



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Desenvolvimento de Metodologia de Avaliação de Filtros
Solares: Uma abordagem Morfológica e Molecular em
Camundongos *Hairless***

BRYAN HUDSON HOSSY

**Rio de Janeiro
2012**

BRYAN HUDSON HOSSY

Desenvolvimento de Metodologia de Avaliação de Filtros Solares: Uma abordagem Morfológica e Molecular em Camundongos *Hairless*

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Farmacêuticas como pré-requisito
para obtenção do título de mestre em
Ciências Farmacêuticas – Formas
Farmacêuticas e Cosméticas

Orientadores: Prof. Dr. Marcelo de Pádula

Prof^a Dr^a Nádia Campos de Oliveira Miguel

Rio de Janeiro

2012

H829d Hossy, Bryan Hudson.

Desenvolvimento de metodologia de avaliação de filtros solares: uma abordagem morfológica e molecular em camundongo *hairless*/ Bryan Hudson Hossy; orientadores Marcelo de Pádula, Nádia Campos de Oliveira Miguel. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2012.

130f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Fotoenvelhecimento. 2. Luz solar simulada. 3. Filtros solares.

I. Pádula, Marcelo de. II. Miguel, Nádia Campos de Oliveira. III. Título.

CDD 615.42

LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO:

Laboratório Neuro-histologia e Ultra-estrutura do Programa de Pesquisa em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Instituto de Ciências Biomédicas, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Laboratório de Radiobiologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG) do Departamento de Medicamentos da Faculdade de Farmácia, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a meus pais... Vicente José Hossy e Aparecida Auxiliadora Hossy sem o apoio incondicional e as orações de vocês eu não teria alcançado esse estágio de amadurecimento acadêmico e pessoal

MUITO OBRIGADO!

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado força, perseverança e apoio espiritual para que eu pudesse alcançar esse sonho, sem ELE nada seria possível!

A minha mãe Aparecida Auxiliadora Hossy por suas orações, carinho, zelo, conversas, conselhos, por respeitar minhas escolhas profissionais, e pelo exemplo de mãe, mulher, esposa e ser humano que a mim representa meu muito obrigado!

Ao meu pai Vicente José Hossy, pelo seu carinho, apoio, por acreditar incondicionalmente na minha inteligência e capacidade como homem e profissional por constantemente estar disposto a contribuir com a minha formação, meu respeito, carinho e agradecimento!

A minha irmã Lysmara Hossy pelas orações, pelas conversas, conselhos e torcida para que eu concluísse mais essa tapa de minha vida... Muito obrigado minha querida irmã!

À Dona Joana, avó de coração, pelas orações, coversas e apoio espiritual fica aqui meu agradecimento por todo apoio recebido!

A minha prima Suely Marise de Souza (Lili) por sempre me estimular a alcançar esse objetivo, carinho, atenção e por sempre estar solícita a me ajudar no que fosse possível para conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado!

À profª. Drª. Nádia Campos de Oliveira Miguel pela sua excelente orientação científica que levou a obtenção desta pesquisa de dissertação. Agradeço profundamente por ter me apresentado ao “mundo” da histologia que me tornou um farmacêutico com um perfil profissional dinâmico e abrangente fica aqui o meus sinceros agradecimentos!

Ao prof. Dr. Marcelo de Pádula pela excelente orientação científica desta dissertação. Agradeço profundamente pela atenção, respeito, e principalmente por ter aceitado o desafio de também me orientar nesta pesquisa, muito obrigado!

À profª. Drª. Elisabete Pereira dos Santos por ter me introduzido no “universo” magnífico dos cosméticos... Obrigado pela colaboração que possibilitou a essa pesquisa de vanguarda!

Ao prof. Dr. Alvaro Augusto da Costa Leitão, pela acolhida em seu laboratório, pelos ensinamentos passados em seus seminários e aulas e pela possibilidade de estar em contato íntimo com o universo fabuloso da Radio e Fotobiologia, muito obrigado!

À profª. Drª. Silvana Allodi pela acolhida em seu laboratório e sua excelente colaboração ao longo desta pesquisa. Fica o agradecimento por compartilhar seu tempo e conhecimento e pela revisão e conclusão dessa dissertação!

Ao prof. Dr. Flávio Barbosa Luz, por ter me aproximado do “universo” da dermatologia, pelo respeito a minha pesquisa e por sempre estar solícito a ajudar no desenvolvimento desta deste trabalho no que fosse necessário, muito obrigado!

À profª. Drª. Ana Maria Blanco Martinez pela acolhida em seu laboratório e por ter dado a oportunidade de me introduzir no “mundo” da microscopia eletrônica. Obrigado por me permitir compartilhar de seu conhecimento!

Ao meu “amigo-irmão” o farmacêutico, cosmetologista, Dr. Anderson Reis um de meus grandes exemplos profissionais, pelas suas ligações, por jamais duvidar da minha capacidade para atingir essa meta... Meus sinceros agradecimentos!

Ao meu amigo do peito, o farmacêutico Dr. José Marcos dos Santos, pelos conselhos, pela sua atenção, confiança e respeito ao meu trabalho como farmacêutico e por suas palavras de estímulo, muito obrigado!

À farmacêutica Drª. Eliane Brenner, presidente da Dermatus Cosmética Médica por ter permitido meu ingresso em sua empresa para que eu pudesse concluir mais uma etapa de minha formação. Mesmo que não oficialmente, o meu estágio em sua empresa, corroborou de forma expressiva para minha capacitação como mestre em Ciências Farmacêuticas na subespecialidade “cosmética” de minha pós-graduação *stricto sensu*. Muito obrigado!

A minha ex-chefe Dermatus, a farmacêutica Dr^a. Márcia Gouvea, por toda atenção, carinho, compreensão a mim cedidos. Dr^a Márcia você contribuiu muito com a minha formação meus sinceros agradecimentos!

A toda equipe do controle de qualidade da Dermatus Cosmética Médica, os químicos Alexandre “Dublin”, Marcelo Matte e Maciel e a Bióloga “Claudinha”, o meu muito obrigado pela paciência que tiveram comigo ao longo do meu estágio e pela torcida para que eu chegasse aqui!

Aos técnicos de laboratório do Laboratório de Radiobiologia Molecular do IBCCF - UFRJ, os biólogos Janine e Dr. “Léo” e a Rita, por terem me ajudado em meus primeiros passos neste laboratório, auxílio nos experimentos dessa pesquisa, pela torcida e atenção, muito obrigado!

Ao técnico do laboratório de Neurobiologia e Ultraestrutura do ICB - UFJ pela atenção dedicada a mim para confecção de minhas primeiras lâminas histológicas, muito obrigado!

À Bioterista e técnica do laboratório de Neurobiologia Comparativa e do Desenvolvimento, Silvania, pelo auxílio e preocupação com a manutenção do modelo biológico desse experimento, o camundongo *hairless*, auxílio nos experimentos, conversas, apoio e amizade, muito obrigado!

Ao biólogo Dr. Mario Pereira da UERJ por seu auxílio e atenção especial concedida a mim no tratamento estatístico dos resultados apresentados nessa dissertação, muito obrigado!

A todos os meus queridos amigos de todos os laboratórios por onde passei, “ICs”, mestrandos, doutorandos, pós – doutorandos, professores, técnicos meu agradecimento incondicional!

À capes pela bolsa concedida, e ao CNPQ e FAPERJ pelo fomento para execução desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRJ pela formação e por me permitir realizar essa pesquisa neste programa!

MUITO OBRIGADO A TODOS QUE CONTRIBUÍRAM DIRETA E
INDIRETAMENTE PARA A CONCLUSÃO DESTE TRABALHO!

“Primeiro eles te ignoram, depois riem de você,
depois brigam, e então você vence.”

Mahatma Gandhi



FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

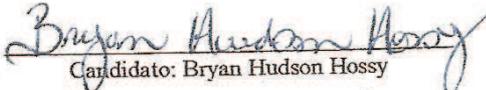
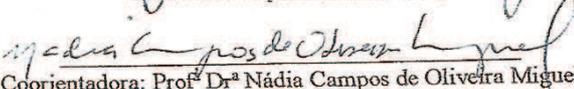
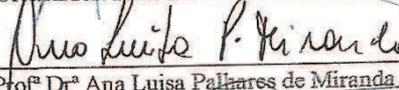
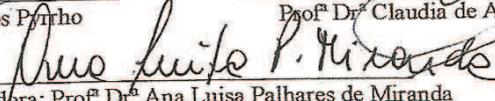
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às nove horas do dia quatro de outubro do ano de dois mil e doze, realizou-se no auditório prof^o Hélio Fraga, localizado no segundo andar do Bloco L do prédio do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, a defesa de dissertação visando à obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas do candidato Bryan Hudson Hossy. A sessão foi aberta pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Faculdade de Farmácia, Professora Ana Luísa Palhares de Miranda, que passou a palavra ao orientador e presidente da Banca Examinadora, Professor Marcelo de Pádula, da Faculdade de Farmácia da UFRJ, para que este conduzisse os trabalhos. Estavam presentes a coorientadora do aluno, a professora Nádia Campos de Oliveira Miguel, do Instituto de Ciências Biomédicas, e os professores que constituíram a Banca Examinadora aprovada: Prof^o Dr^a Ana Luisa Palhares de Miranda e o Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho, ambos da Faculdade de Farmácia, e a Prof^a Dr^a Claudia de Alencar Santos Lage, do Instituto de Biofísica da UFRJ. Foram seguidas as determinações do regulamento dos cursos de pós-graduação *Stricto Sensu* no que se refere ao tempo de apresentação do trabalho e de arguição do candidato. Após esta etapa, os professores que compunham a Banca Examinadora pediram à platéia para se retirar e se reuniram para deliberar sobre os conceitos a serem conferidos, ficando assim estabelecido:

Prof ^a Dr ^a Ana Luisa Palhares de Miranda	Conceito: (<u>A</u>)
Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho	Conceito: (<u>A</u>)
Prof ^a Dr ^a Claudia de Alencar Santos Lage	Conceito: (<u>A</u>)

Assim sendo, ficou determinado que o trabalho intitulado: "Desenvolvimento de metodologia para avaliação de filtros solares: Uma abordagem morfológica e molecular em camundongos Hairless", apresentado pelo candidato, fez jus à aprovação para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que, depois de anexada à minuta assinada pelos componentes da Banca, segue assinada pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Faculdade de Farmácia.

Rio de Janeiro, 4 de outubro de 2012.

 Candidato: Bryan Hudson Hossy	 Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Pádula
 Coorientadora: Prof ^a Dr ^a Nádia Campos de Oliveira Miguel	 Prof ^a Dr ^a Ana Luisa Palhares de Miranda
 Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho	 Prof ^a Dr ^a Claudia de Alencar Santos Lage
 Coordenadora: Prof ^a Dr ^a Ana Luisa Palhares de Miranda	

RESUMO

O fotoenvelhecimento da pele é um processo inflamatório e degenerativo resultante da sobreposição da exposição solar e do envelhecimento intrínseco. Como principais sintomas clínicos desse processo observam-se o surgimento de rugas, manchas senis, telangiectasias e lesões pré-cancerígenas como as queratoses actínicas. Uma das alternativas terapêuticas para a prevenção do fotoenvelhecimento da pele é o uso de formulações fotoprotetoras que apresentam como apelo a prevenção do envelhecimento da pele tendo em vista suas propriedades físico-químicas de absorção e reflexão da radiação ultravioleta (UV). Porém a radiação infravermelha (IV) e a luz visível também possuem marcados efeitos biológicos sobre a pele, e a grande maioria dos filtros solares não possui efeito protetor para esses componentes do espectro solar. Atualmente, para se garantir a eficácia e segurança de formulações fotoprotetoras, as agências regulatórias têm lançado mão de diversas metodologias laboratoriais, sendo o Fator de Proteção Solar (FPS), o Escurecimento Persistente dos Pigmentos (PPD) e Fator de Proteção em UVA (FPA) como os ensaios mínimos necessários para aprovar o registro de uso e comercialização de uma formulação fotoprotetora. Os estudos experimentais descritos estão relacionados à observação macroscópica dos efeitos pós-exposição aguda à radiação UV. A prevenção da formação do eritema e da pigmentação tardia é importante para garantir a eficácia e segurança de formulações com apelo fotoprotetor, porém sua avaliação de uso através da observação de possíveis alterações histológicas e moleculares ainda não é utilizada na maioria desses ensaios.

O objetivo do estudo foi propor uma metodologia de avaliação eficaz e segura de filtros solares através de análises morfológicas e moleculares.

Foram utilizados camundongos *hairless* HRS/J adultos jovens (n = 60) como modelo biológico para a observação de possíveis alterações de fotoenvelhecimento. Utilizamos em nosso ensaio experimental como fonte de radiação solar, a Luz Solar Simulada (LSS) e formulação fotoprotetora de FPS 30 estimado, de lote nº69 da Farmácia Universitária da UFRJ. Os animais foram divididos em quatro grupos distintos: Controle (G1), Irradiado (G2), Filtro (G3) e Veículo (G4), e os animais dos grupos G2, G3 e G4 submetidos cinco vezes LSS sem a imobilização destes. Após uma semana de exposição, a pele do dorso e da orelha foi analisada, através de técnica

histológica de rotina (hematoxilina & eosina) e imunohistoquímica para o fator de Von Willebrand, para avaliação do perfil de neovascularização.

Os animais do grupo G2 apresentaram alterações morfológicas clássicas do fotoenvelhecimento da pele como: espessamento da epiderme, aumento da celularidade dérmica, queratose folicular e hiperplasia da glândula sebácea. O grupo G3 apresentou padrão morfológico similar ao controle, isto é, sem as alterações indicadas anteriormente. O grupo G4 apresentou na maioria dos ensaios experimentais aumento dos efeitos quando comparados ao grupo G2. Este resultado pode estar ligado ao possível caráter fotossensibilizante da fórmula.

A metodologia desenvolvida em nosso estudo demonstrou ser eficaz para a avaliação do perfil fotoprotetor de filtros solares.

ABSTRACT

Skin photoaging is a process that produces inflammation and degeneration of the skin resulting from the overlap of intrinsic aging and sun exposure. The main clinical symptoms of this process have been related to the appearance of wrinkles, aging spots, telangiectasias and precancerous lesions such as actinic keratoses. An therapy for prevention of the skin photoaging process is the use of photoprotective formulations whose health claims is preventing skin aging according to their physicochemical properties of absorption and reflection of ultraviolet (UV) radiation. However, the visible light and infrared (IR) radiation also have marked biological effects on the skin, and most of the sunscreens do not have a protective effect on these components of the solar spectrum. Currently, to ensure the safety and efficacy of photoprotective formulations, regulatory agencies have resorted to different laboratory methodologies, Sun Protection Factor (SPF), Persistent Pigment Darkening (PPD) /Protection Factor in the UVA (PFA) as the minimum testing required approving the registration of use and marketing of a protective formulation. The experimental studies described so far are related with the macroscopic observation of the effects of post-acute exposure to UV radiation. The prevention of the formation of erythema and late pigmentation is important to ensure the safety and efficacy of formulations with sunscreen appeal. However, the guarantee of prevention of histological and molecular changes is not yet explored and proven by the majority of these experimental trials. To propose a methodology for evaluating the safe and effective use of sunscreens using molecular and morphological analyses.

In this study we used young adult albino hairless mice HRS / J (n = 60) as the biological model for observing possible photoaging changes. We used in our experimental trial as the source of solar radiation a Simulated Solar Light (SSL), and an estimated SPF 30 sunscreen made by the University Pharmacy / UFRJ serial number 69. The animals were divided into four distinct groups: Control (G1), irradiated (G2), filter (G3) and vehicle (G4) and the animals of groups G2, G3 and G4 were submitted five times with no immobilization to SSL. A week after the exposure, the dorsal skin and the ear skin were analyzed using routine histological technique (hematoxylin & eosin) and immunohistochemistry for the Von Willebrand factor in order to evaluate the neovascularization profile.

