanto, os fibroblastos de ambas as culturas suplementados com CH notadamente e significativamente ($p < 0,01$) aumentaram o conteúdo de colágeno após 48 h de tratamento. Nos FDHs-FP, os efeitos do CH apareceram a partir da concentração de 2,5 mg/mL, elevando a a quantidade de colágeno ao máximo de 1,6 vezes do controle (**Figura 31A**). Por outro lado, os efeitos do CH foram mais pronunciados nos FDHs-FE (**Figura 31B**), os quais elevaram o conteúdo de colágeno a partir da menor concentração de CH (0,5 mg/mL), seguindo um efeito dose-resposta. Na concentração de 0,5 mg/mL de CH, a síntese de colágeno foi aumentada em 1,7 vezes em relação ao controle, atingindo 2,3 vezes do controle na concentração de 5,0 mg/mL. Embora a deposição de colágeno tenha apresentado tendência de aumento ao longo de 96 h de tratamento em ambas as culturas, os efeitos do CH expressivamente ocorreram no tempo de 48 h e não houve diferença estatística em relação aos tempos posteriores investigados.

RESULTADOS

Figura 31 – Deposição de colágeno total nas culturas de fibroblastos derivados de pele humana (FDHs) ao longo de 96 h de tratamento com colágeno hidrolisado. **(A)** FDHs derivados de área fotoprottegida (-FP, mama). **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (células não tratadas). Cada coluna representa a média $\pm$ DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,01$ - estatisticamente diferente do controle.

5.7 Conteúdo de Colágeno tipo I Depositado na Cultura Celular

A determinação da quantidade de colágeno tipo I na cultura celular pelo método ELISA baseou-se na curva padrão de colágeno tipo I, conforme **Figura 32**. A curva padrão apresentou tendência linear adequada com valor de coeficiente de determinação R^2 próximo a 1. Além disto, foi determinado o percentual de recuperação do padrão de colágeno, para garantir processo adequado de extração do colágeno I da monocamada celular. O percentual de recuperação médio do padrão do colágeno I foi de aproximadamente 80%.

$$\text{Recuperação de colágeno I (\%)} = (\text{Col}_{\text{total}} - \text{Col}_{\text{control}}) / 2.5 \times 100$$

$$\% \text{ recuperação} = 84,32$$

Figura 32 – Curva padrão de colágeno tipo I e percentual de recuperação de colágeno representativos para determinação da quantidade de colágeno I nas culturas de fibroblastos dérmicos humanos tratados ou não (controle) com colágeno hidrolisado.

Os resultados referentes à quantidade de colágeno I detectado nas culturas podem ser vistos na **Figura 33**. Similarmente ao que encontramos em relação à deposição de colágeno total, o tratamento com CH por 48 h aumentou significativamente a síntese de colágeno tipo I pelos FDHs-FP e -FE. Novamente, o aumento significativo ($p < 0,05$) do conteúdo de colágeno I ocorreu nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL de CH nos FDHs-FP (**Figura 33A**), alcançando o máximo de 1,3

RESULTADOS

vezes do controle. Nos FDHs-FE (**Figura 33B**), o CH atuou a partir de 0,5 mg/mL, aumentando a síntese de colágeno I com tendência dose-resposta, porém a quantidade de colágeno I foi significativamente maior do que o controle a partir de 1,0 mg/mL, superando em 2 vezes o valor do controle na concentração máxima de 5,0 mg/mL.

A **B**

Figura 33 – Conteúdo de colágeno tipo I relativo na cultura celular de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), detectado por ELISA, após tratamento com colágeno hidrolisado por 48 h. **(A)** FDHs derivados de área fotoprotetida (-FP, mama). **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO = controle (células não tratadas). Dados relativos ao grupo controle igual a 1. Cada coluna representa a média $\pm$ DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ - estatisticamente diferente do controle.

5.8 Expressão de Proteínas da MEC em Meio Condicionado

A expressão proteica de pró-colágeno I, colágeno I, decorina, fibrilina-1 e MMP-1 em meio condicionado dialisado e concentrado foram determinadas por *Western blot* e os *immunoblottings* representativos podem ser vistos nas **Figuras de 34 a 38**.

Nos resultados, é possível observar que FDHs-FP tratados com 2,5 e 5,0 mg/mL de CH significativamente ($p < 0,05$) expressaram mais pró-colágeno I (**Figura 34A**) e colágeno I (**Figura 35A**) do que as células do grupo controle. No entanto, a suplementação com CH não influenciou de maneira estatisticamente significativa ($p > 0,05$) a densitometria das bandas referentes à expressão de decorina (**Figura 36A**), fibrilina-1 (**Figura 37A**) e MMP-1 (**Figura 38A**) nestas mesmas células.

Os FDHs-FE aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a expressão de pró-colágeno I (**Figura 34B**) e colágeno I (**Figura 35B**) em todas as concentrações de CH em relação ao grupo controle. A expressão de decorina apresentou tendência de aumento de maneira dose-resposta pelo tratamento com o CH (**Figura 36B**), enquanto a expressão de fibrilina-1 (**Figura 37B**) e MMP-1 (**Figura 38B**) apresentaram discreta tendência de aumento e diminuição, respectivamente, porém a densitometria das bandas não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

RESULTADOS

Figura 34 – *Immunoblottings* representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de pró-colágeno I em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48 h. **(A)** FDHs derivados de área fotoprottegida (-FP, mama). **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (sem tratamento). *Immunoblotting* representativo de três ensaios independentes para cada cultura. Cada coluna do gráfico de densitometria corresponde à média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A densitometria das bandas foi normalizada pela proteína total. * $p < 0,05$ - estatisticamente diferente do controle.

RESULTADOS

Figura 35 – *Immunoblottings* representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de colágeno I em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48 h. (A) FDHs derivados de área fotoprottegida (-FP, mama). (B) FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (sem tratamento). *Immunoblotting* representativo de três ensaios independentes para cada cultura. Cada coluna do gráfico de densitometria corresponde à média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A densitometria das bandas foi normalizada pela proteína total. * $p < 0,05$ - estatisticamente diferente do controle.

RESULTADOS

Figura 36 – *Immunoblottings* representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de decorina em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48 h. **(A)** FDHs derivados de área fotoprottegida (-FP, mama). **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (sem tratamento). *Immunoblotting* representativo de três ensaios independentes para cada cultura. Cada coluna do gráfico de densitometria corresponde à média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A densitometria das bandas foi normalizada pela proteína total.

RESULTADOS

Figura 37 – *Immunoblottings* representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de fibrilina-1 em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48 h. **(A)** FDHs derivados de área fotoprottegida (-FP, mama). **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (sem tratamento). *Immunoblotting* representativo de três ensaios independentes para cada cultura. Cada coluna do gráfico de densitometria corresponde à média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A densitometria das bandas foi normalizada pela proteína total.

RESULTADOS

Figura 38 – *Immunoblottings* representativos e densitometria das bandas relativas a expressão de MMP-1 em meio condicionado por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), após tratamento com colágeno hidrolisado por 48 h. (A) FDHs derivados de área fotoprottegida (-FP, mama). (B) FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (sem tratamento). *Immunoblotting* representativo de três ensaios independentes para cada cultura. Cada coluna do gráfico de densitometria corresponde à média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A densitometria das bandas foi normalizada pela proteína total.

5.9 Distribuição Subcelular de Pró-Colágeno I

Com a técnica de imunofluorescência, a localização/distribuição subcelular de pró-colágeno I após estímulo com CH foi visualizada por microscopia confocal de varredura a laser. Imagens representativas podem ser vistas na **Figura 39**. A marcação positiva mostrou distribuição perinuclear do pró-colágeno I no grupo controle de ambas as culturas celulares. A suplementação com CH na concentração de 2,5 mg/mL promoveu aumento na intensidade de marcação e maior distribuição do pró-colágeno I em ambas as culturas. A concentração de 5,0 mg/mL especialmente promoveu uma marcação intensa de pro-colágeno perinuclear e maior distribuição citoplasmática em ambas as culturas. Estes resultados mostraram o aumento na biosíntese de pró-colágeno I, promovidos pelo CH em relação às células controle, em ambas as culturas.