The animals in group G2 showed classical morphological changes of the skin photoaging process, such as thickening of the epidermis, increased dermal cellularity, follicular keratosis, and sebaceous gland hyperplasia. The group G3 showed a morphological pattern that is similar to the control without the changes indicated above. The G4 group presented in most of the experimental procedures, increased effects when compared to G2. This result may be linked to the possible fotosensitizing character of the formula.

The developed methodology in this study proved to be effective for evaluating the photoprotective profile of the sunscreens.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSA – Soro fetal bovino

CaCo – Cacoditalato de sódio

CCS – Centro de Ciências da Saúde

COLIPA - *Cosmetics Europe - The Personal Care Association*

CPTE – Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos

DME – Dose mínima eritematosa

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOU – Diário Oficial da União

FDA – *Food and Drug Administration*

FPA – Fator de proteção em UVA

FPS – Fator de proteção solar

FU – Farmácia Universitária

G1 – Grupo 1

G2 – Grupo 2

G3 – Grupo 3

G4 – Grupo 4

H&E - Hematoxilina & eosina

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICAM – 1 - Molécula de adesão celular endotelial do tipo I

iFPS - Fator de proteção solar integral

IPF - Fator de proteção imunológico

IV – Infravermelho

IVA – Infravermelho do tipo A

IVB – Infravermelho do tipo B

IVC – Infravermelho do tipo C

LSS – Luz solar simulada

MMP – 2 – Metaloproteinase do tipo 2

PA – *Protection A*

PAS – Ácido periódico de Shiff

PBS - Tampão fosfato salina

PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen*

pH – Potencial hidrogeiônico

PPD - *Persistent pigment darkening*

RDC – Reunião da Diretoria Colegiada

RNS – Espécies reativas do Nitrogênio

ROS – Espécie reativa do Oxigênio

TNF- α – Fator de necrose tumoral do tipo α

TSP – 1 – Trombospondina do tipo 1

UV – Ultravioleta

UVA – Ultravioleta do tipo A

UVB – Ultravioleta do tipo B

UVC – Ultravioleta do tipo C

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VPF – Fator de permeabilidade vascular

VWF – fator de von Willebrand

XP - *Xeroderma Pigmentosum*

RELAÇÃO DE FIGURAS**Página**

Figura 1 - Perfil mostrando percentual do espectro de emissão solar e interação dos diferentes comprimentos de onda com as diferentes camadas da pele.	3
Figura 2 - Mecanismo de formação do anel Ciclobutano (Dímero de Pirimidina) após ação direta da UVB, mecanismo de formação do fotoproduto Pirimidina (6-4) – Pirimidona e processo reversível para o isômero de Dewar via UVA e UVB	4
Figura 3: Efeitos biológicos da radiação UV quanto há interação com as células.	5
Figura 4: Mecanismo de indução de carcinogênese celular, vias moleculares de efeito indireto de indução de dano celular, efeito indireto da radiação UV sem geração de radicais livres e efeito indireto da radiação UV com geração de radical livre (B).	6
Figura 5: Fotomicrografia da pele humana evidenciando a junção dermoepidérmica, a epiderme e a parte superior da derme.	8
Figura 6: Esquema ilustrando os diferentes estratos ou camadas da epiderme	9
Figura 7: Esquema representativo de distribuição de camadas da derme.	10
Figura.8: Diferentes aspectos de pele fotoenvelhecida.	12
Figura 9: Aspecto da pele de um indivíduo fumante	14
Figura 10: Processo molecular e microinflamatório do envelhecimento da pele.	15
Figura 11: Paciente apresentando fotoenvelhecimento unilateral (lado esquerdo) em decorrência de 28 anos trabalhando como motorista de caminhão	16

Figura 12: Disposição da rede vascular da pele.	18
Figura 13: Efeito agudo e crônico da radiação UV sobre angiogênese cutânea e equilíbrio da expressão de fatores antiangiogênicos e angiogênicos em uma pele normal e em processo de neovascularização.	21
Figura 14: Aspecto macroscópico da pele de um camundongo <i>hairless</i> adulto jovem (quatro meses de vida).	23
Figura 15: Fotomicrografia de corte histológico de pele de camundongo <i>hairless</i> Skh -1 e HRS/J – UFRJ 2011	24
Figura 16: Informe publicitário de lançamento de Ambre Solaire em 1935	27
Figura 17: Mecanismo de ação dos filtros solares químicos.	29
Figura 18: Estrutura química das moléculas fotoprotetoras e seus respectivos perfis de absorção de UV.	31
Figura 19: Eficácia de fotoproteção de duas formulações de FPS distintas (FPS 10 e FPS 50) e seu perfil de retenção de fótons que atingem a pele.	33
Figura 20: Distribuição de filtro solar sobre a superfície da pele para proposta de metodologia FPS <i>in silico</i> .	34
Figura 21: Simbologia adotada nos textos de rotulagem de filtros solares com proteção UVA por diferentes órgãos regulamentadores	35
Figura 22: Informe sobre novas regras de rotulagem para filtros solares.	36

- Figura 23:** Esquema representativo da elucidação da dose mínima necessária para se produzir uma queimadura no animal modelo, utilizando simulador solar. 41
- Figura 24:** Esquema representativo da resposta para elucidação da dose mínima necessária para se produzir uma queimadura no animal modelo utilizando simulador solar 41
- Figura 25:** Fotografia do simulador de luz solar e aparato utilizado para irradiar os animais. 42
- Figura 26:** Fotografia mostrando o animal sendo irradiado com destaque para dinâmica geral de movimentações do mesmo durante o procedimento experimental. 42
- Figura 27:** Resumo das principais etapas do experimento 46
- Figura 28:** Fotomicrografias de biopsias para análise estatística de neovascularização. Com áreas selecionadas e equalizadas e com aplicação do filtro analítico do programa Image Pro Plus 4.5.1.29. 53
- Figura 29:** Corte histológico da pele de um animal *hairless* submetido à radiação com filtro analítico do programa Image Pro 4.5.1.29 para análise estatística de celularidade e espessura da epiderme 54
- Figura 30:** Fotomicrografia da pele de camundongos *hairless*: controle (não irradiado) (A), uma semana após ser submetido a 15 minutos de exposição ao simulador solar (B), uma semana após ser submetido a 30 minutos de exposição ao simulador solar (C) e uma semana após ser submetido a 45 minutos de exposição ao simulador solar (D). 55

	Página
Figura 31: Média da taxa de emissão de UVA e UVB por estudo conforme Anexo II.	56
Figura 32: Fotomicrografias da superfície da pele de animais <i>hairless</i> obtidas com câmera dermatoscópica no diferentes grupos estudados	57
Figura 33: Biópsias da pele do dorso de camundongos <i>hairless</i> dos diferentes grupos estudados.	58
Figura 34: Fotomicrografia de fluorescência para o fator de von Willebrand da pele do dorso de camundongos <i>hairless</i> nos diferentes grupos estudados.	59 - 60
Figura 35: Fotomicrografia da pele de um camundongo <i>hairless</i> corado pela técnica de hematoxina e eosina nos diferentes grupos estudados.	61
Figura 36: Fotomicrografia da pele da orelha de um camundongo <i>hairless</i> corado pela técnica de hematoxina e eosina nos diferentes grupos estudados.	62
Figura 37: Fotomicrografias de cortes semifinos da pele de um camundongo <i>hairless</i> corados com azul de toluidina nos diferentes grupos estudados.	63
Figura 38: Eletromicrografia de varredura de dois fragmentos de pele de um camundongo <i>hairless</i> grupo controle (G1) demonstrando pelos vestigiais e extenso enrugamento, em vista lateral observa-se evidenciando espessura da epiderme e da derme com destaque das fibras da matriz em em corte transversal	64

- Figura 39:** Eletromicrografia de varredura de fragmentos de pele de um camundongo *hairless* grupo controle (G1) demonstrando pelos vestigiais e extenso enrugamento e destaque para fibras da matriz dérmica em em corte longitudinal. 64
- Figura 40:** Distribuição estatística da análise de neovascularização da pele do dorso dos animais dos grupos estudados e gráfico indicando análise da vascularização das biopsias. 65
- Figura 41:** Distribuição estatística da análise da espessura da epiderme nos diferentes grupos estudados e seu respectivo gráfico 66
- Figura 42:** Distribuição estatística da análise de celularidade nos diferentes grupos estudados e seu respectivo gráfico. 67
- Figura 43:** Evolução temporal de patentes em fotoproteção concedidas a partir de 1987 até o ano de 2011. 89
- Figura 44:** Evolução temporal de patentes em fotoproteção concedidas pelos principais depositantes a partir de 1989 até o ano de 2011 e sua respectiva distribuição quantitativa com destaque para L'Óreal. 90
- Figura 45:** Perfil de citação de literatura patentária por depositante. Destaque para L'Óreal como maior perfil de citação. Adaptado de Questel Orbit, 2011. 91

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio produzidas na pele pela radiação UV.	6
Tabela 2: Tipos, características dermatocósmicas dos fototipos de pele, efeitos solares e indicação de FPS.	13
Tabela 3: Resumo das principais características clínicas da pele envelhecida e fotoenvelhecida.	16
Tabela 4: Resumo das principais características histológicas da pele fotoenvelhecida.	17
Tabela 5: Principais eventos histofisiológicos da neovascularização.	19
Tabela 6: Resumo das principais características das moléculas fotoprotetoras	31
Tabela 7: Desenho dos grupos de estudo	38
Tabela 8: Descritivo quantitativo/qualitativo da formulação gel-creme e concentração das moléculas fotoprotetoras	39
Tabela 9: Ranking mundial do mercado cosmético em 2011.	88

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
RELAÇÃO DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xv
RELAÇÃO DE FIGURAS	xvii
RELAÇÃO DE TABELAS	xxii
ÍNDICE	xxiii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Efeitos Biológicos da Luz Solar.....	1
1.2 – Estrutura Morfológica da Pele	7
1.2.1 – Epiderme	8
1.2.2 – Derme.....	9
1.3 – Envelhecimento da Pele.....	10
1.4 – Angiogênese na pele durante o envelhecimento cronológico e no fotoenvelhecimento.....	17
1.5 - Camundongo <i>Hairless</i> : O modelo para análises de fotoenvelhecimento.....	21
1.6 - Abordagens de prevenção ao fotodano da pele.....	26
1.6.1 – Filtros solares.....	26
1.7 – Métodos de avaliação do fator de proteção solar: passado, presente e futuro ..	31
2 – JUSTIFICATIVA	37
3 – OBJETIVOS	37

3.1 – Objetivo Geral.....	37
3.2 – Objetivos específicos.....	37
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 – Animais.....	38
4.2 – Formulação fotoprotetora contendo filtros solares químicos e veículo.....	38
4.3 – Metodologia para irradiação.....	40
4.4 – Metodologia de aplicação da formulação fotoprotetora FPS 30 FU – UFRJ e formulação do veículo.....	43
4.5 – Análise da superfície da pele através de câmera videodermatoscópica	43
4.6 – Análise de neovascularização.....	43
4.7 – Metodologia para análise microscópica.....	43
4.7.1 – Microscopia óptica.....	43
4.7.2 – Técnica para imuno-histoquímica.....	44
4.7.3 – Microscopia óptica (Cortes semi-finos).....	45
4.7.4 – Microscopia eletrônica de varredura.....	45
4.8 Estatística.....	47
4.8.1 Estatística das biopsias da pele dos grupos de estudo.....	47
4.8.2 Estatística para análises da espessura da epiderme e celularidade da pele do dorso dos animais dos grupos estudados.....	47

5 – RESULTADOS	48
5.1 - Análise histológica para o ensaio de queimadura.....	48
5.2 – Perfil de emissão médio, por estudo, de irradiação emitida pelo simulador solar ao longo dos grupos estudados.....	48
5.3 – Análise da superfície da pele com câmera videodermatoscópica.....	48
5.4 Análises das biopsias.....	48
5.5 Análise imuno-histoquímica para o fator de von Willebrand.....	49
5.6 Análise através da microscopia óptica de rotina da pele do dorso.....	49
5.7 Análise através da microscopia óptica de rotina da pele de orelhas.....	50
5.8 – Análises através da microscopia óptica de cortes semi finos.....	50
5.9 Microscopia eletrônica de varredura.....	51
6 – ESTATÍSTICA	52
6.1 – Biopsia da pele dos grupos de estudo.....	52
6.2 – Análise da espessura da epiderme e celularidade da derme da pele do dorso dos animais dos grupos estudados.....	52
7 – DISCUSSÃO	68
8 – CONCLUSÃO	78
9 – PERSPECTIVAS	79
10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO I – Mercado cosmético em fotoproteção e antienvelhecimento.....	87
ANEXO II – A	91
ANEXO II – B	99
ANEXO III	102

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Efeitos Biológicos da Luz Solar

O espectro eletromagnético solar é dividido em Infravermelho (IV), Visível e ultravioleta (UV), sendo estes subdivididos da seguinte forma:

A radiação na faixa de comprimento do IV esta compreendida entre 760 – 6.000 nm e é subdividida em próximo (IVA 760 – 1.400 nm), mediano (IVB 1.400 – 3.000 nm) e distante (IVC 3.000 – 6000 nm). A IVB e IVC não têm a capacidade de penetrar profundamente na pele sendo absorvidas quase totalmente pela epiderme. Mais de 65% da IVA atinge a derme e cerca de 10%, a hipoderme (Figura 1), sendo que seu perfil de atuação sobre a pele é influenciado pela faixa de comprimento UV (SCHROEDER *et al.*, 2008).

A radiação IV produz seus efeitos biológicos por vibração e rotação das moléculas causando, assim, o aumento de temperatura. A modificação do perfil vibracional de uma molécula pode influenciar as reações fotoquímicas propiciadas pela faixa de comprimento UV, aumentando os efeitos deletérios desta sobre a pele (SHIEKE *et al.*, 2003 e KIM *et al.*, 2007). Outro efeito biológico da luz IV é a geração de radicais livres, especificamente as ROS nas mitocôndrias, as quais também geram outro perfil biológico de ação deste comprimento de onda. Essa geração de ROS é a responsável final pelo aumento da expressão de metaloproteinases as quais, posteriormente, levarão a degradação do colágeno (SCHROEDER *et al.*, 2008).

A luz visível compreende a faixa entre 400-760 nm perfazendo 45% do espectro solar. Sua capacidade de penetração atinge até 20% da hipoderme (Figura 1) e seu comprimento de onda tem a capacidade de ser absorvido por cromóforos (ex. melanina, riboflavina, hemoglobina e bilirrubina) (SVOBODOVÁ & VOSTÁLOVÁ, 2010).

Segundo Zastrow *et al.* (2009) a luz visível tem a capacidade de contribuir na geração de radicais livres, sendo os ácidos graxos insaturados e o ácido desoxiribinucleico (DNA) os alvos mais frequentes deste comprimento de onda. Para Mahmoud *et al.* (2008), a luz visível e a faixa de IV possuem a capacidade de induzir mudanças na pigmentação da pele.

O comprimento de onda da luz visível mais próximo ao infravermelho tem a capacidade de estimular periféricamente a migração e proliferação de linfócitos T *in vivo* e *in vitro* (ZHEVAGO *et al.*, 2005). Segundo Denda & Fuziwara (2007) os comprimentos de onda do visível nas regiões do azul e vermelho possuem efeitos distintos quanto à recuperação da barreira da pele pós-interrupção de sua permeabilidade por uma fita adesiva. Eles demonstraram que a luz azul é capaz de retardar o restabelecimento da barreira enquanto a luz vermelha é capaz de acelerar tal fenômeno. O grupo citado ainda pode demonstrar por análises ultraestruturais que a exposição da pele à faixa de comprimento vermelho leva ao aumento da deposição de lipídeos entre os estratos granuloso e córneo, enquanto a pele exposta à faixa de comprimento azul não apresenta tal perfil de alteração. O mecanismo de ação pelo qual a luz visível atua ainda não foi totalmente esclarecido, porém como a divisão entre as faixa de comprimento UVA e a luz visível ainda é arbitrária, consequentemente os efeitos biológicos da luz visível se aproximam da faixa de comprimento da UVA envolvendo, então, a produção de danos via formação de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (MAHMOUD *et al.*, 2008).