Figura 39 – Imagens de imunofluorescência por microscopia confocal de varredura a laser de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs). (A) FDHs derivados de área fotoprotegida (-FP, mama). (B) FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). Células foram tratadas ou não com colágeno hidrolisado em diferentes concentrações por 48 h. Marcação positiva para pró-colágeno I (verde) e citoesqueleto - filamentos de actina (vermelho). CO= controle. CH (0,5 a 5,0 mg/mL) = células coradas e tratadas com CH nas concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL. Imagens representativas de três experimentos independentes em duplicata para cada cultura.

RESULTADOS

Surpreendentemente, foi possível observar, em uma das repetições do experimento, a secreção de pró-colágeno I pelas células de FDHs-FP tratadas com CH na concentração 2,5 mg/mL, mostrado na **Figura 40**. Neste experimento, além de maior intensidade e distribuição de pró-colágeno I intracelular, marcação positiva de pró-colágeno I foi detectada fora da célula, indicando claramente a secreção e distribuição desta proteína pelos fibroblastos para o ambiente extracelular. Este achado não foi observado em outras concentrações de CH e nem na cultura de FDHs-FE. Embora o mesmo tenha sido observado apenas em uma das repetições deste experimento, não consideramos artefato, visto que pelo menos 15 células foram observadas e estes resultados se repetiram consistentemente.

Figura 40 – Imagens de imunofluorescência por microscopia confocal de varredura a laser de fibroblastos dérmicos humanos derivados de área fotoprottegida (FDHs-FP, mama). As imagens mostram a secreção de pró-colágeno I pelas células tratadas com 2,5 mg/mL de colágeno hidrolisado por 48 h. Marcação positiva para pró-colágeno I (verde) e citoesqueleto - filamentos de actina (vermelho). Imagens representativas de, pelo menos, 15 observações.

5.10 Expressão Gênica de Colágeno I (COL1A2 RNAm)

A análise da expressão de RNAm para colágeno I (COL1A2 RNAm) em cultura de FDHs-FP e -FE, após tratamento com CH por 12, 24 e 48 h foi feita por RT-PCR em tempo real e está demonstrada na **Figura 41**. O tratamento com CH, independentemente da concentração, não influenciou significativamente a expressão gênica em nenhum dos tempos estudados, em ambas as culturas de FDHs. Tendência no aumento da expressão de RNAm para colágeno I foi observada na cultura de FDH-

RESULTADOS

FP tratada com 5,0 mg/mL de CH após 12 h e 24 h e discreta tendência de aumento na cultura FDHs-FE nas mesmas condições (**Figura 41A**), porém os resultados não atingiram significância estatística em relação ao grupo controle.

Figura 41 – Expressão de RNAm para colágeno I (COL1A2 RNAm) em cultura de fibroblastos dérmicos humanos após tratamento com CH nas concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL por 12, 24 e 48 h. Análise feita por RT-PCR em tempo real. **(A)** FDHs derivados de área fotoprotegida (-FP, mama). **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). Expressão relativa ao grupo controle igual a 1. Cada coluna representa a média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

5.11 Atividade de MMP-1 e MMP-2 e -9 em Meio Condicionado

Os níveis da collagenase MMP-1 em meio condicionado dialisado e concentrado foram determinados por método colorimétrico baseado na reação biotina-streptavidina e quantificado com base na curva padrão MMP-1. A curva analítica do padrão de MMP-1 apresentou tendência polinomial de segunda ordem com coeficiente de determinação (R^2) próximo de 1 (**Figura 42**).

Figura 42 – Curva padrão de MMP-1 utilizada para quantificar os níveis de MMP-1 no meio condicionado de cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

A **Figura 43** revela os níveis da collagenase MMP-1 no meio condicionado das culturas de FDHs-FP e -FE. Embora a suplementação com CH não tenha influenciado a expressão proteica de MMP-1 nos ensaios de *Western blot*, efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do CH na diminuição da atividade de MMP-1 foi observado na concentração mais elevada de 5,0 mg/mL, em relação ao grupo controle. Em ambas as culturas, houve tendência de diminuição da atividade de MMP-1 com aumento da concentração de CH, porém os resultados só atingiram significância estatística na concentração de 5,0 mg/mL.

RESULTADOS

Figura 43 – Quantidade de MMP-1 ativa no meio condicionado de cultura de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) após 48 h de tratamento com concentrações de colágeno hidrolisado de 0,5 a 5,0 mg/mL. Determinação feita por método colorimétrico baseado na reação biotina-streptavidina. **(A)** FDHs derivados de área fotoprotegida (-FP, mama). **(B)** FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (sem tratamento). Cada coluna corresponde à média $\pm$ DP de três experimentos independentes em duplicata. * $p < 0,05$ estatisticamente do controle.

A atividade das gelatinases (MMP-2 e -9) foi avaliada por zimografia em gel de gelatina (**Figura 44**). A zimografia de gelatina revelou bandas gelatinolíticas correspondentes às massas moleculares das MMPs -2 e -9 do controle positivo de MMP2 e -9, como demonstrado na **Figura 44**. Em ambas as culturas de FDHs, concentrações de CH a partir de 1,0 mg/mL foram associadas a diminuição significativa da atividade de MMP-2 em comparação às culturas controle, como determinado pela densitometria das bandas e ilustrados pelo zimograma representativo na **Figura 44**. A atividade da MMP-9 não foi influenciada pelo tratamento com CH em fibroblastos das duas regiões do corpo.

Figura 44 – Zimogramas e densitometria das bandas genatinolíticas para determinação a atividade das MMPs -2 e -9 em meio condicionado de culturas de fibroblastos dérmicos (FDHs) tratados com colágeno hidrolisado nas concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL por 48 h. (A) FDHs derivados de área fotoprottegida (-FP, mama). (B) FDHs derivados de área fotoexposta (-FE, pálpebra). CO= controle (células não tratadas). MMP+ = controle positivo, MMP-1 padrão. Cada coluna representa a média $\pm$ DP de três experimentos independentes. Zimogramas representativos foram obtidos de três experimentos independentes para cada cultura. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

5.12 Equivalente Dérmico: Obtenção do Modelo 3D de Matriz Dérmica Humana

Durante a cultura da matriz dérmica derivada exclusivamente de FDHs, o conteúdo de colágeno tipo I secretado no meio condicionado foi detectado ao longo de três semanas, por ELISA. Os dados estão demonstrados na **Figura 45**. Podemos observar aumento gradual do conteúdo de colágeno I secretado até a terceira semana de cultura (22 dias), quando quantidades adequadas de colágeno I ($0,33 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) foram secretadas pelos fibroblastos para formação de um equivalente de derme funcional. Portanto, este foi o tempo de cultura necessário para obtenção do equivalente de derme para posterior ensaio de estimulação com CH.

Figura 45 – Conteúdo de colágeno I secretado no meio condicionado da matriz dérmica derivada exclusivamente de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs), ao longo de 22 dias. Os FDHs foram derivados de culturas primárias de células de área fotoprotégida (pele de mama). Quantidade de colágeno I foi detectada por ELISA. Cada coluna representa média $\pm$ desvio padrão de três ensaios independentes em duplicata.

Para assegurar a formação de um equivalente dérmico funcional, amostras do equivalente dérmico foram analisadas por MET e as imagens estão representadas na **Figura 46**. A MET revelou a presença de fibrilas de colágeno uniformes na MEC (**Figura 46 A, B, E, F**), notável rede de fibrilas de colágeno (**Figura 46 C, D**), indicando produção normal desta proteína; e notável presença de vesículas concentradas na região próxima à membrana celular (**Figura 46 F**), sugerindo atividade secretora. Foi possível, ainda, observar as bandas claras e escuras das fibras de colágeno (**Figura 46D**) devido às regiões de sobreposição das moléculas do colágeno (tropocolágeno). Devido à estrutura do empacotamento do tropocolágeno, a fibra colágena aparece, na microscopia eletrônica, com bandas claras e escuras, sendo que as escuras representam as regiões lacunares, preenchidas por metal pesado, e as claras, regiões de sobreposição, onde o metal pesado não se deposita. Esse arranjo é determinado pelo estabelecimento de ligações covalentes entre os terminais amino (N) de uma molécula de tropocolágeno e carboxil (C) da outra, chamadas pontes cruzadas.

Os resultados da MET confirmaram a formação propriamente dita do equivalente dérmico e rede tridimensional da MEC, permitindo-nos avançar com os ensaios de estimulação com CH.

Figura 46 – Ultraestrutura do equivalente dérmico humano derivado de matriz dérmica produzida exclusivamente por fibroblastos dérmicos humanos (FDHs). Os FDHs foram derivados de culturas primárias de células de área fotoprotegida (pele de mama). (A-F) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Vista superior (A,B) mostrando a presença de fibrilas de colágeno uniformes em orientação transversal na matriz extracelular (MEC) (asteriscos). Vista superior (C,D) mostrando a notável formação rede tridimensional de fibras de colágeno, indicando o processo normal de síntese de colágeno. Destaque para a observação das zonas de bandeamento (claro e escuro) das fibras de colágeno (D). Vista inferior (E,F) mostrando a presença de fibras de colágeno na MEC (asterisco) em orientação longitudinais e a presença de vesículas (setas), sugerindo atividade secretora.

5.13 Equivalente Dérmico – Tratamento com Colágeno Hidrolisado

Os efeitos do CH na secreção de colágeno I por FDHs em modelo 3D de equivalente dérmico humano estão apresentados na **Figura 47**. Duas concentrações de CH foram estudadas (0,5 mg/mL e 5,0 mg/mL) em associação ou não com vitamina C. O tratamento com a menor concentração de CH não influenciou significativamente ($p>0,05$) a secreção de colágeno em relação ao grupo controle após os dois períodos de tempo estudados, mesmo quando associado a vitamina C.

A maior concentração de CH (5,0 mg/mL) promoveu aumento significativo ($p<0,05$) na secreção de colágeno I após 48 h de tratamento, elevando em média aproximadamente 70% a produção de colágeno I pelos FDHs, em comparação ao grupo controle. Quando associado a vitamina C, esta concentração de CH aumentou em 30% a quantidade de colágeno I secretado após 24 h de tratamento, porém este aumento não foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p>0,05$). No entanto, após o período de 48 h, a associação ocasionou aumento pronunciado e significativo ($p<0,01$) de aproximadamente 80% na secreção de colágeno I.

RESULTADOS

Figura 47 – Secreção de colágeno tipo I por fibroblastos dérmicos humanos no modelo 3D de equivalente dérmico humano, após 24 e 48 h de tratamento com 0,5 e 5,0 mg/mL em associação ou não com vitamina C. Colágeno I quantificado por ELISA. Cada coluna representa média $\pm$ DP de três ensaios independentes em duplicata.

6 DISCUSSÃO

A fisiologia da pele humana sofre alterações ao longo da vida que se manifestam como sinais clínicos do envelhecimento. Estes sinais, tanto do envelhecimento cronológico quanto do fotoenvelhecimento, são decorrentes, sobretudo, das deficiências do metabolismo celular e degradação dos componentes da MEC dérmica (Fisher et al., 2002).

Há muito tempo relata-se a influência de nutrientes no metabolismo cutâneo e seus potenciais efeitos na prevenção ou, até mesmo, na melhora dos sinais do envelhecimento da pele. No entanto, somente nos últimos 10 anos, na era conhecida como pós-genoma humano, as pesquisas nesta área intensificaram-se expressivamente, comprovando a capacidade não só dos nutrientes, mas também dos compostos bioativos dos alimentos na modulação das funções celulares e moleculares da pele (Espíndola et al., 2005; Fialho et al., 2008; Kaput, Rodriguez, 2004; Moreno et al., 1995; Naves et al., 2001; Ong et al., 2006).

O CH é um dos compostos que vêm sendo estudados nos últimos anos e tem apresentado efeitos funcionais e benéficos na pele, especialmente na melhora dos sinais clínicos do envelhecimento (Proksch et al., 2014a,b). Seu uso como suplemento alimentar vem de longa data, porém até o momento poucos estudos têm endereçado os efeitos subjacentes do CH sobre a biologia celular e molecular das células da pele. Na literatura, existem lacunas no conhecimento referentes aos efeitos do CH na modulação do metabolismo de células dérmicas humanas que poderiam explicar os achados de melhora clínica. E este foi o motivo que nos levou a delinear este estudo e investigar o metabolismo e comportamento proliferativo dos fibroblastos de pele humana frente ao tratamento com CH.

Considerando a grande diversidade de características dos fibroblastos derivados de diferentes locais do corpo (Chang et al., 2002), aventamos a hipótese de que o CH poderia modular diferentemente o metabolismo de FDHs derivados de áreas protegida ou exposta ao sol diariamente, tornando este estudo inédito.

Para tal, estabelecemos com sucesso dois tipos de culturas primárias de FDHs, sendo uma derivada de área fotoprottegida (-FP, mama) e outra derivada de área fotoexposta (-FE, pálpebra). Durante a obtenção da cultura -FE, nos deparamos com achado interessante no qual células com morfologia típica de célula epitelial migraram do explante, aderiram e cresceram uma semana antes do aparecimento dos fibroblastos. Ainda que estas células não tenham sido isoladas e caracterizadas, acreditamos serem queratinócitos, o que impressiona pela dificuldade de obtenção de cultura primária de queratinócitos sem utilização de meio de cultura e fatores de crescimentos especiais para este tipo celular. Estes achados repetiram-se nas três culturas primárias derivadas de pálpebra e merecem investigação adicional a fim de estabelecer explantes de pele de pálpebra como modelo provável para obtenção de cultura primária de queratinócitos.

O intervalo de concentração de CH usado neste estudo foi baseado nos trabalhos de Oesser et al., (2003), em condrócitos, e Rodrigues (2008), em fibroblastos dérmicos humanos e validado pelo ensaio de viabilidade celular. Neste ensaio foram empregados fibroblastos da linhagem comercial CCD1059-Sk, pois até aquele momento, as culturas primárias não haviam sido estabelecidas, sendo necessária a definição do intervalo de concentração a ser testado. Esta linhagem foi utilizada também para a padronização de todas as técnicas deste trabalho. Como reportado por Oesser et al., (1999) e Rodrigues (2008), o CH não apresentou efeito citotóxico sobre os fibroblastos, pelo contrário, aumentou a viabilidade celular validando o intervalo de concentração entre 0,5 a 5,0 mg/mL e o tempo de 48 h de tratamento para os demais ensaios. Além disto, o tratamento com CH por 48 h pareceu favorecer a manutenção da estrutura celular e organização dos microtúbulos (**Anexo A**). A concentração de 5,0 mg/mL de CH pareceu promover maior polimerização dos microtúbulos, sugerindo maior movimentação de organelas, vesículas, proteínas no citoplasma (**Anexo A**).

A privação de SBF por até 48 h, associada ao tratamento com CH, não afetou a morfologia celular das células -FP e -FE, confirmando a adequação do tempo de

tratamento para os ensaios de estimulação nos quais foi utilizado o meio condicionado. Entretanto, após 72 h de privação de SFB, outro achado intrigante na cultura -FE foi observado: as células controle e aquelas suplementadas com as duas menores concentrações de CH apresentaram alterações morfológicas, enquanto as suplementadas com as duas maiores concentrações mantiveram morfologia típica do tipo celular estudado. O CH possui a mesma sequência de aminoácidos do colágeno nativo presente nos ossos, cartilagem, tendões e pele. Assim, devido à similaridade bioquímica com o colágeno nativo no tecido conjuntivo e, especialmente, com o colágeno tipo I na derme, o CH tem sido visto como potencial fonte de aminoácidos considerados nutrientes construtores para o tecido (Oesser et al., 1999). Nossa hipótese é que as concentrações mais elevadas de CH forneceram o aporte nutricional e estímulo para produção de fatores de crescimento endógenos nas culturas, favorecendo a manutenção da morfologia e, possivelmente, da funcionalidade celular. As células -FE foram mais sensíveis à privação de SFB, indicando maior necessidade de manter os níveis exógenos de fatores de crescimento e nutrientes em relação as células -FP.

Shigemura et al., (2009) avaliaram os efeitos da privação de SFB associado ao tratamento com o di-peptídeo derivado do colágeno (Pro-Hyp) na proliferação de fibroblastos de pele de camundongos. Na presença de SFB, o tratamento com Pro-Hyp não influenciou a frequência de células, porém, na ausência de SFB, o peptídeo de colágeno aumentou o número de células após 72 h de tratamento. Os autores também detectaram fatores de crescimento endógenos (β FGF, PDGF e VEGF) no meio de cultura após 48h de privação de SFB. Interessantemente, os aminoácidos Pro e Hyp livres não alteraram a frequência de células, indicando potencial efeito biológico de peptídeos de colágeno presentes no CH.