A faixa de comprimento do UV abrange cerca de 5% do espectro solar que atinge a superfície terrestre compreendendo a faixa entre 100 a 400 nm. Esta faixa é dividida em UV do tipo A (UVA 315 – 400nm), UV do tipo B (UVB 280 – 315 nm) e UV do tipo C (UVC 200 – 280 nm). A UVA ainda pode ser dividida em UVA1 (340-400 nm) e UVA2 (315-340 nm) (SVOBODOVÁ & VOSTÁLOVÁ, 2010 e ICI, 2012).

O comprimento de onda mais danoso e citotóxico está compreendido na faixa do UVC, que é absorvido pela camada de ozônio, e caso conseguisse atravessar esta camada sua única interação com a pele seria com a camada córnea, pois ele tem baixa capacidade de penetração (aproximadamente 20 μm) (SVOBODOVÁ & VOSTÁLOVÁ, 2010) (Figura 1).

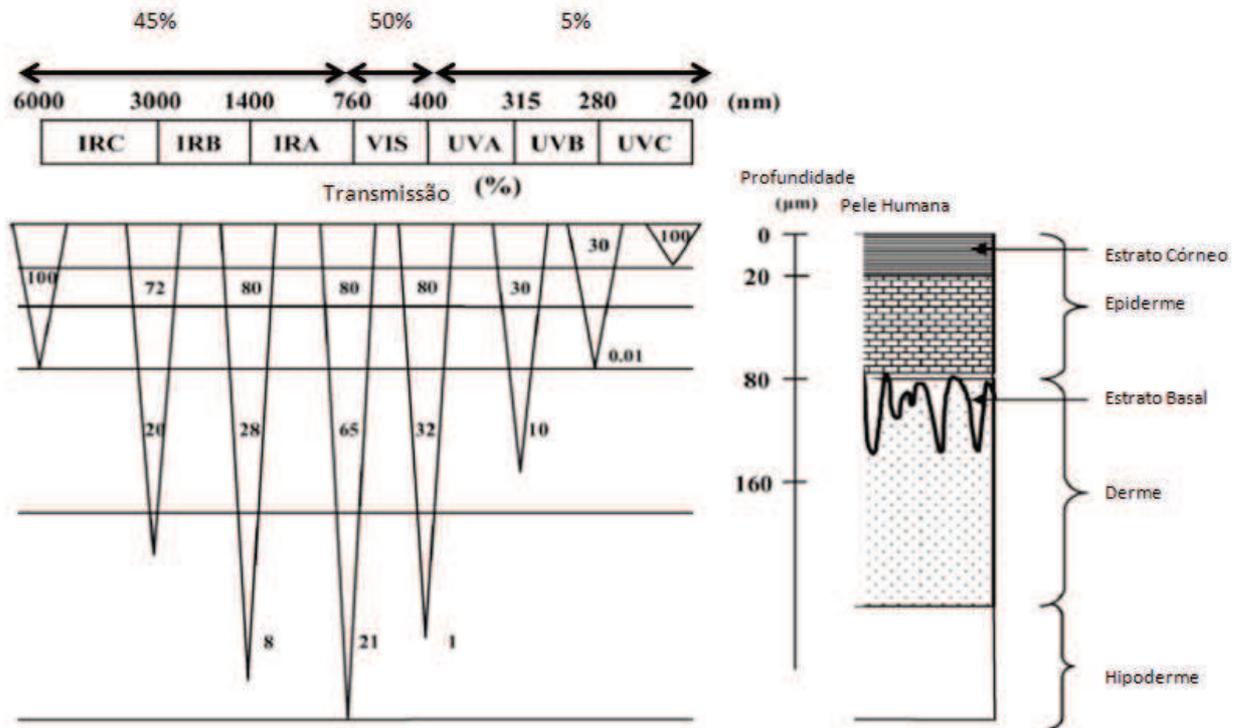


Figura 1: Perfil mostrando percentual do espectro de emissão solar e a interação dos diferentes comprimentos de onda com as diferentes profundidades da pele. Adaptado de SVOBODOVA & VOSTÁLOVÁ, 2010.

A UVB também é absorvida pela camada de ozônio, cerca de 95% deste comprimento de onda é bloqueado, restando apenas 5% desta faixa passível de atingir a superfície terrestre e interagir, por exemplo, com a epiderme desde sua superfície até mesmo em camadas profundas (i.e., extrato basal) (SVOBODOVÁ, WALTEROVA & VOSTÁLOVÁ, 2006).

Apesar de compor apenas 5% da faixa da radiação, a UVB é o constituinte mais ativo e genotóxico da luz solar sendo 1.000 vezes mais efetivo em produzir o bronzeamento imediato e 1.000 vezes mais capaz de gerar queimadura. Ela é mais intensa entre 11 e 13 h durante todo o ano, e dependendo da latitude sua intensidade pode variar (SVOBODOVÁ & VOSTÁLOVÁ, 2006 e BENEDETTO, 1998).

A absorção direta da UVB pelo DNA leva à formação de dímeros de pirimidina (Figura 2.A) e pirimidina – pirimidona que são considerados fotoprodutos (Figura 2.B), sendo estes os mais envolvidos na mutagênese e citotoxicidade solar, no entanto são reparados por sistemas enzimáticos através de excisão de nucleotídeos alterados. Pacientes com *Xeroderma Pigmentosum* (XP) são deficientes na excisão e reparo destes

danos da UVB ao DNA e são altamente mais suscetíveis de desenvolver câncer de pele em áreas expostas ao sol (NISHIGORI, 2006 e LEITÃO *e. al.*, 2005) (Figura 2).

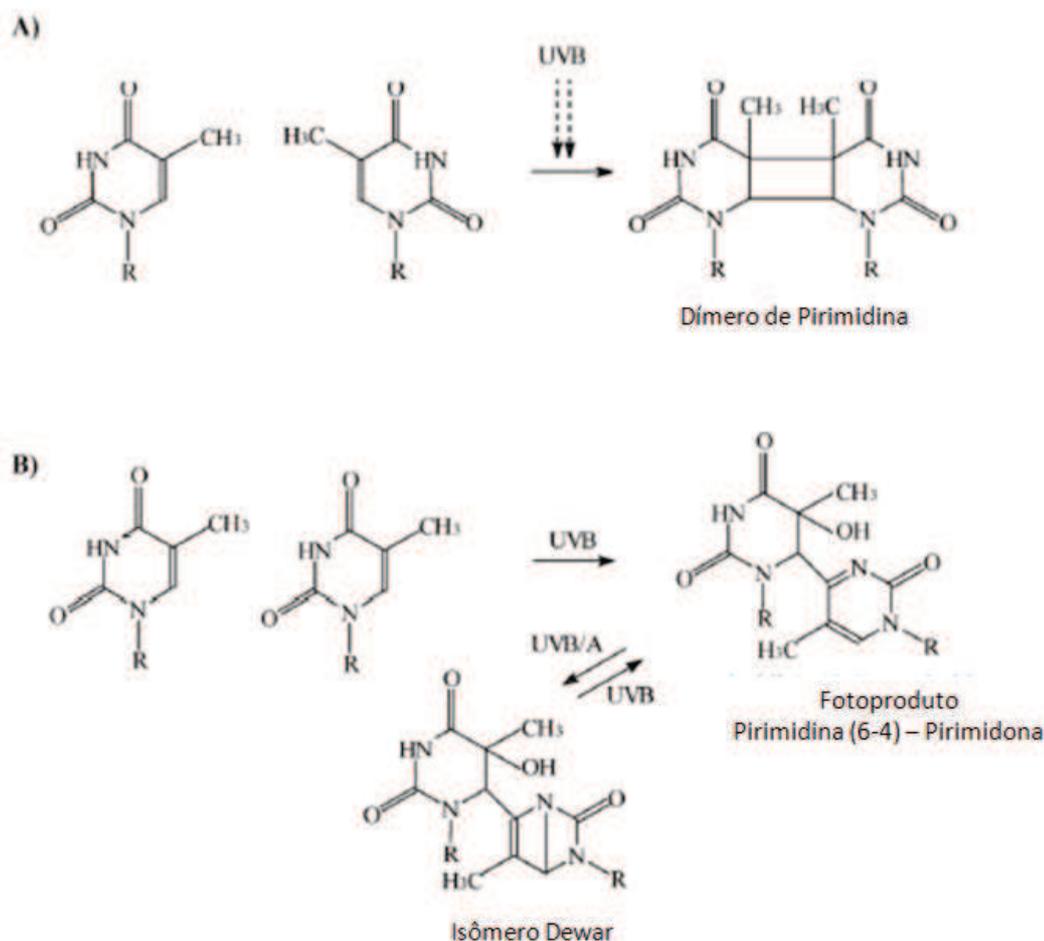


Figura 2: Mecanismo de formação do anel Ciclobutano (Dímero de Pirimidina) após ação direta da UVB (A). Mecanismo de formação do fotoproduto Pirimidina (6-4) – Pirimidona e processo reversível para o isômero de Dewar via UVA e UVB (B). Adaptado de SVOBODOVÁ & VOSTÁLOVÁ., 2010.

A UVB pode participar da indução de danos indiretos de macromoléculas, através da formação de radicais livres, e fotoisomerizar o ácido urocânico alterando sua forma isomérica de *trans* para *cis* (SVOBODOVÁ, WALTEROVA & VOSTÁLOVÁ, 2006).

A UVA compreende 95% da faixa de UV que atinge a superfície terrestre, esta não é bloqueada pela camada de ozônio e em conjunto com a UVB são as maiores responsáveis pelas doenças dermatológicas (SVOBODOVÁ & VOSTÁLOVÁ, 2010).

Diferentemente da UVB, a UVA induz repostas celulares através da formação de radicais livres via sensibilização de moléculas endógenas. Após a formação de radicais

livres, estes podem danificar proteínas, lipídeos e glicídios. A UVA pode produzir dano estrutural no DNA, prejudicar o sistema imunológico e levar ao câncer. O câncer de pele do tipo melanoma possui alta taxa de correlação com este comprimento de onda (SVOBODOVÁ & WALTEROVA VOSTÁLOVÁ, 2006) (Figura 3).

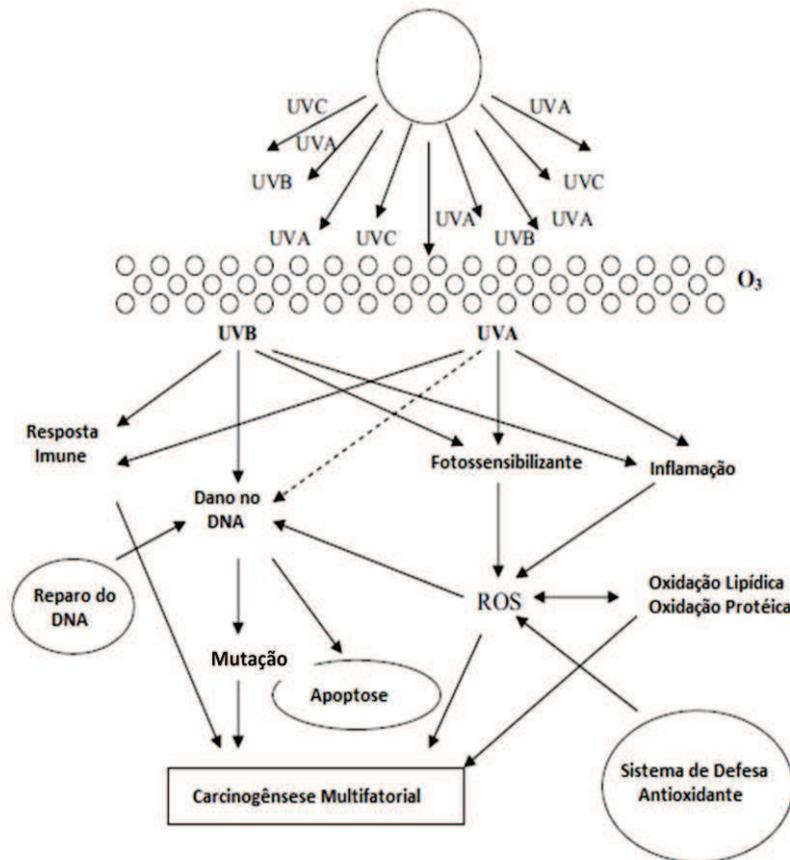


Figura 3: Efeitos biológicos da radiação UV quando há interação com as células.

Adaptado de SVOBODOVÁ, WALTEROVA & VOSTÁLOVÁ, 2006.

A formação de radicais livres pela UVA ou UVB leva ao dano celular por duas principais vias, chamadas de Tipo I e Tipo II, e os mecanismos que levam a estas vias dependem das propriedades químicas das substâncias fotossensibilizantes. (SVOBODOVÁ & WALTEROVA VOSTÁLOVÁ, 2006) (Figura 4).

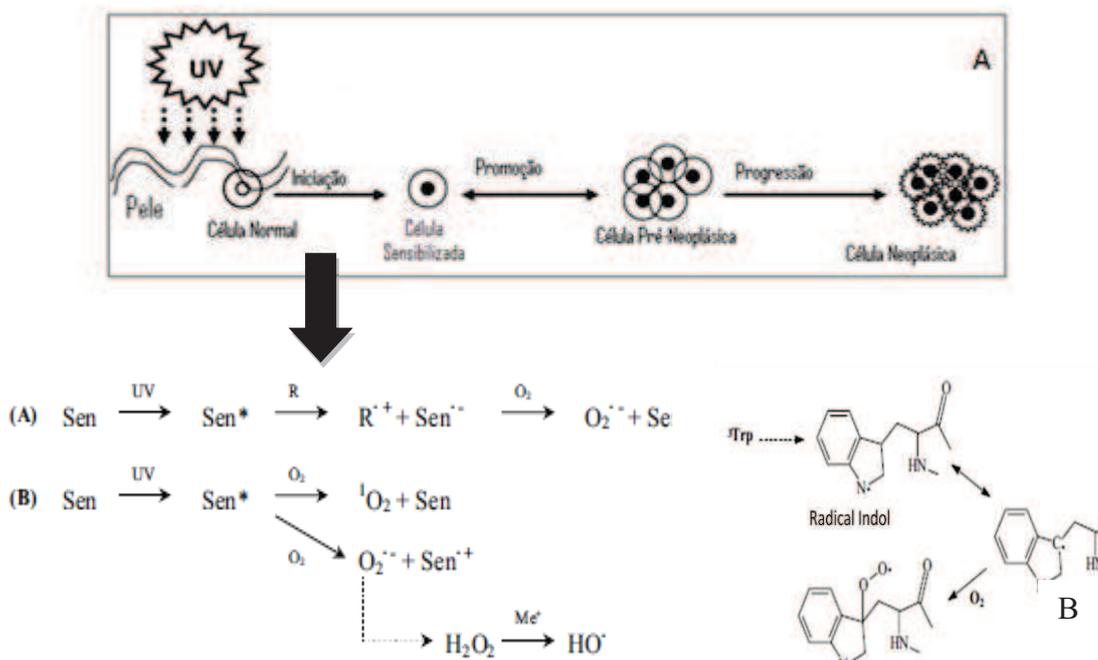


Figura 4: Mecanismo de indução de carcinogênese celular (A). Vias moleculares de efeito indireto de indução de dano celular. Efeito indireto da radiação UV sem geração de radicais livres. Efeito indireto da radiação UV com geração de radical livre (B). Adaptado de: SVOBODOVÁ, WALTEROVA & VOSTÁLOVÁ, 2006 e KATIYAR, 2008.