O aumento da viabilidade celular observado no ensaio de MTT não correspondeu a um aumento da proliferação celular, visto que o tratamento com CH não alterou a taxa de proliferação dos fibroblastos -FP e -FE, avaliada por três métodos complementares, incluindo contagem do número de células, ciclos de

divisão celular e replicação de DNA. O ensaio de MTT não implica necessariamente na determinação da proliferação celular, mas sim na viabilidade celular relacionada à atividade mitocondrial. A maior viabilidade celular pode estar relacionada ao aumento do número de células ou aumento da atividade mitocondrial e, neste caso, aumento da taxa metabólica (van Tonder et al., 2015). Os resultados observados no nosso estudo mostraram que o tratamento com CH aumentou a viabilidade celular devido ao aumento da atividade mitocondrial e não devido à estimulação da proliferação celular.

Um estudo conduzido por Castro e colaboradores (2009) demonstrou que a suplementação oral com CH diminuiu a capacidade proliferativa e aumentou o número de células quiescentes (G0/G1) de melanoma B16F10, em camundongos. Ao contrário de nossos achados, a literatura reporta os efeitos do di-peptídeo derivado do CH (Pro-Hyp) na indução da proliferação celular em FDHs (Ohara et al., 2010a) e na migração e crescimento de fibroblastos de explantes de pele de rato (Shigemura et al., 2009). Além das diferenças entre os modelos experimentais, estes autores investigaram o principal di-peptídeo normalmente encontrado no plasma sanguíneo (39% do total de peptídeos de colágeno (Iwai et al., 2005; Ohara et al., 2007)) após a ingestão do CH, enquanto nós investigamos a combinação total de peptídeos que compõem o CH. As respostas biológicas de outros peptídeos derivados de colágeno (exceto Pro-Hyp) também são importantes devido à possível atividade biológica elevada, mesmo em baixas concentrações plasmáticas (15% Ala-Hyp, 16% Ala-Hyp-Gly, 5% Pro-Hyp-Gly, 2% Ile-Hyp, 3% Phe-Hyp, dentre outros (Iwai et al., 2005; Ohara et al., 2007)), bem como efeitos sinérgicos potenciais de vários peptídeos.

Ohara et al., (2010a) cultivaram FDHs na presença de 1% de SFB suplementado com diferentes peptídeos derivados do colágeno (Pro-Hyp, Ala-Hyp, Ala-Hyp-Gly, Ser-Hyp-Gly, Pro-Hyp-Gly, Ile-Hyp, Leu-Hyp) e apenas o di-peptídeo Pro-Hyp estimulou a proliferação celular. Consequentemente, as respostas celulares podem diferir significativamente quando as células são expostas a um único peptídeo ou a combinação específica de peptídeos de CH.

Além da influência do CH na proliferação dos FDHs, também foram investigados seus efeitos no metabolismo destas células. O conteúdo de colágeno total e colágeno tipo I nas culturas -FP e -FE foi notadamente elevada pelo tratamento com CH, assim como as quantidades de pró-colágeno e colágeno I detectadas no meio condicionado. Visto que o pró-colágeno I é precursor da molécula do colágeno, os níveis de pró-colágeno I geralmente refletem os níveis da biossíntese de colágeno I (Haukipuro et al., 1991; Oikarinen et al., 1992). Nossos resultados demonstram que a suplementação com CH aumentou tanto a biossíntese e secreção do colágeno novo quanto a deposição desta proteína na cultura celular. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Rodrigues (2008) que demonstraram que o tratamento com CH em concentrações que variaram de 0,1 mg/mL até 6 mg/mL estimularam os FDHs a acumularem 1,8 vezes mais colágeno total nas culturas do que as células não tratadas. Experimentos realizados em condrócitos também mostraram aumento da biossíntese de colágeno devido à suplementação com CH. A concentração de 0,5 mg/mL de CH elevou em 2,5 vezes a secreção de colágeno após 11 dias de tratamento, em comparação com células não tratadas (Oesser et al., 2003).

Nossos resultados também são condizentes com aqueles reportados em modelos animais, que demonstraram o efeito de estimulação da suplementação oral com CH no tecido conjuntivo dérmico. Um estudo conduzido em nosso laboratório (**Anexo B**) mostrou que a ingestão de CH por 4 semanas estimulou a expressão proteica de colágenos I e IV na pele de ratos (Zague et al., 2011). Em outro estudo realizado por Matsuda e colaboradores (2006), os resultados mostraram aumento na densidade de colágeno e no diâmetro das fibras colágenas da pele de porcos alimentados com CH. Liu et al., (2010) reportaram os efeitos da ingestão de CH na prevenção da perda e fragmentação de colágeno no envelhecimento cronológico de ratos, aumentando a expressão proteica de colágeno I e III na pele dos animais.

O tratamento com CH estimulou a biossíntese de colágeno em ambas as culturas -FP e -FE, porém promoveu estímulo mais eficiente nas culturas -FE, visto

que concentrações mais baixas de CH foram suficientes para estimular a biossíntese de colágeno nestas em comparação às culturas –FP. Justificativas prováveis para estes achados estão baseadas nas características metabólicas e biossíntese de MEC, que podem estar comprometidos em células derivadas de áreas expostas ao sol (Bernstein et al., 1994; Brinckmann et al., 1995; Krishnan et al., 2006), sendo mais suscetíveis a estímulos exógenos. Fan et al., (2013) reportaram que a suplementação oral com CH conseguiu reparar as fibras colágenas e elásticas e manter a razão entre colágenos dos tipos I e III na pele de camundongos danificada pela exposição à radiação UV.

A expressão de outras proteínas da MEC, como decorina e fibrilina, também foram detectadas no meio condicionado das culturas de FDHs. Porém, a suplementação com CH não influenciou a expressão destas proteínas, embora discreta tendência de aumento tenha sido observada nas culturas -FE. Não encontramos na literatura outros trabalhos que tenham investigado os efeitos do CH nestas mesmas proteínas em FDHs, contudo, Ohara et al., (2010a) investigaram a influência do di-peptídeo Pro-Hyp em outro componente importante da MEC, o ácido hialurônico. As culturas tratadas com este di-peptídeo por 24 h aumentaram a secreção e deposição de ácido hialurônico em, aproximadamente, 3,8 vezes em relação ao controle não tratado.

Este é o primeiro trabalho a investigar os efeitos de estimulação do CH na expressão de pró-colágeno I por imunofluorescência. Nossos resultados revelaram aumento no conteúdo e distribuição subcelular de pró-colágeno I promovido pelo tratamento com CH nas duas culturas celulares. Recordando brevemente a cascata de eventos que acontecem durante a síntese de colágeno, à medida que as cadeias polipeptídicas de pró-colágeno vão sendo sintetizadas, entram no retículo endoplasmático, onde ocorre hidroxilação específica dos resíduos de prolina e lisina e, então, são secretadas pelo complexo de Golgi no ambiente extracelular (Smith et al., 1986). As imagens de imunofluorescência mostraram distribuição concentrada do pró-colágeno na região perinuclear das células controle, indicando marcação no local

do retículo endoplasmático. Ao mesmo tempo, imagens das células tratadas com as duas maiores concentrações de CH apresentaram marcação de pró-colágeno mais intensa e distribuída pelo citoplasma, sugerindo maior transferência do pró-colágeno para o complexo de Golgi, para ser secretado ou aumento ou aumento na rede do retículo endoplasmático responsável pela produção da proteína. Indícios da transferência do pró-colágeno para o complexo de Golgi puderam ser observados nas imagens obtidas em um dos experimentos, que mostrou a marcação positiva de pró-colágeno no ambiente extracelular nas culturas tratadas com uma das maiores concentrações de CH (2,5 mg/mL), indicando claramente a secreção e distribuição desta proteína pelos fibroblastos para o ambiente extracelular. Os achados de imunofluorescência ajudaram a justificar o aumento do conteúdo de colágeno tipo I observados nos ensaios de ELISA e *Western blot*.

Apesar de o CH ter influenciado positivamente a expressão proteica de colágeno I, o mesmo não aumentou os níveis de RNAm desta proteína (COL1A2). No estudo de Ohara et al., (2010a), nenhum dos peptídeos derivados de CH aumentou a expressão gênica de colágeno I em FDHs. Ao contrário, Tokudome et al., (2012) detectaram aumento da expressão gênica (RNAm COL1A1) e proteica de colágeno I em cultura de FDHs após tratamento com CH, porém quando associado a um derivado de vitamina C. Liang et al., (2010), por sua vez, mostraram aumento da expressão de RNAm de colágeno I e III na pele de ratos suplementados com CH, via ativação da sinalização Smad devido ao aumento da expressão de TGFβRII.

Sabemos que o aumento do conteúdo de colágeno nos tecidos é dependente da biossíntese e do metabolismo do colágeno. Isto significa que a síntese pode ser promovida e o metabolismo deve ser suprimido, a fim de aumentar efetivamente o conteúdo da proteína (Tokudome et al., 2012). Por esta razão, investigamos se o CH poderia afetar a expressão proteica e a atividade das principais enzimas que participam do metabolismo do colágeno I na pele, colagenase MMP-1 e gelatinases MMP-2 e -9.

Os resultados encontrados demonstraram influência pronunciada do CH na diminuição das formas ativas de MMP-1 e MMP-2 em ambas as culturas –FP e –FE, reduzindo, portanto, a atividade destas enzimas. Estes achados concordam com aqueles previamente publicados pelo nosso grupo (**Anexo B**), nos quais a ingestão de CH reduziu a atividade da MMP-2 na pele de ratos (Zague et al., 2011). Ademais, Liang e colaboradores (2010) relataram que o CH inibiu a degradação do colágeno I decorrente do envelhecimento cronológico da pele de ratos, pela inibição da expressão proteica de MMP-1 e aumento da expressão de TIMP-1 (inibidor tecidual de MMP-1).

Sabe-se que níveis elevados das MMP-1 e -2 degradam não apenas o colágeno I depositado da cultura, mas também seu precursor (pró-colágeno) recém-sintetizado e secretado pelos fibroblastos (Chung et al., 2001). Deste modo, a inibição das MMP-1 e -2 pelo CH diminuiu tanto a degradação do colágeno quanto a de seu precursor, elevando o conteúdo destas duas formas na cultura e favorecendo a conversão de pró-colágeno I em colágeno I.

Finalmente, os efeitos do CH foram confirmados no modelo de equivalente de derme humana na tentativa de simular as condições *in vivo* da MEC. Segundo El Ghalbzouri et al., (2009), a função essencial de fibroblastos de sintetizar a MEC pode ser aproveitada *in vitro* para produzir um equivalente de derme derivado exclusivamente por FDHs. Normalmente, a obtenção dos equivalentes de derme é baseada na semeadura de fibroblastos em matriz de colágeno não humano, derivada de tendão bovino ou cauda de rato. Embora este modelo permita a formação do equivalente dérmico, o mesmo provê ao compartimento dérmico uma abordagem incompleta das condições *in vivo* da MEC, que contém outras proteínas além do colágeno como elemento principal.

Além disso, a construção de feixes de fibras de colágeno é caracterizada pela biossíntese da MEC, visto que fibroblastos semeados em biopolímeros isolados não formam os feixes de fibras de colágeno, enquanto fibroblastos produzindo sua

própria matriz formam estes importantes elementos estruturais de uma MEC completa e funcional (El Ghalbzouri et al., 2009).

O principal aditivo nestas culturas para formação do equivalente dérmico derivado exclusivamente de fibroblastos humanos é o fosfato de ácido ascórbico (vitamina C fosfatada, forma mais estável da vitamina C), que promove o processamento *in vitro* das cadeias α de pró-colágeno para colágeno (Traber, Stevens, 2011). Adicionalmente, investigamos os efeitos do CH, isoladamente e em combinação com a vitamina C, na secreção do colágeno tipo I. Neste modelo, a maior concentração de CH estimulou a secreção de colágeno I e seus efeitos foram mais evidentes quando associado à vitamina C. Os resultados obtidos no modelo de equivalente dérmico podem validar aqueles observados no modelo de cultura em monocamada, ajudando-nos a compreender melhor a resposta do tecido dérmico frente ao tratamento com CH próximo a condições *in vivo*.

Nossos resultados possuem relevância clínica nos sinais de envelhecimento cutâneo e correspondem àqueles encontrados por Proksch et al., (2014a). Eles demonstraram notável melhora da elasticidade da pele de mulheres saudáveis que consumiram diariamente 2,5 g de CH específico, por 8 semanas. Adicionalmente, em outro estudo prospectivo, Proksch et al., (2014b) reportaram diminuição do volume de rugas periorbitais e expressivo aumento do conteúdo de colágeno I e elastina na pele de mulheres que consumiram o mesmo CH na mesma dose e tempo de tratamento. Alguns mecanismos podem ser sugeridos para explicar os efeitos do CH na regulação do metabolismo dos fibroblastos:

1. Similaridade bioquímica entre o CH e colágeno I endógeno do tecido conjuntivo dérmico, como perfil das frações peptídicas e composição de aminoácidos, fornecendo aporte de aminoácidos como nutrientes construtores e peptídeos reguladores do metabolismo proteico (Zague, 2008).
2. Os peptídeos presentes no CH podem simular aqueles que são produtos da degradação do colágeno endógeno, inibindo a atividade das MMPs e mitigando a inibição indireta da biossíntese de colágeno pelos produtos de degradação gerados pelas MMPs (Fisher et al., 2009; Zague et al., 2011).

3. Os peptídeos do CH podem atuar como mensageiro biológico, sendo gatilho direto para ativação de vias de sinalização de biossíntese de colágeno (Liang et al., 2010; Ohara et al., 2010a; Zague et al., 2011).
4. Os peptídeos de CH podem atuar por meio da ligação com receptores de membrana celular ou transportadores, se presentes, ou afetar interações entre célula e MEC (Shigemura et al., 2009).
5. O CH é rico em peptídeos contendo Gly, Pro e outros aminoácidos hidrofóbicos que apresentam forte atividade antioxidante, sequestrando radicais livres e inibindo a cascata de eventos subsequentes às ações destes radicais (Kim, et al., 2001b,c; Li, et al., 2007; Mendis, et al., 2005 ab).
6. Atividade antioxidante indireta do CH, elevando os níveis de enzimas de defesa antioxidantes endógenas, como superóxido dismutase e glutathione, contribuindo para manutenção da homeostasia do metabolismo do tecido conjuntivo dérmico (Hou et al., 2009; Zhuang et al., 2009).

Este estudo é uma contribuição importante para (a) elucidação dos efeitos biológicos do CH nas células da pele e viabilidade do seu uso como ingrediente funcional de suplementos alimentares e (b) compreensão da influência da suplementação com CH nos fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas acometidas pelo envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento.

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista que (a) fibroblastos de pele humana derivados de diferentes sítios anatômicos podem exibir padrões de transcrição e metabolismo distintos e característicos, e que (b) o uso oral de CH tem sido muito difundido como promissor na prevenção e tratamento dos sinais de envelhecimento da pele, nossos resultados nos permitiram concluir que:

- i. A suplementação com colágeno hidrolisado não atuou na modulação da proliferação de fibroblastos dérmicos humanos derivados de ambas as áreas fotoprotégida e fotoexposta.
- ii. A suplementação com colágeno hidrolisado modulou positivamente o metabolismo de fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas fotoprotégida e fotoexposta, por (a) estimular a biosíntese do precursor e da proteína colágeno tipo I e (b) inibir a atividade das enzimas MMP-1 e -2.
- iii. Concentrações menores de colágeno hidrolisado foram suficientes para estimular o metabolismo das células derivadas de área fotoexposta, em relação ao de fibroblastos de área fotoprotégida, sugerindo efeitos mais pronunciados do CH naquelas células.
- iv. A suplementação com colágeno hidrolisado elevou o conteúdo de colágeno tipo I em modelo tridimensional de equivalente de derme humana, obtida exclusivamente por fibroblastos dérmicos humanos, comprovando a resposta do tecido dérmico frente ao tratamento com CH próximo a condições *in vivo*.
- v. A suplementação com colágeno hidrolisado fornece, além dos aminoácidos como nutrientes construtores, peptídeos reguladores da atividade celular.

REFERÊNCIAS*

Affinito P, Palomba S, Sorrentino C, Di Carlo C, Bifulco G, Arienzo MP, Nappi C. Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen. *Maturitas*. 1999;33(3):239-47.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. [acesso 2015 Junho 30].