A via Tipo I envolve a transferência de elétrons através de uma interação direta entre uma substância fotossensibilizante excitada pela radiação UV e outras biomoléculas, resultando na formação de radicais livres. Este mecanismo independe da presença de oxigênio para indução de dano às moléculas. Já a via tipo II envolve a transferência de energia a partir de uma molécula excitada pela radiação UV para uma molécula de oxigênio que produz, por sua vez, as espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (ROS e RNS) (DUTHIE, KIMBER & NORVAL, 1999) (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio produzidas na pele pela radiação UV.

Adaptado de SVOBODOVÁ, WALTEROVA & VOSTÁLOVÁ, 2006.

ROS		RNS	
Radical Hidroxil	OH^{\cdot}	Óxido de Nitrogênio	NO
Radical Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Dióxido de Nitrogênio	NO_2
Oxigênio Singlete	1O_2		
Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2	Ânion Peróxido de Nitrito	$OONO^{\cdot-}$
Ozônio	O_3		

O peróxido de hidrogênio não é *per se* uma espécie reativa do oxigênio, o qual só passa a assumir esse comportamento em presença de cátions metálicos, gerando ROS pela reação de Fenton e interagindo com as biomoléculas (DUTHIE, KIMBER & NORVAL, 1999).

A interação de determinadas células do organismo com radiação UVA e UVB tem consequências benéficas e mesmo essenciais à sobrevivência de muitos seres vivos, tais como a síntese da provitamina D e a prevenção de distúrbios no metabolismo do cálcio e do fósforo, que podem gerar alteração óssea e redução na defesa destes organismos (BURNETT & WANG, 2011 e HART *et al.*, 2011).

1.2 – Estrutura Morfológica da Pele

O conhecimento da estrutura morfológica da pele e de seu funcionamento é fundamental para o desenvolvimento de pesquisa e de tecnologia para a fabricação e a aplicação de produtos cosméticos, implicando na garantia de sua eficácia e segurança (BENY, 2000).

O sistema tegumentar é o maior sistema do corpo. Ele consiste de dois componentes estruturais: a pele e os anexos cutâneos, como unhas, os pelos e as glândulas (sebáceas, sudoríparas e mamárias) (KANITAKIS, 2002).

A pele possui várias funções, sendo a primária atuar como barreira entre o meio ambiente externo e interno do organismo (MONTEIRO-RIVIERE & RIVIERE 1999). Dentre outras funções destacam-se a proteção mecânica, barreira hídrica, controle da temperatura corporal, defesa imunológica, excreção de sais e síntese de vitamina D. Ela também participa como um órgão sensorial e de sinalização sexual (KANITAKIS, 2002).

A pele é constituída basicamente por duas camadas interdependentes: a epiderme, mais externa e a derme, mais internamente localizada. A transição entre a epiderme e a derme é denominada de junção dermoepidérmica ou zona da membrana basal (BAUMANN, 2010) (Figura 5).

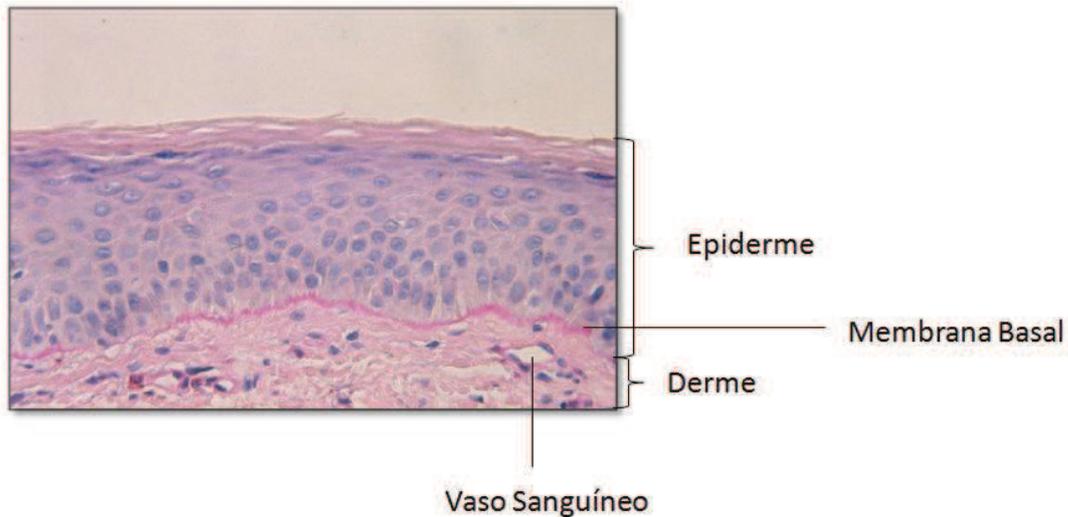


Figura 5: Fotomicrografia da pele humana evidenciando a junção dermoepidérmica, a epiderme e a parte superior da derme. Adaptado de BAUMANN, 2010.

1.2.1 - Epiderme

A epiderme é muito importante para a ciência cosmética porque é a estrutura morfológica que permite a observação direta da hidratação, textura e alterações pigmentares (BAUMANN, 2010). Esta consiste de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado derivado embriologicamente do ectoderma cutâneo, sendo sua principal célula o queratinócito, o qual possuiu ciclos de proliferação e diferenciação que culminam no processo de queratinização e morte celular por apoptose (LEVER, 2009). Ainda estão presentes nesta camada da pele as células de Langerhans (fagócitos), a célula de Merkel (sensoriais) e os melanócitos (responsáveis pela pigmentação da pele) (AZULAY & AZULAY, 2008).

As células da epiderme estão dispostas em camadas ou estratos, os quais de dentro para fora, recebem respectivamente o nome de camada germinativa ou basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea (LIPPENS *et al.*, 2009). As células epiteliais são constantemente renovadas pela atividade mitótica a partir das células do estrato basal que se diferenciam em novos queratinócitos, os quais sofreram processo de queratinização ao longo de seus diferentes estratos da epiderme (LIPPENS *et al.*, 2009) (Figura 6).

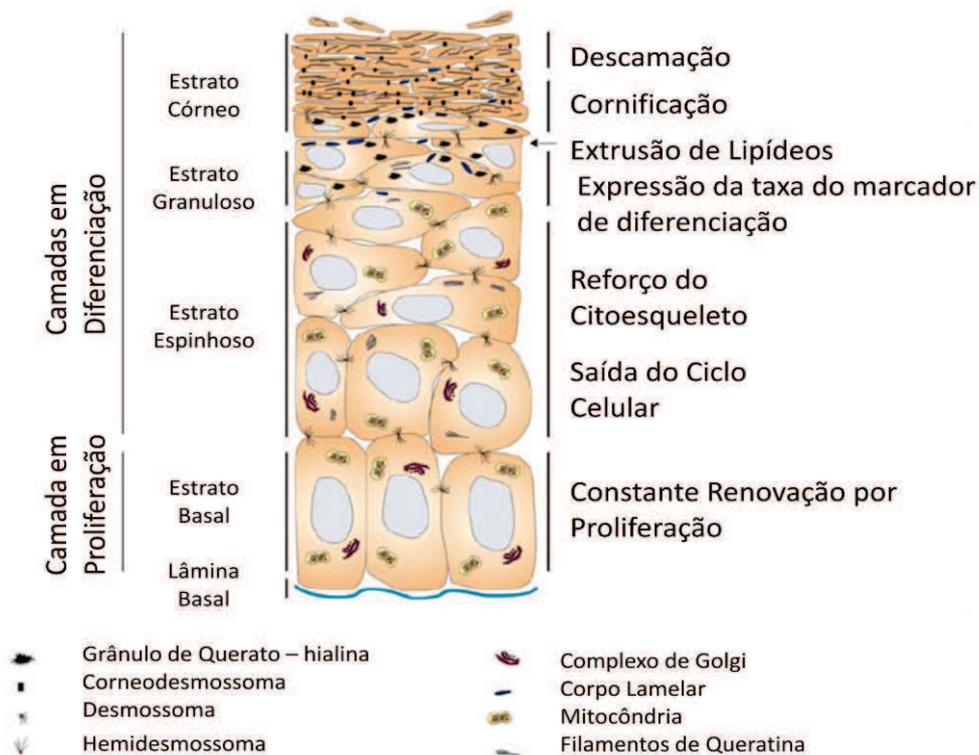


Figura 6: Esquema ilustrando os diferentes estratos ou camadas da epiderme. Adaptado de LIPPENS *et al.*, 2009.

Durante a transição de queratinócito da camada glandular para queratinócito da camada córnea ocorre um aumento de Ca^{2+} intracelular, atividade transglutaminase com *cross-link* de diferentes estruturas proteicas da membrana plasmática. No estágio final de diferenciação o queratinócito perde suas organelas citoplasmáticas, o núcleo e morre. Finalmente os queratinócitos mortos da camada córnea passam por um processo de descamação (CANDI *et al.*, 2005).

1.2.2 – Derme

A derme é subdividida em derme papilar e derme reticular. Essa estrutura é constituída por um tecido conjuntivo frouxo (papilar) e denso não modelado (reticular) e sua principal célula é o fibroblasto, responsável pela síntese da matriz extracelular a qual é composta de fibras colágenas, fibras elásticas e outros componentes como as glicoproteínas de adesão e proteoglicanos que têm como função permitir a estruturação biomecânica e a comunicação entre as células, controlando suas atividades metabólicas. (LEVER, 2009 e KANITAKIS, 2002). Ainda, podemos observar a presença de células

características de tecido conjuntivo propriamente dito como: macrófagos, mastócitos e leucócitos (BAUMANN, 2010).

A derme possui um importante alvo para a atuação de cosméticos, pois de maneira geral, ela é responsável pela manutenção da espessura da pele. A sua espessura varia de acordo com as diferentes regiões do corpo e com a idade, principalmente entre três e sete anos até a puberdade (BAUMANN, 2010) (Figura 7).

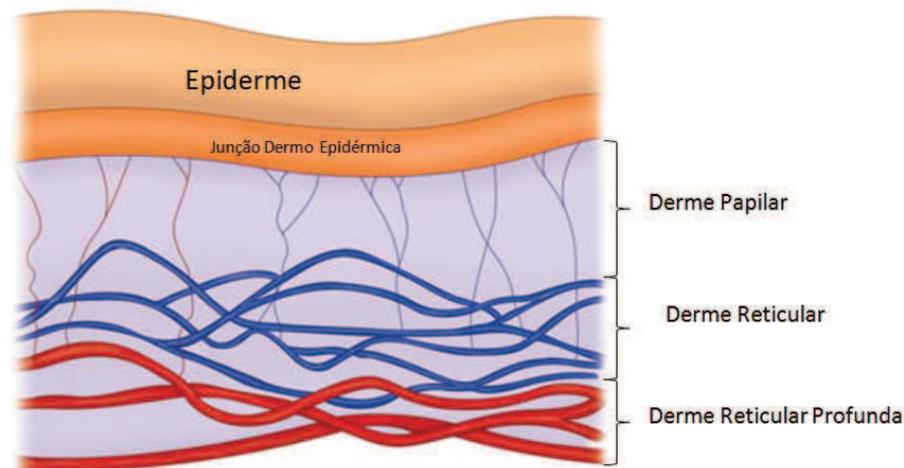


Figura 7: Esquema representativo de distribuição de camadas da derme. Adaptado de BAUMANN, 2010.

1.3 – Envelhecimento da Pele.

Até 2030 um em cada cinco americanos será idoso (FARANGE *et al.*, 2008), enquanto no Brasil a população idosa ultrapassará 22,71% (IBGE, 2008). Estas previsões estatísticas têm despertado interesse nas grandes áreas de pesquisa envolvidas com a cosmética e a medicina, gerando discussões e aprofundamentos sobre o envelhecimento da pele (FARANGE *et al.*, 2008). O processo de envelhecimento é observado como um progressivo declínio das funções orgânicas e da capacidade de regeneração do corpo incluindo a pele. Isso é resultado do acúmulo de danos moleculares ao longo da vida do ser vivo. Esses danos podem estar relacionados a fatores intrínsecos e extrínsecos (FARANGE *et al.*, 2008 e GIACOMONI & REIN, 2004 e). Os fatores intrínsecos estão relacionados ao estilo de vida de cada indivíduo e a predisposição genética, especialmente no que diz respeito à cor da pele. Já os fatores extrínsecos estão atrelados àqueles relacionados com o meio ambiente (FARANGE *et al.*, 2008 e GIACOMONI & REIN, 2004).

Ainda que um organismo vivo não tenha qualquer interação com o meio ambiente poderá sofrer o processo de envelhecimento, pelo fato de possuir em seu interior diferentes níveis de oxigênio gerando agentes oxidantes como os superóxidos durante o processo de fosforilação oxidativa, o que provocaria danos aos constituintes celulares como, por exemplo, o DNA. As alterações geradas pelos radicais podem ser definidas como envelhecimento intrínseco ou natural (BENEDETTO, 1998).

O envelhecimento intrínseco da pele induz a formação de rugas finas, atrofia dos tecidos, desidratação e diminuição da elasticidade com consequente modificação da sua biomecânica (DOMYATI *et al.*, 2002). Todas as alterações enumeradas podem ser reflexos de modificações na síntese de matriz extracelular, que têm a predisposição genética como possíveis agentes desencadeadores destas mudanças (EVERITT, 2003, GIACOMONI *et al.*, 2000 e GIACOMONI, 1992). O fotoenvelhecimento é o somatório de efeitos da exposição crônica à radiação solar que induz danos e contribui para as mudanças evidentes na pele (YAAR & GILCHTREST, 2007).

Por ser um órgão localizado na interface entre o meio externo e o interno do organismo, a pele representa um modelo excelente e acessível para o estudo dos fatores intrínsecos e extrínsecos ao organismo. Com isso ela contribui para a compreensão do complexo processo de envelhecimento (YAAR & GILCHTREST, 2007).

O tempo e as características genéticas estão diretamente relacionados às alterações estruturais, funcionais e moleculares observadas no envelhecimento intrínseco, enquanto no envelhecimento extrínseco a influência do meio ambiente na interação com sistemas biológicos demonstra seus efeitos deletérios. A exposição à luz solar, poluição, tabagismo, repetição de movimentos musculares da mímica facial, hábitos alimentares, o estilo de vida, infecções por microorganismos, atração gravitacional, campos magnéticos, estresse psicológico, alterações hormonais fisiológicas ou não, poluentes atmosféricos, anóxia, lesões e traumas têm sido identificados como importantes fatores no processo de envelhecimento extrínseco (FARAGE *et al.*, 2008 e GIACOMONI *et al.*, 2000).

As alterações patológicas durante o processo de envelhecimento são: elastose, pigmentação irregular, rugosidade, telangiectasia, atrofia da pele, rugas finas e profundas e vários tipos de tumores malignos e benignos (EVERITT, 2003, de RAMOS-E-SILVA & CARNEIRO, 2001 e GIACOMONI, 1992) (Figura 8).

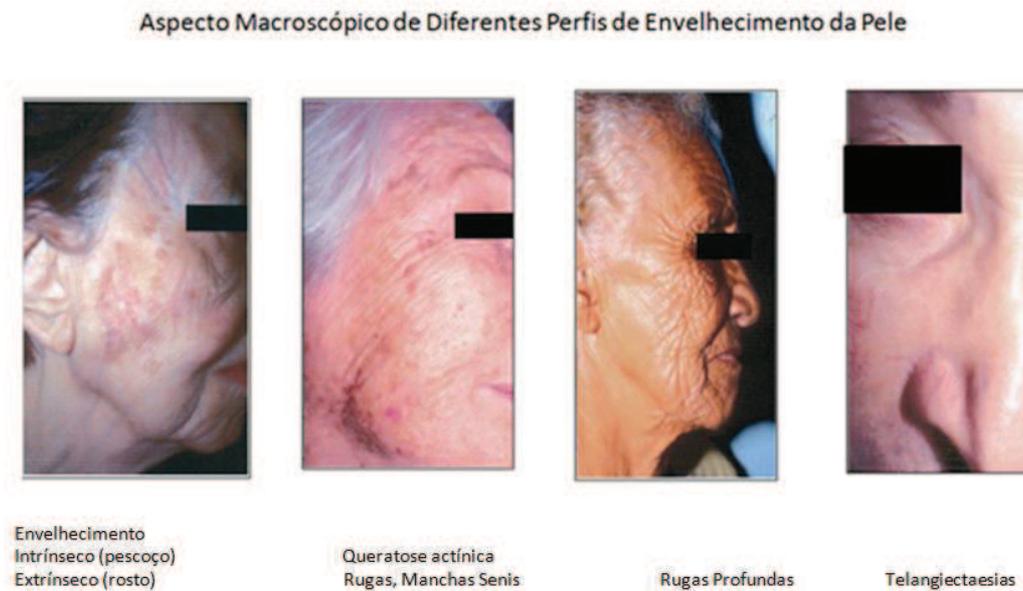


Figura 8: Diferentes aspectos de pele fotoenvelhecida. Adaptado de RAMOS-E- SILVA & CARNEIRO, 2001.