Disponível em: <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=109>>

Ahlfors JE, Billiar KL. Biomechanical and biochemical characteristics of a human fibroblast-produced and remodeled matrix. *Biomaterials*. 2007;28(13):2183-91.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2008. 1268 p.

Applegate LA, Frenk E. Oxidative defense in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes from sun-exposed and non-exposed skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1995;11(3):95-101.

Archambault M, Yaar M, Gilchrist BA. Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol*. 1995;104(5):859-67.

Auger FA, Rouabhia M, Goulet F, Berthod F, Moulin V, Germain L. Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med Biol Eng Comput*. 1998;36(6):801-12.

Bagatin E. Envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmeceúticos. São Paulo. *Boletim Dermatológico UNIFESP* 2008. p. 5-11.

Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, Uitto J. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol*. 1994;103(2):182-6.

Bernstein EF, Underhill CB, Hahn PJ, Brown DB, Uitto J. Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *Br J Dermatol*. 1996;135(2):255-62.

Bessou S, Surlève-Bazeille JE, Sorbier E, Taïeb A. Ex vivo reconstruction of the epidermis with melanocytes and the influence of UVB. *Pigment Cell Res*. 199;8(5):241-9.

Boelsma E, van de Vijver LPL, Goldbohm RA et al., Human skin condition and its associations with nutrient concentrations in serum and diet. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(2):348-55.

Bouilly-Gauthier D, Jeannes C, Maubert Y, Duteil L, Queille-Roussel C, Piccardi N, Montastier C, Manissier P, Piérard G, Ortonne JP. Clinical evidence of benefits of a dietary supplement containing probiotic and carotenoids on ultraviolet-induced skin damage. *Br J Dermatol*. 2010;163(3):536-43.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

REFERÊNCIAS

- Brincat M, Kabalan S, Studd JW, Moniz CF, de Trafford J, Montgomery J. A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness, and bone mass in the postmenopausal woman. *Obstet Gynecol.* 1987;70(6):840-5.
- Brinckmann J, Açil Y, Wolff HH, Müller PK. Collagen synthesis in (sun-) aged human skin and in fibroblasts derived from sun-exposed and sun-protected body sites. *J Photochem Photobiol B.* 1995;27(1):33-8.
- Bruni AM. Matriz Extracelular. In: Eça LP. *Biologia Molecular - Guia Prático e Didático.* 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2004. p. 89-100.
- Bustin SA. Absolute quantification of RNAm using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25(2):169–93.
- Bustin SA. Quantification of RNAm using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29(1): 23–39.
- Calleja-Agius J, Muscat-Baron Y, Brincat MP. Skin ageing. *Menopause Int.* 2007;13(2):60-4.
- Castelo-Branco C, Duran M, González-Merlo J. Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Maturitas.* 1992;15(2):113-9.
- Chang HY, Chi J-T, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(20):12877–82.
- Chung JH, Youn SH, Kwon OS, Eun HC, Kim KH, Park KC, Cho KH, Youn JI. Enhanced proliferation and collagen synthesis of human dermal fibroblasts in chronically photodamaged skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1996;12(2):84–9.
- Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2001;117(5):1218-24.
- Clark KL, Sebastianelli W, Flechsenhar KR, Aukermann DF, Meza F, Millard RL, et al., 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. *Curr Med Res Opin.* 2008;24(5):1485–96.
- Contet-Audonneau JL, Jeanmaire C, Pauly G. A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *Br J Dermatol.* 1999;140(6):1038-47.
- Cosgrove MC, Franco OH, Granger SP et al., Dietary nutrient intakes and skin-aging appearance among middle-aged American women. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(4):1225–31.
- Cúneo F, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM, Morais SS, Amaya-Farfan J. Effect of dietary supplementation with collagen hydrolysates on bone metabolism of postmenopausal women with low mineral density. *Maturitas.* 2010;65(3):253-7.

REFERÊNCIAS

- Danielson KG¹, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol.* 1997;136(3):729-43.
- Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol.* 2007;257:143-79.
- Das M, Dempsey EC, Reeves JT, Stenmark KR. Selective expansion of fibroblast subpopulations from pulmonary artery adventitia in response to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(5):L976-86.
- Djagny KB, Wang Z, Xu S. Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. *Crit Rev Food Sic Nutr.* 2001;41(6): 481-92.
- Doljanski F. The sculpturing role of fibroblast-like cells in morphogenesis. *Perspect Biol Med.* 2004;47(3):339-56.
- Draelos ZD. Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. *Clin Dermatol.* 2010;28(4):400-8.
- Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol.* 2015;25(2):92-9.
- El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H, Uitto J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol.* 2002;11(5):398-405.
- El Ghalbzouri A, Commandeur S, Rietveld MH, Mulder A, Willemze R. Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products. *Biomaterials.* 2009;30(1):71–8.
- Espíndola RM, Mazzantini RP, Ong TP, Conti A, Heidor R, Moreno FS. Geranylgeraniol and betaionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. *Carcinogenesis.* 2005;26(6):1091-9.
- Fan J, Zhuang Y, Li B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging. *Nutrients.* 2013;5(1):223–33.
- Faria M, da Costa EL, Gontijo JA, Netto FM. Evaluation of the hypotensive potential of bovine and porcine collagen hydrolysates. *J Med Food.* 2008;11(3):560-7.
- Fialho E, Moreno FS, Ong TP. Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. *Rev. Nutr.* 2008;21(6):757-66.
- Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature.* 1996;379(6563):335-9.
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med.* 1997;337(20):1419–28.
- Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch Dermatol.* 2002;138(11):1462–70.

REFERÊNCIAS

- Fisher GJ, Quan T, Purohit T, Shao Y, Cho MK, He T, et al., Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am J Pathol.* 2009;174(1):101–14.
- Fligiel SEG, Varani J, Datta SC, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *J Invest Dermatol.* 2003;120(5):842–8.
- Fujita T, Ohue M, Fujii Y, Miyauchi A, Takagi Y. The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. *J Bone Miner Metab.* 2002;20(5):298-302.
- Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores.* 1ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. 426 p.
- Han X, Xu Y, Wang J, Pei X, Yang R, Li N, Li Y. Effects of cod bone gelatin on bone metabolism and bone microarchitecture in ovariectomized rats. *Bone.* 2009;44(5):942-7.
- Haukipuro K, Meikko J, Risteli L, Kairaluoma M, Risteli J. Synthesis of type I collagen in healing wounds in humans. *Ann Surg.* 1991;213(1):75–80.
- Heinrich U, Tronnier H, Stahl W et al., Antioxidant supplements improve parameters related to skin structure in humans. *Skin Pharmacol Physiol.* 2006; 19(4):224–31.
- Hoeller D, Huppertz B, Roos TC, Poblete Gutiérrez P, Merk HF, Frank J, Jugert FK. An improved and rapid method to construct skin equivalents from human hair follicles and fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2001;10(4):264-71.
- Hou H, Li B, Zhao X, Zhuang Y, Ren G, Yan M, et al., The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food Chem.* 2009;115(3):945–50.
- Ishikawa O, Kondo A, Okada K, Miyachi Y, Furumura M. Morphological and biochemical analyses on fibroblasts and self-produced collagens in a novel three-dimensional culture. *Br J Dermatol.* 1997;136(1):6-11.
- Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, et al., Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem.* 2005;53(16):6531–6.
- Izumi T, Saito M, Obata A, Arii M, Yamaguchi H, Matsuyama A. Oral intake of soy isoflavone aglycone improves the aged skin in adult women. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2007;53(1):57–62.
- Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica.* 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. 555 p.
- Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(4):390-9.
- Kaput J, Rodriguez RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics.* 2004;16(2):166-77.

REFERÊNCIAS

- Kawaguchi T, Nanbu PN, Kurokawa M. Distribution of prolylhydroxyproline and its metabolites after oral administration in rats. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(3):422-7.
- Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T, Eckes B. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36575-85.
- Kim HK, Kim MG, Leem KH. Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis. *Molecules.* 2013;18(12):15474-89.
- Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Pollack Skin. *J Agric Food Chem.* 2001a;49(4):1984-9.
- Kim SK, Kim YT, Byun HG, Park P-J, Ito H. Purification and characterization of antioxidative peptides from bovine skin. *J Biochem Molec Biol.* 2001b;34(3): 219-24.
- Kim SK, Byun HG, Park PJ, Shahidi F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem.* 2001c;49(6):2992-7.
- Kimira Y, Ogura K, Taniuchi Y, Kataoka A, Inoue N, Sugihara F, Nakatani S, Shimizu J, Wada M, Mano H. Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;453(3):498-501.
- Kligman LH, Gebre M, Alper R, Kefalides NA. Collagen metabolism in ultraviolet irradiated hairless mouse skin and its correlation to histochemical observations. *J Invest Dermatol.* 1989;93(2):210-4.
- Koumas L, Smith TJ, Phipps RP. Fibroblast subsets in the human orbit: Thy-1+ and Thy-1-subpopulations exhibit distinct phenotypes. *Eur J Immunol.* 2002;32(2):477-85.
- Krishnan KJ, Birch-Machin MA. The incidence of both tandem duplications and the common deletion in mtDNA from three distinct categories of sun-exposed human skin and in prolonged culture of fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2006;126(2):408-15.
- Le Vu P, Takatori R, Iwamoto T, Akagi Y, Satsu H, Totsuka M, Chida K, Sato K, Shimizu M. Effects of Food-Derived Collagen Peptides on the Expression of Keratin and Keratin-Associated Protein Genes in the Mouse Skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 2015;28(5):227-35.
- Lee J, Cuddihy M, Kotov N. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng.* 2008;14(1):61-85.
- Leem KH, Lee S, Jang A, Kim HK. Porcine skin gelatin hydrolysate promotes longitudinal bone growth in adolescent rats. *J Med Food.* 2013;16(5):447-53.
- Li B, Chen F, Wang X, Ji B, Wu Y. Isolation and identification of antioxidant peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.* 2007;102(4):1135-43.
- Liang J, Pei X, Zhang Z, Wang N, Wang J, Li Y. The protective effects of long-term oral administration of marine collagen hydrolysate from chum salmon on collagen matrix homeostasis in the chronological aged skin of Sprague-Dawley male rats. *J Food Sci.* 2010;75(8):H230-8.

REFERÊNCIAS

- Lin Y-J, Le G-W, Wang J-Y, Li Y-X, Shi Y-H, Sun J. Antioxidative peptides derived from enzyme hydrolysis of bone collagen after microwave assisted Acid pre-treatment and nitrogen protection. *Int J Mol Sci*. 2010;11(11):4297–308.
- Liu D, Nikoo M, Boran G, Zhou P, Regenstein JM. Collagen and gelatin. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2015;6:527-57.
- Makrantonaki E, Zouboulis CC. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1119:40–50.
- Matsuda N, Koyama Y, Hosaka Y, Ueda H, Watanabe T, Araya T, et al., Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *J Nutr Sci Vitaminol*. (Tokyo) 2006;52(3):211–5.
- Matsumoto H, Ohara H, Ito K, Nakamura Y, Takahashi S. Clinical effect of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. *ITE Lett Batteries New Technol Med*. 2006;7:386-90.
- McAlindon TE, Nuite M, Krishnan N, Ruthazer R, Price LL, Burstein D, et al., Change in knee osteoarthritis cartilage detected by delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging following treatment with collagen hydrolysate: a pilot randomized controlled trial. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(4):399–405.
- Mendis E, Rajapakse N, Byun H-G, Kim S-K. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci*. 2005a;77(17):2166–78.
- Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem*. 2005b;53(3):581-7.
- Minaguchi J, Koyama Y, Meguri N, Hosaka Y, Ueda H, Kusubata M, Hirota A, Irie S, Mafune N, Takehana K. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in Achilles tendon. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo). 2005;51(3):169-74.
- Mine S, Fortunel NO, Paeon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One*. 2008;3(12):e4066.
- Montagner S, Costa A. Bases moleculares do fotoenvelhecimento. *An Bras Dermatol*. 2009;84(3):263-9.
- Moreno FS, Rossiello MR, Manjeshwar S, Nath R, Rao PM, Rajalakshmi S, et al., Effect of betacarotene on the expression of 3-hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. *Cancer Lett*. 1995; 96(2):201-8.
- Morganti P, Randazzo SD. Nutrition and hair. *J Appl Cosmetol*. 1984;2:41-9
- Morganti P. The photoprotective activity of nutraceuticals. *Clin Dermatol*. 2009;27(2):166-74.
- Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin Arthritis Rheum*. 2000;30(2): 87-99.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

REFERÊNCIAS

- Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, Wada M. Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(12):1620–7.
- Naves MM, Silveira ER, Dagli ML, Moreno FS. Effects of beta-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat. *Nutr Biochem*. 2001;12(12):685-92.
- Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011; 69(3):249–56.
- Nemati M, Oveisi MR, Abdollahi H, Sabzevari O. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. *J Pharm Biom Anal*. 2004;34(3): 485-92.
- Nolte SV, Xu W, Rennekampff HO, Rodemann HP. Diversity of fibroblasts - a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008;187(3):165-76.
- Nomura Y, Oohashi K, Watanabe M, Kasugai S. Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition*. 2005;21(11-12):1120-6.
- Oba C, Ohara H, Morifuji M, Ito K, Ichikawa S, Kawahata K, et al., Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2013;29(4):204–11.
- Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of ¹⁴C labeled collagen hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr*. 1999;129(10):1891-5.
- Oesser S, Seifert J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res*. 2003;311(3):393-9.
- Ohara H, Matsumoto H, Ito K, Iwai K, Sato K. Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem*. 2007;55(4):1532–5.
- Ohara H, Ito K, Iida H, Matsumoto H. Improvement in the moisture content of the stratum corneum following 4 weeks of collagen hydrolysate ingestion [in Japanese]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 2009;56:137-45.
- Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, Akiyama M, Fujimoto N, Kobayashi T, et al., Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J Dermatol*. 2010a;37(4):330–8.
- Ohara H, Iida H, Ito K, Takeuchi Y, Nomura Y. Effects of Pro-Hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis using in vitro cultured synovium cells and oral ingestion of collagen hydrolysates in a guinea pig model of osteoarthritis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010b;74(10):2096-9.
- Oikarinen A, Autio P, Kiistala U, Risteli L, Risteli J. A new method to measure type I and III collagen synthesis in human skin in vivo: demonstration of decreased collagen synthesis after topical glucocorticoid treatment. *J Invest Dermatol*. 1992;98(2):220-5.

REFERÊNCIAS

- Ong TP, Heidor R, Conti A, Dagli ML, Moreno FS. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis*. 2006;27(6):1194-203.
- Palombo P, Fabrizi G, Ruocco V, Ruocco E, Fluhr J, Roberts R, Morganti P. Beneficial long-term effects of combined oral/topical antioxidant treatment with the carotenoids lutein and zeaxanthin on human skin: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin Pharmacol Physiol*. 2007;20(4):199-210.
- Postlethwaite E, Seyer JM, Kang H. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75:871-5.
- Proksch E, Segger D, Degwert J, Schunck M, Zague V, Oesser S. Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014a;27(1):47-55.
- Proksch E, Schunck M, Zague V, Segger D, Degwert J, Oesser S. Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014b;27(3):113-9.
- Pruniéras M, Régnier M, Woodley D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol*. 1983;81(1 Suppl):28s-33s.
- Reed MJ, Ferara NS, Vernon RB. Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(11):1203-20.
- Richelle M, Sabatier M, Steiling H, Williamson G. Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. *Brit J Nutr*. 2006;96(2):227-38.
- Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet*. 2006;2(7):e119.
- Rodrigues V, Pieri R, Kleber A, Azevedo R, Maria D. Study of biological activity of bovine hydrolysate collagen type I in human fibroblast. In: 25th International Congress of the IFSCC, 2008, Barcelona. *Anais do 25th International Congress of the IFSCC*, 2008.
- Rosenberg SW. Further studies in the use of gelatin in the treatment of brittle nails. *AMA Arch Derm*. 1957;76:330-5.
- Sabatier L, Chen D, Fagotto-Kaufmann C, Hubmacher D, McKee MD, Annis DS, Mosher DF, Reinhardt DP. Fibrillin assembly requires fibronectin. *Mol Biol Cell*. 2009;20(3):846-58.
- Saiga A, Iwai K, Hayakawa T, Takahata Y, Kitamura S, Nishimura T, Morimatsu F. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *J Agric Food Chem*. 2008;56(20):9586-91.
- Scala J, Hollies NRS, Sucher KP. Effect of daily gelatin ingestion on human scalp hair. *Nutr Rep Int*. 1976;13:579-92.