As alterações mais comuns relacionadas ao fotoenvelhecimento da pele acometem a derme com o surgimento de alterações macroscópicas, como as rugas. A espécie humana, como outras, está potencialmente susceptível de sofrer alterações inerentes ao fotoenvelhecimento e isto gera uma procura imensa por cosméticos, medicamentos e alimentos que possam reverter ou pelo menos controlar o aumento desse processo. A partir desse panorama o interesse por cosméticos movimentou 425.866,5 milhões de dólares em vendas de produtos antienvhecimento em 2011 (EUROMONITOR, 2012 e YAAR & GILCHTREST, 2007).

Com o envelhecimento a pele fica mais suscetível ao ressecamento, infecções cutâneas, doenças autoimunes, complicações vasculares e aumento do risco de desenvolvimento de tumores. Essas alterações são ainda moduladas de acordo com as regiões do corpo, etnias e fototipos de pele (GILCHTREST, 1994).

A pele de indivíduos afrodescendentes é mais compacta, possui maior conteúdo de lipídeos intercelulares e possui marcada pigmentação. Essas diferenças morfológicas e moleculares conferem maior proteção à pele destes indivíduos contra os danos cumulativos do sol e pequenas diferenças morfológicas entre a pele exposta e não exposta a radiação solar. Ainda, a maior pigmentação da pele destes indivíduos confere 500 vezes mais proteção quanto à incidência de tumores cutâneos quando comparado a indivíduos caucasianos (FARANGE, *et al.*, 2008 e GILCHTREST, 1994).

A pele de indivíduos brancos (Fototipos I e II) (Tabela 2), em geral, exhibe sardas, seguidas de rugas finas e telangiectasias, classicamente nas bochechas e no

nariz. Com o aumento da idade a gravidade dos danos aumenta e estes indivíduos passam a apresentar pigmentação acentuadamente irregular, incluindo lentigem (manchas senis) e hipomelanoses. Também, são comuns múltiplas queratoses actínicas e a pele com câncer ocorre classicamente nesse contexto (GILCHREST, 1994).

Tipo de Pele	Características	Efeitos da exposição solar	Filtro solar FPS
Fototipo 1	Pele muito clara; olhos azuis e cabelos brancos (albinos)	Eritema intenso e grande; descamação; não há pigmentação	40-45-65
Fototipo 2	Pele clara; olhos azuis e cabelos loiros	Eritema e descamação aparente; leve pigmentação	20-30-35-40
Fototipo 3	Pele pouco clara; olhos e cabelos castanhos	Eritema leve e pigmentação moderada	15
Fototipo 4	Pele e olhos escuros	Eritema leve; fácil pigmentação	10
Fototipo 5	Pele morena	Eritema imperceptível; fácil e intensa pigmentação	8
Fototipo 6	Pele negra	Não há eritema nem sobrepigmentação	4

Tabela 2: Tipos, características dermatocósmicas dos fototipos de pele, efeitos solares e indicação de FPS. Adaptado de Veja, ed. 20/43, janeiro, 2008.

As pessoas de pele mais escura (Fototipos III, IV e V) (Tabela 2) com extensa exposição ao sol raramente desenvolvem alterações clínicas antes do final da meia-idade. Além disso, as anormalidades mais destacadas são de um caráter um tanto diferente. Em vez de se tornar telangiectásica e difusamente eritematosa, a pele tende a se tornar descorada, de matiz amarelo-baço, atribuída à diminuição do fluxo sanguíneo e possivelmente a mudanças na matriz extracelular dérmica superficial (GILCHREST, 1994). Um aumento de 7° a 8° na temperatura média ambiental dobra a perda de água da pele por evaporação, enquanto as temperaturas baixas permitem a pele ficar enrijecida. A temperatura tem influência direta na organização de proteínas e lipídeos na pele. O uso de medicamentos como os hipocolesterolêmicos podem induzir a descamação da pele. Porém, os componentes extrínsecos indutores do envelhecimento da pele ainda são o sol e a nicotina (FARANGE, *et al.*, 2008).

O hábito de fumar está associado à elastose em ambos os sexos e à telangiectasia nos homens. O mecanismo pelo qual o cigarro pode causar dano à pele está associado primeiramente à diminuição do fluxo sanguíneo nesta, pelo fato de a nicotina induzir vasoconstrição levando à queda do aporte de oxigênio e nutrientes. As pesquisas também têm apontado que o tabagismo leva à diminuição da densidade de colágeno e elastina na derme induzindo a pele a ficar flácida, endurecida, pouco elástica e com rugas (FARANGE, *et al.*, 2008) (Figura 9).



Figura 9: Aspecto da pele de um indivíduo fumante. Adaptado de FARAGE *et al.*, 2008.

As alterações bioquímicas e fisiológicas do envelhecimento extrínseco da pele advindas dos efeitos da radiação UV geram um modelo microinflamatório, segundo Giacomoni e D'Alessio (1996). Os estudos destes pesquisadores evidenciaram que o fator mais comum que leva ao desenvolvimento desta inflamação é a capacidade de o microambiente induzir a síntese da molécula de adesão celular endotelial do tipo I (ICAM – 1) no endotélio dos vasos sanguíneos. Este mecanismo permite que haja potencial aceleração do processo de envelhecimento, uma vez que o aumento da síntese da molécula descrita induz o estado de envelhecimento do sistema tegumentar. Assim, a alta presença de ICAM-1 no endotélio leva ao aumento da circulação de monócitos e macrófagos que por rolamento e diapedese se infiltram na região afetada e secretam H_2O_2 . A UVB, em especial, permite maior migração de neutrófilos na região afetada (GIACOMONI & REIN, 2004; GIACOMONI e D'ALESSIO, 1996 e HAWK, *et al.*, 1988). Com o aumento da população de células inflamatórias na derme, estas passam a secretar enzimas líticas e ROS criando um caminho na derme, destruindo agentes infecciosos e removendo células danificadas. Em caso de anóxia há diapedese de macrófagos que tem a tendência de aumentar ROS e collagenase na derme (GIACOMONI & REIN, 2004).

Os radicais livres gerados pelas ROS acabam por atingirem células residentes (queratinócitos e fibroblastos) da pele levando as mesmas a ficarem danificadas e exacerbando os efeitos inflamatórios presentes. Quando estas células são danificadas a cascata do ácido aracdônico é ativada levando à produção de prostaglandinas e leucotrienos que ativam os mastócitos (GIACOMONI, 2006; GIACOMONI & REIN, 2004; HAWK, *et al.*, 1988 e GIACOMONI e D'ALESSIO, 1996). Os mediadores inflamatórios possuem receptores específicos nos mastócitos que, ao serem estimulados por prostaglandinas, aumentam a síntese e liberação de histamina e $TNF-\alpha$, os quais

estimulam a produção de P-selectinas e a neo-síntese de ICAM-1. Quando o ciclo se fecha o estado microinflamatório é mantido (Figura 10). Um ponto importante da microinflamação da pele é o papel da glicose exógena neste evento. A glicose tem a capacidade de se ligar a proteínas e através de um processo não enzimático, levar à glicação destas, o que por sua vez leva ao aumento da síntese de ICAM-1 (GIACOMONI, 2006, GIACOMONI & REIN, 2004).

Modelo Microinflamatório para o Envelhecimento da Pele

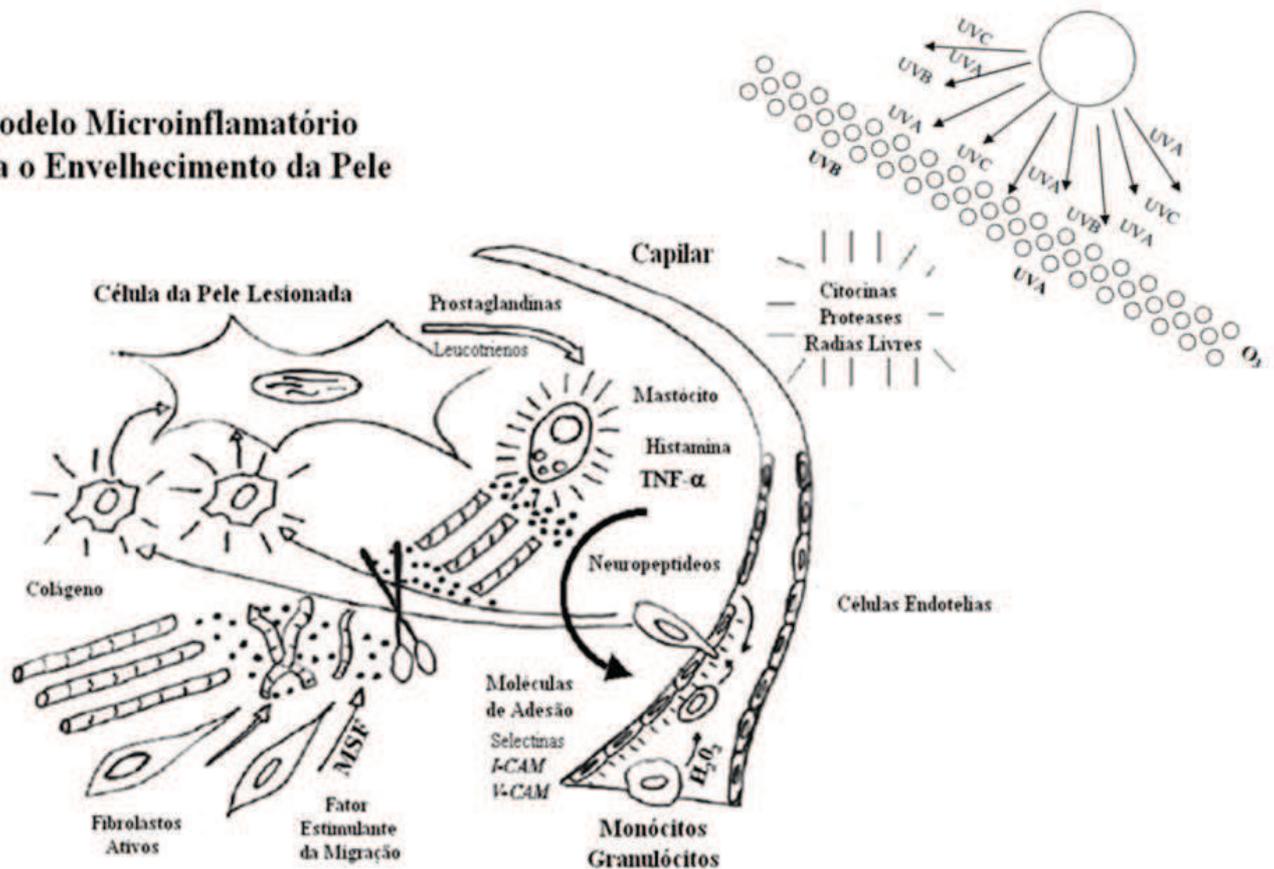


Figura 10: Processo molecular e microinflamatório do envelhecimento da pele.

Adaptado: SVOBODOVÁ & WALTEROVA VOSTÁLOVÁ, 2006 e GIACOMONI & RIEN, 2004.

Os efeitos do envelhecimento extrínseco foram evidenciados em recente estudo de Jennifer, Gordon e Brieva publicado em abril de 2012 no *The New England Journal of Medicine*. Estes pesquisadores conduziram um estudo de caso da pele de um indivíduo de 69 anos o qual apresentava dermatoheliose (fotoenvelhecimento) unilateral. Esta condição clínica foi resultante de 28 anos de exposição à luz solar apenas na face esquerda deste paciente, tendo em vista seu trabalho como motorista de caminhão resultando no surgimento de alterações morfológicas de envelhecimento intrínseco na face direita e envelhecimento extrínseco na esquerda (JENNIFER GORDON & BRIEVA, 2012) (Figura11).



Figura 11: Paciente apresentando fotoenvelhecimento unilateral (lado esquerdo) em decorrência de 28 anos trabalhando como motorista de caminhão. Adaptado de JENNIFER, GORDON & BRIEVA, 2012.

As principais características clínicas do envelhecimento intrínseco e extrínseco da pele estão resumidas na tabela em seguida:

Tabela 3: Resumo das principais características clínicas da pele envelhecida e fotoenvelhecida. Adaptado de GILCHEREST, 1996.

Características da Pele Cronologicamente Envelhecida e Fotoenvelhecida		
Característica	Envelhecimento Cronológico	Fotoenvelhecimento
Aparência Clínica	Perda de elasticidade,	Às vezes profundamente enrugada
Epiderme Espessura Taxa de Proliferação Queratinócitos Basais Queratinização	Mai fina que o normal Menor que o normal Modestamente Irregular Sem alteração	Acantótica e atrófica estágios iniciais Maior que o normal Marcadamente heterogênea Sem alteração
Junção Dermo-Epidérmica	Modesta reduplicação da lâmina densa	Extensiva reduplicação da lâmina basal
Derme Elastina Lisoenzimas Colágeno	Elastogênese, levando à elastose Modesta deposição de fibras elásticas Modesta mudança no tamanho do feixe e organização de colágeno	Marcada elastogênese levando à degeneração e depósito de fibras elásticas Alta deposição de fibras elásticas Moderada mudança no tamanho do feixe de colágeno
Microvascularização	Arquitetura Normal	Deposição Anormal de material semelhante à membrana basal
Células Inflamatórias	Sem evidência de inflamação	Infiltrado Histiócito linfocitário perivascular

As principais características histológicas da pele fotoenvelhecida estão resumidas na tabela em seguida:

Tabela 4: Resumo das principais características histológicas da pele fotoenvelhecida.

Adaptado de YAAR & GILCHTREST, 2007.

Aspectos Clínicos <i>versus</i> Histológicos do Fotoenvelhecimento	
Rugosidade / Aridez	Aumento da compactação do estrato córneo, aumento da espessura da camada granular e redução do conteúdo lipídico da epiderme
Queratose Actínica	Atipia nuclear, hiperplasia epidermal irregular e ocasional inflamação dérmica
Pigmentação Irregular Sardas Manchas Senis Hipomelanoses	Redução e aumento de manchas hipertróficas Aumento no número de melanócitos e melanização Redução do número de melanócitos atípicos
Rugas Rugas Finas Rugas Profundas	Não detectadas Contração de septos da hipoderme
Hiperplasia Sebácea	Hiperplasia concêntrica das glândulas sebáceas
Telangiectasia	Ectasia dos vasos com atrofia das paredes
Elastose	Agregado nodular de fibras de material amorfo na derme papilar

1.4 – Angiogênese na pele durante o envelhecimento cronológico e no fotoenvelhecimento

Os vasos sanguíneos são essenciais para o suprimento de oxigênio, nutrientes e manutenção da homeostase da pele e do restante do corpo. Durante a embriogênese os vasos sanguíneos são formados por um processo chamado vasculogênese no qual ocorre diferenciação de angioblastos em células endoteliais permitindo a formação da rede vascular primitiva (DETMAR, 2000). A rede vascular da pele do indivíduo adulto está organizada com um plexo sanguíneo subpapilar (adjacente ao estrato germinativo da epiderme) e um plexo reticular situado na derme reticular. A epiderme é avascular (KANITAKIS, 2002) (Figura 12).

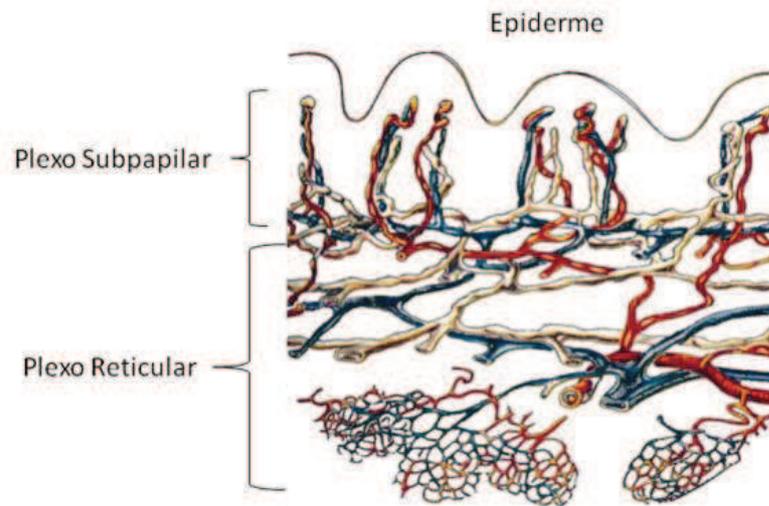


Figura 12: Disposição da rede vascular da pele. Adaptado de SKOBE & DETMAR, 2000.

A formação ou aumento de novos vasos sanguíneos, bem como o aumento de seu diâmetro e o desenvolvimento da vascularização em tumores, são características típicas do dano solar e marca o início do processo chamado angiogênese (CARMELIET, 2000). Do ponto de vista morfológico, a angiogênese ocorre a partir de vênulas pós-capilares já existentes ou da remodelação de vasos sanguíneos pré-existentes através do aumento na espessura e/ou ramificação destes e assim penetram na derme (CARMELIET, 2000 e SENGER, 1983).

A angiogênese é um processo complexo que ocorre em várias etapas (Tabela 5). Após um dano tecidual, primeiramente ocorre a hiperpermeabilidade microvascular que leva ao extravasamento das proteínas plasmáticas, como o fibrinogênio e a protrombina, que servem como uma matriz provisória para a migração de células endoteliais ou como fator extrínseco da cascata de coagulação sanguínea. Isto propicia a clivagem e a ativação de proteínas de matriz, formando um estroma angiogênico (DETMAR, 2000 e CHUNG & EUN, 2007). Como próxima etapa, a membrana basal é degradada pela ação de metaloproteinases ativadas, em particular a do tipo 2 (MMP-2). Esse passo é essencial ao processo de angiogênese, sabendo-se que na pele de um indivíduo sadio, as células endoteliais estão fortemente ligadas à barreira vascular anti-angiogênica, que contém em sua membrana basal moléculas da matriz extracelular como colágeno IV, laminina e trombospondina 1 (DETMAR, 2000).

A migração das células endoteliais é direcionada através de gradiente de fatores angiogênicos que são produzidos em sua grande maioria por células epiteliais de outros órgãos. As células endoteliais sofrem uma série de divisões promovidas por potentes

fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular, fator de permeabilidade vascular (VEGF/ VPF), fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas, interleucina 8, metaloproteinases e o fator de crescimento fibroblástico básico. Finalmente, a migração de células endoteliais a partir do lúmen vascular leva à gradual diferenciação em vasos sanguíneos maduros (BIELENGER *et al.*, 1998; DETMAR, 2000; CHUNG & EUN, 2007). Os principais passos do processo de angiogênese podem ser resumidos da seguinte forma:

Tabela 5: Principais eventos histofisiológicos da neovascularização. Adaptado de DETMAR, 2000

Etapas de Angiogênese
1 – Indução da hiperpermeabilidade microvascular
2 – Degradação enzimática da membrana basal vascular e matriz intersticial
3 – Migração das células endoteliais
4 – Proliferação das células endoteliais
5 – Formação de vasos sanguíneos maduros

A angiogênese é um processo que ocorre durante o desenvolvimento da pele no período fetal, crescimento do esqueleto, porém no indivíduo adulto os vasos sanguíneos são predominantemente quiescentes com exceção do ciclo angiogênico que ocorre no útero e no ovário durante o ciclo reprodutivo feminino. Outra exceção é o ciclo de crescimento capilar que é caracterizado pela expansão e involução perifolicular dos vasos sanguíneos (FERRARA GERBER & LE COUNTER, 2003 e DETMAR, 2000).

A pele de um indivíduo mantém a capacidade de iniciar um processo de angiogênese durante a reparação tecidual em inúmeras doenças, incluindo doenças inflamatórias da pele, (ex. psoríase e outros diversos tipos de dermatites severas), doenças bolhosas, neoplasias cutâneas, incluindo o carcinoma de célula escamosa, melanomas, sarcoma de Kaposi, hemangiomas proliferativos infantis e doenças macroscópicas relacionadas à vascularização como a rosácea (BIELENGER *et al.*, 1998 e DETMAR, 2000). Durante o envelhecimento intrínseco e extrínseco há uma redução da microvascularização cutânea que se reflete na diminuição da temperatura corporal, redução do eritema induzido pela radiação UV e diminuição do suprimento de oxigênio e nutrientes (CHUNG & EUN, 2007).

Chung *et al.* (2002) compararam a distribuição da vascularização da pele de indivíduos com idade entre 20 e 80 anos com distintos perfis de envelhecimento, i.e.,

expostos ao sol e fotoprotetidos. A derme papilar da face dos indivíduos mais velhos expostos ao sol sem fotoproteção apresentou significativa diminuição do tamanho e número dos vasos sanguíneos em comparação aos indivíduos mais jovens. Já os indivíduos expostos ao sol, mas fotoprotetidos, estes apresentaram apenas diminuição do tamanho dos vasos sanguíneos, não mostrando diferença de densidade vascular entre peles jovens e envelhecidas. Chung *et al.* (2002), concluíram que nas peles envelhecidas e fotoenvelhecidas há redução do tamanho dos vasos sanguíneos, porém somente na pele fotoenvelhecida há redução na densidade vascular, especialmente nas regiões em que há extenso dano tecidual de matriz extracelular.

A exposição crônica à radiação UV leva à degradação da matriz extracelular e esta, por sua vez, não promove suporte físico aos vasos sanguíneos, o que leva à diminuição da densidade vascular da pele fotoenvelhecida (CHUNG & EUN, 2007). Com uma exposição aguda à radiação UV se observa a rápida angiogênese e o equilíbrio entre a expressão de fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos tem um papel crucial nesse perfil. Alterações neste equilíbrio podem levar a condições patológicas (CHUNG & EUN apud DETMAR, 2000) (Figura 13).

Os queratinócitos têm um papel importante e primário no processo fisiopatológico de angiogênese cutânea, pois têm a capacidade de induzir VEGF (DETMAR, 2000). Bielenberg *et al.* (1998), submetem a pele da orelha de camundongos C3H/HeN à UVB por uma única vez e puderam demonstrar que há uma hiperpermeabilidade vascular imediata com dilatação dos vasos e angiogênese. Chung *et al.* (2002) demonstraram o mesmo efeito em modelos de pele humana *in vitro*. A radiação UV produz o aumento da expressão de VEGF nas culturas de queratinócitos e em pele humana *in vivo* mantendo-os ainda crescentes no segundo e terceiro dias pós-irradiação. A UV ainda diminui a expressão do fator anti-angiogênico TSP-1 em pele humana e de camundongos. Em peles não expostas à UV o TSP-1 é altamente expresso (CHUNG & EUN, 2007) (Figura13).

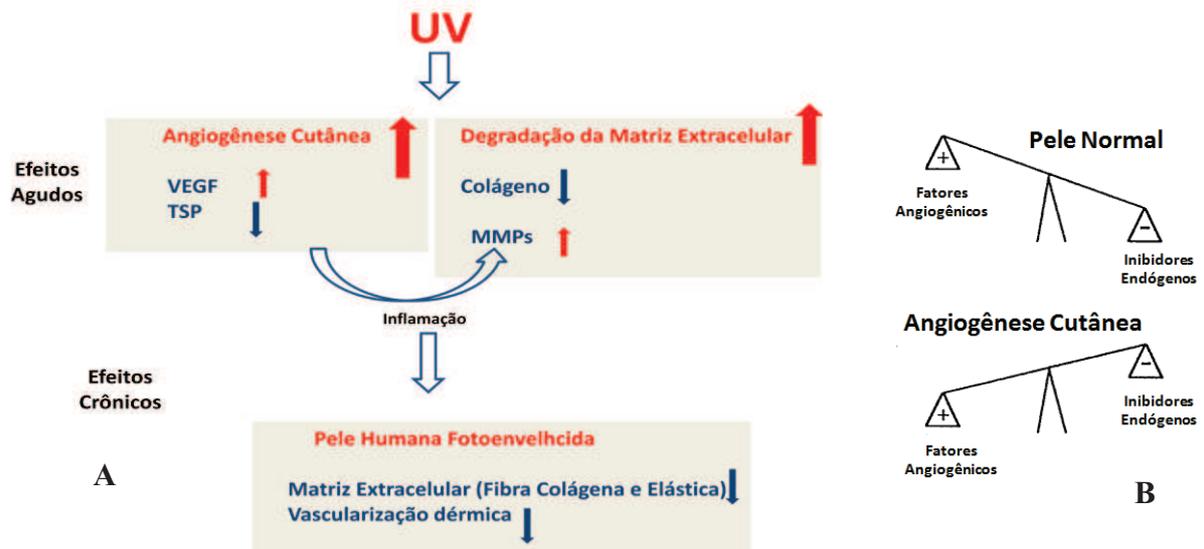


Figura 13: Efeito agudo e crônico da radiação UV sobre angiogênese cutânea (A). Equilíbrio da expressão de fatores antiangiogênicos e angiogênicos em uma pele normal e em processo de neovascularização (B). Adaptado de DETMAR, 2000 e CHUNG & EUN, 2007.

O VEGF foi originalmente descoberto como fator de permeabilidade vascular (VPF) devido à sua atividade em induzir o edema nos tumores (SEGER *et al.*, 1983). O VEGF, quando superexpresso, caracteriza uma grande capacidade de aumentar o rolamento e adesão de células mononucleares periféricas do sangue em vênulas pós-capilares cutâneas, sugerindo que ele e outros fatores pro-angiogênicos contribuem para o recrutamento de leucócitos. Esse fenômeno é possível pela ativação de moléculas de adesão das células endoteliais como ICAM-1, VCAM-1, E-selectinas e P-selectinas (DETMAR *et al.*, 1998). O mastócito é uma célula presente em processos em que há aumento da expressão de VEGF. Com o aumento de expressão deste fator o mastócito fica localizado próximo aos vasos sanguíneos. Detmar *et al.* (1998) correlacionaram o aumento de população de mastócitos diretamente à expressão de VEGF.

1.5 - Camundongo *Hairless*: O modelo para análises de fotoenvelhecimento.

O animal mais comumente utilizado em estudos de fotoenvelhecimento é o camundongo albino *hairless* (sem pelo) de cepa Skh-hairless-1 (BENAVIDES *et al.*, 2009). O gene *hairless*, nome esse derivado da característica principal desse animal, é autossômico recessivo e está situado no cromossomo XIV, sendo responsável pelo

desenvolvimento de pelagem normal durante os primeiros dias de vida do animal. Porém, por volta do décimo terceiro dia pós-natal os pelos começam a cair e até a terceira semana de vida o animal os perde totalmente ao longo de praticamente toda a extensão do corpo, restando somente as vibrissas (PANTELEYEV *et al.*, 1999, CHORILLI, 2007 e BENAVIDES *et al.*, 2009).

Durante a quinta semana de vida um novo ciclo de pelos pode ser observado, logo em seguida os mesmos sofrem processo de involução e o animal passa a não ter mais pelos. Diferentemente do animal *nude*, o *hairless* não apresenta deficiências imunológicas (CHORILLI, 2007 e BENAVIDES *et al.*, 2009).

Embora uma série de mutações tenha sido feita, atualmente outras variantes deste animal podem ser encontradas. A mutação de destaque é aquela que origina a variante pigmentada da espécie, a cepa Skh-hairless-2, com melanócitos epidérmicos e dérmicos. Esta cepa e a variante Skh-1 podem ser utilizadas também em estudos de fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese, porém a cepa variante Skh-2 pode ser também utilizada como modelo para estudos de bronzeamento da pele (KLIGMAN, 1996 e BENAVIDES *et al.*, 2009).

Durante o desenvolvimento a pele do camundongo *hairless* passa por alterações morfológicas marcantes. Até a metade do segundo mês de vida a epiderme não apresenta alterações morfológicas quando comparado à pele de um camundongo BALB/c, por exemplo (MONTAGNA *et al.*, 1954 e MASSIRONI *et al.*, 2005). A partir dessa etapa os pelos são perdidos então, o canal pilo-sebáceo serve como ducto excretor para as glândulas sebáceas (MONTAGNA *et al.*, 1954).

Cada glândula sebácea tem em sua base um cordão descontínuo de células da epiderme que é o remanescente de folículo piloso (MONTAGNA *et al.*, 1954). Alguns folículos pilosos crescem de forma desorganizada em paralelo à superfície. Próximo ao bulbo desses folículos pilosos frequentemente observamos maior densidade celular (MONTAGNA *et al.*, 1954).

Nos animais com idade entre dois e três meses de vida, os ductos e as porções secretoras das glândulas estão mais desenvolvidas. Nessa fase alguns folículos pilosos crescem também de maneira desorganizada (MONTAGNA *et al.* 1954). Ainda nessa fase podemos observar pequenos cistos revestidos por células epiteliais com aparente grau de queratinização e com conteúdo de aspecto sebáceo. As células que persistem nos ductos se desenvolvem a partir de cordões epiteliais descontínuos próximos aos folículos pilosos, os quais são glândulas sebáceas em degeneração. De acordo com

MONTAGNA *et al.* (1954) e BENAVIDES *et al.* (2009) são descritos também ninhos celulares possuindo grânulos ácido periódico de Schiff (PAS) positivo localizadas na derme.

Nos animais com quatro e cinco meses de idade, os cistos descritos acima são mais numerosos e muitos deles são constituídos de células queratinizadas formando lamelas com disposição concêntrica. No sétimo mês de idade as células da epiderme alcançam espessura de até três camadas e apresentam menos basofilia citoplasmática quando comparadas à epiderme de animais mais jovens (MONTAGNA *et al.*, 1954 e KLIGMAN, 1996).

O fácil manuseio da pele e a rápida visualização de efeitos nesses animais homozigotos para o gene *Hr* permite estudos que utilizam aplicações de agentes tópicos, acompanhamento do processo de cicatrização de lesões e respostas agudas à exposição à radiação UV (BENAVIDES *et al.*, 2009).

A pele do camundongo *hairless* (Figura 14) possui aparência rugosa e essa rugosidade aumenta com o decorrer do tempo (MONTAGNA *et al.*, 1954 e BENAVIDES *et al.*, 2009). A pele do macho e da fêmea é similar, porém o macho possui a epiderme mais espessa e a hipoderme mais fina (Figura 15) (MONTAGNA *et al.*, 1954 e BENAVIDES *et al.*, 2009).

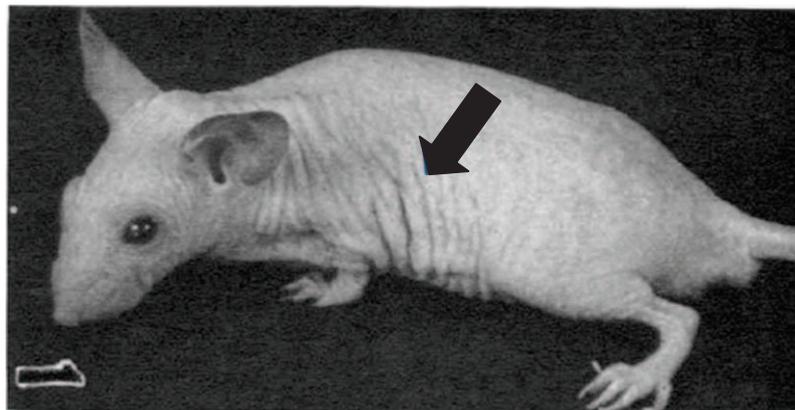


Figura 14: Aspecto macroscópico da pele de um camundongo *hairless* adulto jovem (quatro meses de vida).