REFERÊNCIAS

- Schadow S, Siebert HC, Lochnit G, Kordelle J, Rickert M, Steinmeyer J. Collagen metabolism of human osteoarthritic articular cartilage as modulated by bovine collagen hydrolysates. *PLoS One*. 2013;8(1):e53955.
- Schunck M, Schulze CH, Oesser S. Collagen hydrolysate supplementation stimulates proteoglycan metabolism and gene expression of articular chondrocytes. Abstracts of ICRS. 2007, Warsaw, Poland. B136.
- Schwartz SR, Park J. Ingestion of BioCell Collagen[®], a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract; enhanced blood microcirculation and reduced facial aging signs. *Clin Interv Aging*. 2012;7:267-73.
- Scotti L, Velasco MVR. Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia. São Paulo: Tecnopress, 2003. 115p.
- Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, Iwamoto T, Mori T, Oda C, et al., Effect of Prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *J Agric Food Chem*. 2009;57(2):444–9.
- Shigemura Y, Akaba S, Kawashima E, Park EY, Nakamura Y, Sato K. Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. *Food Chem*. 2011;129(3):1019-24.
- Shimizu J, Asami N, Kataoka A, Sugihara F, Inoue N, Kimira Y, Wada M, Mano H. Oral collagen-derived dipeptides, prolyl-hydroxyproline and hydroxyprolyl-glycine, ameliorate skin barrier dysfunction and alter gene expression profiles in the skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;456(2):626-30.
- Skovgaard GR, Jensen AS, Sigler ML. Effect of a novel dietary supplement on skin aging in post-menopausal women. *Eur J Clin*. 2006; 60(10):1201-6.
- Smith LT, Holbrook KA, Madri J. Collagen types I, III and V in human embryonic and fetal skin. *Am J Anal*. 1986;175:507-21.
- Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *J Cell Physiol*. 2004a;200(1):134-45.
- Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*. 2004b;117(Pt 5):667-75.
- Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblasts - a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009;276:161-214.
- Starcher B, Pierce R, Hinek A. UVB irradiation stimulates deposition of new elastic fibers by modified epithelial cells surrounding the hair follicles and sebaceous glands in mice. *J Invest Dermatol*. 1999;112(4):450-5.
- Subbiah MT. Application of nutrigenomics in skin health: nutraceutical or cosmeceutical? *J Clin Aesthet Dermatol*. 2010;3(11):44-6.
- Sugihara F, Inoue N, Kuwamori M, Taniguchi M. Quantification of hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) in human blood after ingestion of collagen hydrolysate. *J Biosci Bioeng*. 2012;113(2):202-3.

REFERÊNCIAS

- Takeda S, Park JH, Kawashima E, Ezawa I, Omi N. Hydrolyzed collagen intake increases bone mass of growing rats trained with running exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013;10(1):35.
- Tanaka M, Koyama Y, Nomura Y. Effects of Collagen Peptide Ingestion on UV-B-Induced Skin Damage. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73(4):930-2.
- Tandara AA, Kloeters O, Mogford JE, Mustoe TA. Hydrated keratinocytes reduce collagen synthesis by fibroblasts via paracrine mechanisms. *Wound Repair Regen.* 2007;15(4):497-504.
- Teixeira INAO, Guariento ME. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. *Ciênc. Saúde Coletiva.* 2010; 15(6):2845-57.
- Tokudome Y, Nakamura K, Kage M, Todo H, Sugibayashi K, Hashimoto F. Effects of soybean peptide and collagen peptide on collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts. *Int J Food Sci Nutr.* 2012;63(6):689-95.
- Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):1000–13.
- Tyson TL. The effect of gelatin on fragile finger nails. *J Invest Dermatol.* 1950;14:323-5.
- Udompataikul M, Sripiroj P, Palungwachira P. An oral nutraceutical containing antioxidants, minerals and glycosaminoglycans improves skin roughness and fine wrinkles. *Int J Cosmet Sci.* 2009;31(6):427-35.
- Vaissiere G, Chevallay B, Herbage D, Damour O. Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. *Med Biol Eng Comput.* 2000;38(2):205-10.
- van Beurden HE, Snoek PA, Von den Hoff JW, Torensma R, Kuijpers-Jagtman AM. Fibroblast subpopulations in intra-oral wound healing. *Wound Repair Regen.* 2003;11(1):55-63.
- van Doren SR. Matrix metalloproteinase interaction with collagen and elastin. *Matrix Biol.* 2015;44-46C:224-231.
- van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015;8:47-57.
- Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, Fader DJ, Johnson TM. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br J Cancer.* 2000;82(3):657-65.
- Varani J, Spearman D PP. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol.* 2001;158(3):931-42.
- Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SE, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol.* 2006;168(6):1861-8.
- Vasconcelos FAG. A ciência da nutrição em trânsito: da nutrição e dietética à nutrigenômica. *Rev. Nutr.* 2010;23(6): 935-45.

REFERÊNCIAS

- Vuillermoz B, Wegrowski Y, Contet-Audonneau JL, Danoux L, Pauly G, Maquart FX. Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2005;277(1-2):63-72.
- Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, Taguchi Y, Sone H, Morimatsu F, Shirakawa H, Furukawa Y, Komai M. Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem.* 2010;58(2):835-41.
- Watson REB, Gibbs NK, Griffiths CEM, Sherratt MJ. Damage to skin extracellular matrix induced by UV exposure. *Antiox Redox Sign.* 2014;21(7):1063-77.
- Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007;127(5):998-1008.
- Wu J, Fujioka M, Sugimoto K, Mu G, Ishimi Y. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(6):547-53.
- Zague V, de Freitas V, da Costa Rosa M, de Castro GÁ, Jaeger RG, Machado-Santelli GM. Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses MMP-2 activity. *J Med Food.* 2011;14(6):618-24.
- Zague, V. A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Arch Dermatol Res.* 2008;300(9):479-83.
- Zhuang Y, Hou H, Zhao X, Zhang Z, Li B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation. *J Food Sci.* 2009;74(6):H183-8.

ANEXOS

A – Imunofluorescência evidenciando a estrutura celular (microtúbulos) de fibroblastos dérmicos humanos (linhagem CCD1056sK, ATCC), após tratamento com colágeno hidrolisado (CH) nas concentrações de 0,5 mg/mL (CH0,5) e 5,0 mg/mL (CH5,0) em comparação às células sem tratamento (controle, CO). Marcação de α/β -tubulina em verde e núcleo em vermelho. Anticorpos primários anti- α tubulina e anti- β tubulina (1:250, Sigma). Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo FITC (1:1000). Iodeto de propídio para marcação do núcleo. Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser.

CO

CH 0,5

CH 5,0

B – Collagen Hydrolysate Intake Increases Skin Collagen Expression and Suppresses Matrix Metalloproteinase 2 Activity.

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD
J Med Food 14 (6) 2011, 618–624
© Mary Ann Liebert, Inc. and Korean Society of Food Science and Nutrition
DOI: 10.1089/jmf.2010.0085

Collagen Hydrolysate Intake Increases Skin Collagen Expression and Suppresses Matrix Metalloproteinase 2 Activity

Vivian Zague,^{1,2} Vanessa de Freitas,^{1,3} Marina da Costa Rosa,¹ Geórgia Álvares de Castro,²
Ruy G. Jaeger,² and Gláucia M. Machado-Santelli¹

¹*Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.*

²*Research and Development Department, GELITA of Brazil Ltd., Cotia, Brazil.*

³*Natural Sciences and Humanities Center, Federal University of ABC, Santo André, São Paulo, Brazil.*

ABSTRACT The effect of daily ingestion of collagen hydrolysate (CH) on skin extracellular matrix proteins was investigated. Four-week-old male Wistar rats were fed a modified AIN-93 diet containing 12% casein as the reference group or CH as the treatment group. A control group was established in which animals were fed a non-protein-modified AIN-93 diet. The diets were administered continuously for 4 weeks when six fresh skin samples from each group were assembled and subjected to extraction of protein. Type I and IV collagens were studied by immunoblot, and activities of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 were assessed by zymography. The relative amount of type I and IV collagens was significantly ($P < .05$) increased after CH intake compared with the reference diet group (casein). Moreover, CH uptake significantly decreased both proenzyme and active forms of MMP2 compared with casein and control groups ($P < .05$). In contrast, CH ingestion did not influence on MMP9 activity. These results suggest that CH may reduce aging-related changes of the extracellular matrix by stimulating anabolic processes in skin tissue.

N