Destaque para seu aspecto de pele naturalmente rugoso (seta). Adaptado de MONTAGNA *et al.*, 1954 .

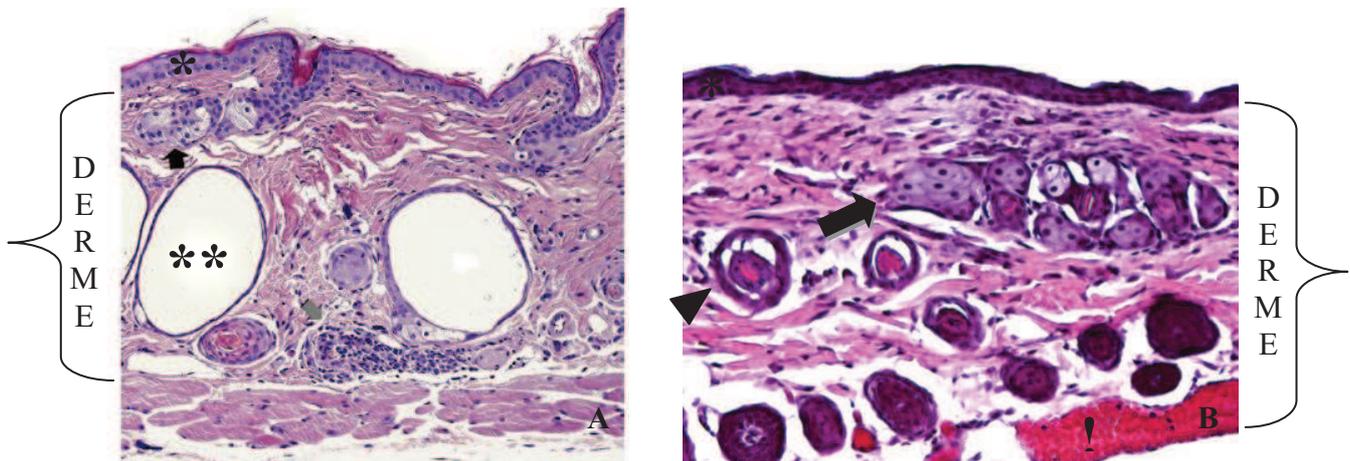


Figura 15: Fotomicrografia de corte histológico de pele de camundongo *hairless* Skh -1.

Adaptado de BENAVIDES, 2009 (A) e HRS/J – UFRJ 2011 (De acordo com o material e método deste trabalho) (B).

Epiderme (*), Cisto dérmico (**), vaso sanguíneo (!), folículo piloso (cabeça de seta), glândula sebácea (seta).

O primeiro estudo sobre o dano induzido pela radiação UV na derme em um modelo animal foi realizado em 1964. Os autores produziram elastose no dorso de um rato depilado e as doses de irradiação utilizadas excediam as ambientais normais (SAMS *et al.*, 1964).

Outro estudo pioneiro desenhado de forma a evidenciar a indução de elastose em ratos sem pelos (*hairless*), data de 1980. Berger *et al.* (1980) usaram um rato *albino* macho sem pelos (Ng/-), o qual recebeu radiação do tipo UVA por 16 horas por 8,5 meses, totalizando 20.000 J/cm² de radiação. Esta dose foi capaz de induzir elastose no animal (KLIGMAN, 1996).

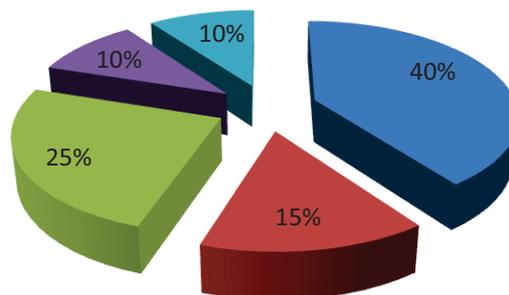
Os estudos de fotoenvelhecimento da pele que usaram como modelo camundongo *hairless* experimentaram metodologias que tinham como objetivo explorar o uso de diferentes fontes emissoras do espectro solar parcial ou total. Nos mais diversos ensaios de envelhecimento solar, os animais foram expostos a UVB ou UVA separadamente ou simultaneamente através de fontes emissoras distintas, ou ainda, expostos à luz solar simulada. (LECHER *et al.*, 2009; LECHER *et al.*, 2008; MOOM, YOUM & KIM, 2000 e BERG *et al.*, 1993).

A pele do camundongo *hairless*, quando submetida às radiações solares, apresenta alterações morfológicas comparáveis às da pele de humanos, como aumento da espessura da epiderme, hiperplasia da glândula sebácea, dos cistos dérmicos, aumento na síntese de glicosaminoglicanos e infiltrado de células na derme (BENAVIDES *et al.*, 2009).

Os estudos de exposição às radiações solares demonstraram usos de diferentes fontes emissoras para diferentes propósitos. A pesquisa nas bases de dados resultou em um anexo I que mostra estudos de exposição a radiação relacionados nesta dissertação, os quais estão resumidos nos seguintes gráficos:

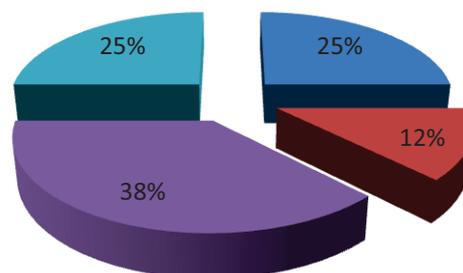
1 – Revisão do estudo para evidenciação de alterações morfológicas e bioquímicas com a radiação ultravioleta

■ UVB ■ UVA ■ UVB + UVA Fontes Separadas ■ Simulador ■ UVA + UVB Mesma Fonte



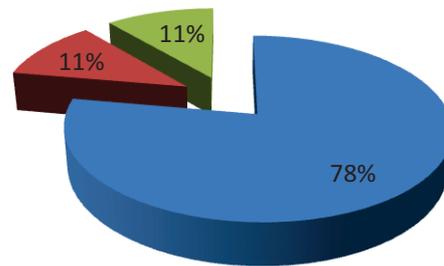
2 – Revisão do estudo do efeito protetor de fármacos e cosméticos frente à radiação UV

■ UVB ■ UVA ■ Simulador ■ UVA + UVB Mesma Fonte



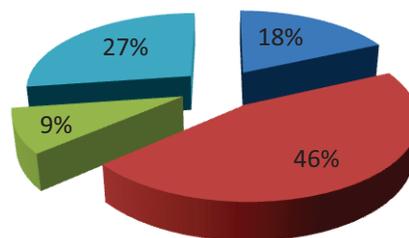
3 – Revisão do estudo do efeito protetor de extratos vegetais e ingredientes alimentares

■ UVB ■ Simulador ■ UVA e UVB Mesma Fonte



4 – Revisão dos estudos de indução de carcinogênese

■ UVB ■ Simulador ■ UVA e UVB Fonte Separada ■ UVA + UVB Mesma Fonte



1.6 - Abordagens de Prevenção ao Fotodano da Pele.

1.6.1 - Filtros Solares

Há poucas informações sobre a forma como povos ancestrais se protegiam do sol. Por milênios, apenas as roupas estavam relacionadas com a forma de se fotoproteger dos danos solares. Há 5000 anos os egípcios desenvolveram o algodão, a lã e o linho, então utilizados para cobrir todo o corpo deixando apenas poucas regiões expostas (URBACH, 2001). Os guarda-chuvas foram utilizados como ferramentas de fotoproteção na antiguidade. Egípcios, mesopotâmios e chineses lançavam mão deles para se proteger do sol (URBACH, 2001).

Gregos e egípcios foram os primeiros a relacionar pele saudável com ausência de bronzeado, ou seja, pele de coloração branca. Para atingir esta tonalidade estes povos utilizaram sais de arsênio, como um tipo de *pó de arroz* rudimentar (URBACH, 2001).

Muitos tipos de proteção física começaram a ser utilizadas no primeiro século depois de Cristo. A utilização de óleo de diferentes naturezas foi explorada para cobrir e proteger a pele. Os tibetanos utilizaram uma combinação de alcatrões e ervas como formulação fotoprotetora. A decoração da pele por povos indígenas com auxílio de plantas tinha razões ritualísticas e cosméticas, mas a fotoproteção era inerente (URBACH, 2001).

Em 1891, Hammer publicou uma importante monografia abordando os diferentes efeitos da luz solar sobre a pele, dando atenção especial ao eritema e sua correlação direta com a radiação UV. Hammer repetiu os experimentos de um pesquisador contemporâneo Widmark, que investigou os efeitos protetores da quinina. Consolidando os efeitos protetores de tal planta, Hammer passou a ser o primeiro a recomendar o uso de filtros químicos, definidos como moléculas capazes de proteger a pele do eritema (URBACH, 2001). Segundo Urbach (2001), o filtro solar de maior sucesso no século XX foi certamente Ambre Solaire de Garnier. No ano de 1935 Eugene Schueller, fundador da L'Óreal, criou uma formulação contendo salicilato de benzila em veículo oleoso e utilizou as mídias possíveis como radiodifusão e outdoors para divulgar que era possível ter pele saudável e bronzeada. Como imagem para a campanha publicitária utilizou uma foto de mulher fazendo uso da formulação solar com biquíni e pele bem bronzeada (URBACH, 2001) (Figura 16).



Figura 16: Informe publicitário de lançamento de Ambre Solaire em 1935. Disponível em:

<https://sites.google.com/site/marketingfernandonamora/sagres22>

Em 1940 o ácido paramino-benzóico foi descoberto e marcou uma nova fase na fotoproteção. Em 1942, durante a segunda guerra, o filtro solar utilizado pelos combatentes americanos foi petrolato vermelho de uso veterinário com 10% de fenilsalicilato (URBACH, 2001).

No mercado de cosméticos, atualmente, existem inúmeros filtros solares com diferentes formas farmacêuticas para o uso tópico como: cremes, loções, géis, aerossóis, soluções, *sticks* e espumas. Inicialmente só eram usados para a proteção contra queimadura solar, mas hoje são usados para proteção contra o envelhecimento e também contra o câncer de pele (RANGEL & CORRÊIA, 2002 e PAOLA, 2001).

Como características necessárias a um filtro solar podemos destacar:

- ✓ Ser compatível com os inúmeros ingredientes usados na formulação;
- ✓ Ser estável e conservar suas propriedades quanto exposto à luz;
- ✓ Ser inócuo para a pele sadia e atóxico;
- ✓ Ter aceitação cosmética pelo consumidor;
- ✓ Ter alta substantividade;
- ✓ Ter alta estabilidade ou habilidade de manter suas características de eficácia perante condições adversas, como transpiração e exposição à água (RANGEL & CORRÊIA, 2002 e SCHERSCHUM & LIM, 2001).

As moléculas fotoprotetoras podem ser classificadas como: físicas ou químicas. As físicas agem refletindo e/ou dispersando a radiação incidente. Como principais exemplos temos o dióxido de titânio e o óxido de zinco (RANGEL & CORRÊIA, 2002, GONZÁLEZ, FERNÁNDEZ-LORENTE & GILABERTE-CALZADA, 2008).

Já os filtros químicos podem ser naturais ou sintéticos absorvendo a radiação UV (Figura 18). Como exemplo dessas classes, há as seguintes famílias químicas: PABA (ácido p-aminobenzóico e derivados), derivados do ácido cinâmico, derivados do ácido salicílico, derivados da cânfora, ácido fenilbenzimidazol, benzofenonas,

antranilatos, dibenzoilmetanos e outros (como o octocrileno) (RANGEL & CORRÊA, 2002).

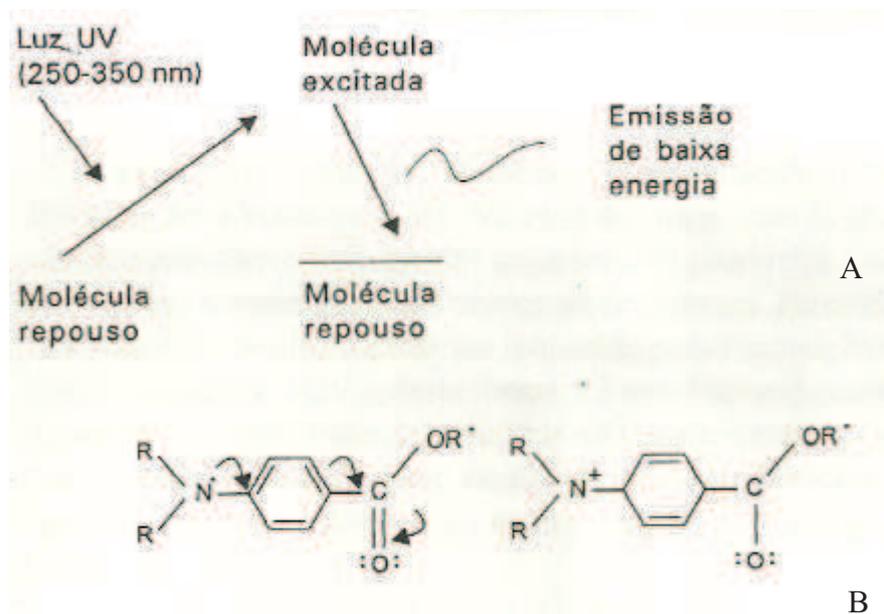


Figura 17: Mecanismo de ação dos filtros solares químicos. Após absorção de luz UV a molécula anteriormente em repouso é excitada, saltando para um nível mais energético retornando ao seu estágio de repouso posteriormente após emissão de energia (A). Exemplo de molécula fotoprotetora sendo excitada e por ressonância seus elétrons a percorrem deixando-a com carga formal (B). Adaptado de RANGEL & CORRÊA, 2002.

Moléculas fotoprotetoras de natureza orgânica ou química:

Octocrileno (2-Ciano-3,3-difenillarylato de 2 etil-hexila) é um líquido viscoso, de coloração amarelo claro e aroma típico. Possui peso molecular de 361 e absorção máxima no UV de 303 nm em álcool etílico. Sua concentração de uso, de acordo com a legislação brasileira, é até 10% (HASSEN *et al*, 1995 e SHAATH, 2007). É um filtro solar de proteção no espectro do UVB usado para estabilizar a avobenzona e comercialmente é chamado de Parsol 1789. Este filtro é muito utilizado em formulações cosméticas comerciais, especialmente nas classificadas como não comedogênicas. Podemos considerar um dos poucos filtros capazes de serem incorporados facilmente em géis. Seu perfil de proteção se dá entre 290-360 nm, porém possui baixa substantividade (PALM & O'DONOGHUE, 2007) (Figura 18/ Tabela 6).

Benzofenona – 3 (2 – Hidroxi – 4 – metóxi – benzofenona; Oxibenzona) é um pó de coloração creme de odor leve. Possui peso molecular de 228 com absorção máxima no UV entre 288-325nm em álcool etílico. Sua concentração máxima de uso, de acordo com a legislação brasileira, é de 10% (HASSEN *et al.*, 1995 e SHAATH, 2007).

As benzofenonas possibilitam a proteção de amplo espectro e são muito compatíveis com os produtos cosméticos. Seu perfil de atuação perfaz os espectros UVA e UVB com espectro de ação de 270 – 350 nm. As benzofenonas, em geral, são as consideradas as mais alergênicas pelo FDA. Elas possuem alto índice de produção de dermatites de contato dentre todos os filtros solares e sua reação é exacerbada pelo sol e calor (PALM & O'DONOGHUE, 2007). As benzofenonas também possuem baixa substantividade e foi observado terem significativa taxa de absorção sistêmica por ter sido encontradas em ensaios de utilização tópica na urina e no sangue, porém não foram constatados efeitos biológicos sistêmicos (PALM & O'DONOGHUE, 2007) (Figura 18/ Tabela 6).

Etielhexiloxinamato – (p – Metoxinamato de 2 – etil-hexila; Octilmetoxinamato; Parsol MCX) é um líquido amarelo claro praticamente inodoro. Possui peso molecular de 290 com absorção máxima no UV de 311 nm em álcool etílico. Sua concentração máxima de uso, de acordo com a legislação brasileira, é de 10% (HASSEN *et al.*, 1995 e SHAATH, 2007). É o filtro solar da classe dos cinamatos mais comumente utilizado em filtros solares no mundo. Ele preencheu o espaço deixado pela rejeição ao PABA nos anos 80. Ele é uma potente molécula capaz de absorver a radiação UVB com pico de absorção de entre 270 – 328 nm. O octilmetoxinamato possui excelente estabilidade e confere bom perfil de resistência à água, seguro para uso humano e baixo potencial irritante. Seus efeitos colaterais, devido à sua ação semelhante ao estrogênio, foram demonstrados *in vitro* e *in vivo*, porém os estudos mostraram baixa absorção sistêmica (0,002% de concentração encontrada no plasma sanguíneo) e sem ações estrogênicas observadas em humanos (PALM & O'DONOGHUE, 2007) (Figura 18/ Tabela 6).

Característica das Moléculas Fotoprotetoras

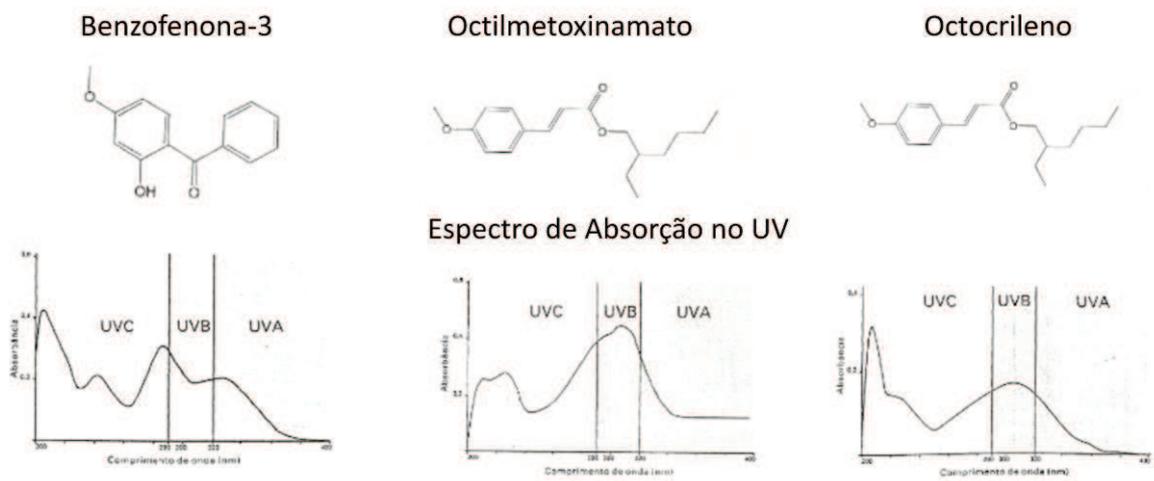


Figura 18: Estrutura química das moléculas fotoprotetoras e seus respectivos perfis de absorção de UV. Adaptado de HANSEN *et al.*, 1995

Tabela 6: Resumo das principais características das moléculas fotoprotetoras. Adaptado de SHAATH, 2007

Cor	Pó Amarelo	Líquido Amarelo Pálido	Líquido Amarelo Claro
Estabilidade	Boa Estabilidade	Excelente Estabilidade	Estável
Concentração de uso Máx. Merco Sul	10%	10%	10%
Solubilidade em H ₂ O	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
Solubilidade	Óleo Mineral	Miscível em Etanol	Solúvel em Álcool Etilíco
Moléculas	Benzofenona 3	Octilmetoxinamato	Octocrileno

1.7 - Métodos de Avaliação do Fator de Proteção Solar: passado, presente e futuro.

Fator de Proteção Solar (FPS)/ Fator de Proteção Contra Queimadura

A primeira metodologia para se avaliar a eficácia de sistemas fotoprotetores foi desenvolvida em 1962 pelo pesquisador australiano Franz Greiter. Esta metodologia é reconhecida em qualquer formulação de proteção solar como FPS (Fator de Proteção Solar) (OSTERWALDER & HERZOG, 2009 e PALM & O'DONOGHUE, 2007).

A metodologia foi adotada oficialmente pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como método oficial de avaliação do perfil fotoprotetor em 1978, sendo então definido o FPS como o eritema mínimo percebido ou mínima dose eritematosa (MDE) entre a pele fotoprottegida e a não fotoprottegida, obtido finalmente pela seguinte equação (PALM & O'DONOGHUE, 2007):

$$\text{FPS} = \frac{\text{Dose Mínima Eritematosa (MDE) Pele Fotoprottegida}}{\text{Dose Mínima Eritematosa (MDE) Pele não Fotoprottegida}}$$

O sistema FPS tem como objetivo avaliar a capacidade de um *filtro solar* em proteger a pele contra a queimadura solar. Este ponto passa a ser crítico uma vez que a radiação UVB tem 1000 vezes mais capacidade de produzir eritema do que a UVA. Assim sendo, o FPS passa a ser uma metodologia aplicada diretamente entre a relação da proteção solar e o comprimento de onda do UVB, negligenciando-se os efeitos dos demais comprimentos de onda emitidos pelo sol (PALM & O'DONOGHUE, 2007).

A determinação do FPS *in vivo* de acordo com o FDA é feita utilizando-se 20 indivíduos sadios de pele branca, sendo homens e mulheres com sensibilidade mediana ao UV. Em uma parte das costas de cada indivíduo (0,3 m x 0,3 m), aplica-se o produto (2 mg/cm²), deixando também uma parte descoberta (superfície teste), separada por uma fita de 1 cm de largura. Irradia-se com lâmpada UV de 300 w durante 15 a 20 minutos após a aplicação do produto. Então, observa-se o tempo de formação do eritema e obtém-se o FPS após a realização dos cálculos (OSTERWALDER & HERZOG, 2009 e PALM & O'DONOGHUE, 2007).

O padrão utilizado pelo FDA é uma formulação contendo 8% de salicilato de homomentila, que confere um FPS de 4,47 a esta formulação. Para o *Cosmetics Europe - The Personal Care Association* (COLIPA) a fórmula padrão contém 2,7% de p-metoxicinamato de octila (FPS 3,7 ± 0,3) (OSTERWALDER & HERZOG, 2009 e PALM & O'DONOGHUE, 2007).

A Comunidade Europeia recomenda a classificação dos filtros solares em baixa proteção para as formulações com FPS entre 6 – 10, média proteção para as de FPS 15, 20 e 25 e alta proteção para as formulações com FPS entre 30 e 50. São classificadas de

alta fotoproteção as formulações cujo FPS está acima de 50, e a simbologia de rotulagem é 50⁺ (OSTERWALDER & HERZOG, 2009).

A indicação de FPS nos rótulos de protetores solares tem gerado confusão desde sua implementação até os dias atuais. Uma formulação de FPS 30 teria metade da capacidade fotoprotetora de uma formulação contendo FPS 60. Tecnicamente, um fotoprotetor de FPS 30 tem capacidade de absorver 96,7% dos raios eritematosos (UVB) enquanto uma formulação de FPS 60 é capaz de absorver 98,3% dessa radiação. Desta maneira há um aumento de proteção de apenas 1,6% entre as duas formulações mencionadas anteriormente (OSTERWALDER & HERZOG, 2009).

Ao se observar a incidência de uma conhecida quantidade de fótons sobre peles fotoprotetidas com filtros solares de FPS 10 e 50 respectivamente observa-se que o filtro de FPS 10 permite a passagem de uma quantidade de 10 fótons e o de FPS 50 de 2 fótons. O filtro de FPS 50 possui uma eficácia de bloquear 98% dos fótons incididos enquanto o de FPS 10 de 90%. Ambos possuem bom perfil de fotoproteção, porém dependendo da indicação da formulação solar um deles pode ser requisitado (OSTERWALDER & HERZOG, 2009) (Figura 19).

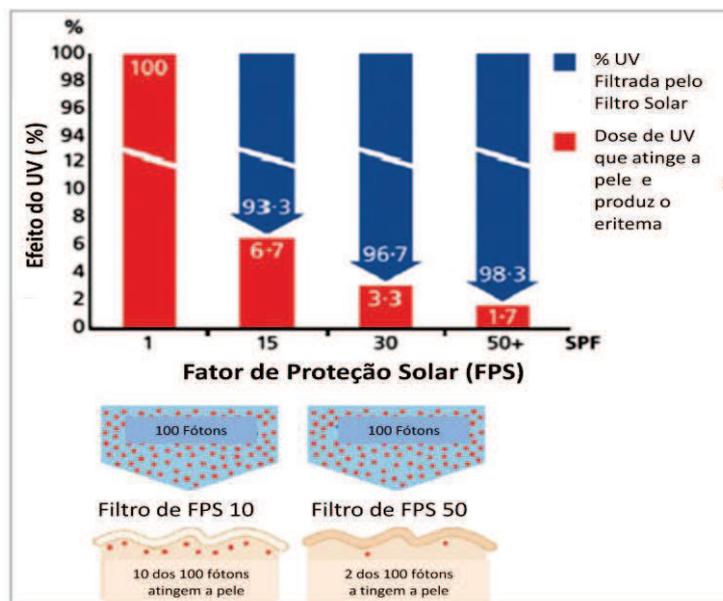


Figura 19: Eficácia de fotoproteção de duas formulações de FPS distintos (FPS 10 e FPS 50) e seu perfil de retenção de fótons que atingem a pele. Adaptado de OSTERWALDER & HERZOG, 2009.

FPS in silico

A metodologia de FPS *in silico* é baseada em plataforma que permite a avaliação da distribuição das moléculas fotoprotetoras sobre a pele, tendo em vista a

irregularidade superficial da pele e a distribuição das moléculas na formulação em estudo (Figura 21) (OSTERWALDER & HERZOG, 2009). A partir do conceito de que a distribuição do filtro solar na pele é irregular e considerando também o perfil fotoestável da formulação (capacidade do filtro solar em resistir à radiação UV) há um erro teórico na proteção da pele quando se observa a fotoproteção por essa óptica. Esta metodologia permite o auxílio para o entendimento do real desempenho dos filtros solares quando aplicados sobre a pele (OSTERWALDER & HERZOG, 2009) (Figura 20).

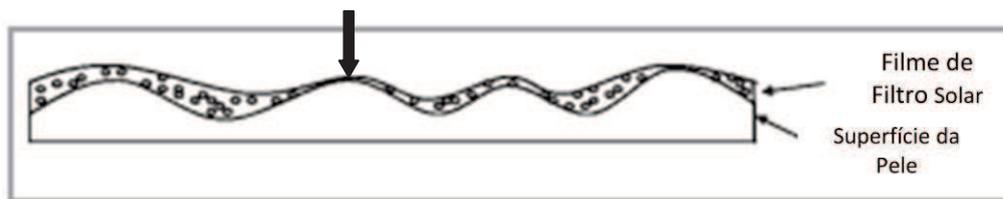


Figura 20: Distribuição do filtro solar sobre a superfície da pele. Círculos representam distribuição quantitativa das moléculas fotoprotetoras. Destaque (seta) para região desprovida de moléculas fotoprotetoras. Adaptado de OSTERWALDER & HERZOG, 2009.

Metodologias para proteção à radiação UVA

A metodologia de avaliação de FPS possui correlação direta com o perfil fotoprotetor responsável por inibir a queimadura solar proveniente da radiação UVB. Este fato exclui teoricamente o perfil fotoprotetor das formulações solares quanto aos efeitos dos raios responsáveis pelo envelhecimento e pela melanogênese, i.e. UVA (OSTERWALDER & HERZOG, 2009).

O primeiro órgão regulamentador a idealizar um método capaz de avaliar o perfil fotoprotetor para raios UVA foi a Organização japonesa. O método desenvolvido por este órgão foi embasado no potencial da radiação UVA em produzir pigmentação e ficou popularmente conhecido como PPD (do inglês *Persistent Pigment Darkening*). Este método agora é aceito pela comunidade Europeia, pela FDA e está sendo harmonizada por todo o mundo. Para que um filtro solar forneça proteção é necessário que este represente 1/3 do FPS rotulado (OSTERWALDER & HERZOG, 2009). As informações de proteção UVA estão distribuídas nos rótulos ainda de forma confusa. O órgão regulamentador inglês confere fotoproteção UVA para um filtro solar dando a ela a terminologia ultra e cinco estrelas mais a sigla UVA. O FDA confere quatro estrelas

para o sistema de máxima proteção UVA, ou a sigla PA (*Protection A*) associada a quatro sinais positivos. A Comunidade Europeia confere a sigla UVA para o sistema capaz de conferir fotoproteção sem distinguir o perfil máximo ou o mínimo. Já a comunidade japonesa e a australiana conferem a mesma informação de rotulagem que o FDA (OSTERWALDER & HERZOG, 2009). (Figura 21)



Figura 21: Simbologia adotada nos textos de rotulagem de filtros solares com proteção UVA por diferentes órgãos regulamentadores. Adaptado de OSTERWALDER & HERZOG, 2009.

Fator de Proteção Imunológico – IPF

O fator de proteção imunológico foi um método idealizado com a perspectiva de preservar as características imunológicas da pele, uma vez que a incidência da radiação ultravioleta sobre ela leva à diminuição da densidade de certos tipos celulares, como por exemplo, das células de Langerhans (MC LEAN & GALLAGHER, 1998 e OSTERWALDER & HERZOG, 2009). Não há qualquer correlação desse efeito com a UVB, porém há uma grande correlação com a UVA.

Fator de Proteção Solar Integral – iFPS

Esta metodologia foi proposta por Zastrow *et al.* (2004) que teve como objetivo integrar os perfis fotoprotetores de metodologias já propostas em um sistema que se embasasse na formação de radicais livres pela radiação UV tendo em vista, que a formação de radicais livres é ponto de início da formação de danos na pele em decorrência da radiação UVB e UVA. Assim sendo, integrando-se estes dois perfis tem-se um perfil fotoprotetor integral (OSTERWALDER & HERZOG, 2009).

Com o objetivo de harmonizar parâmetros analíticos e padrões de rotulagens de filtros solares no Mercosul a ANVISA publicou no dia 1 de junho de 2012 a resolução RDC N° 30 (DOU, 2012 ANVISA, 2012). A partir desta resolução ficou definido, em consonância com outras agências reguladoras como FDA, que o mínimo conferido de FPS para um produto fotoprotetor passaria de 2 para 6, os termos “proteção” ou “bloqueio total” da radiação ficam vetados e apenas testes específicos de substantividade poderão dar aos filtros solares os termos “resistente” e “à prova de água ou suor”. A proteção à radiação UVA deve ser 1/3 da proteção à UVB, desta maneira o consumidor poderá ter mais segurança e informação ao adquirir um produto fotoprotetor (DOU, 2012 ANVISA, 2012) (Figura 22).



Figura 22: Informe sobre novas regras de rotulagem para filtros solares. Disponível em: <http://protetoresdapele.org.br/anvisa-cria-novas-regras-para-fabricacao-de-protetores-solares/>, acessado em 07/06/2012

2. JUSTIFICATIVA

A relevância do estudo está no fato de existirem na literatura poucos estudos utilizando análises morfológicas e moleculares de lesões induzidas pela Luz Solar Simulada (LSS).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver metodologia de avaliação do potencial fotoprotetor de formulação contendo filtros solares químicos com FPS 30 estimado, utilizando abordagens morfológicas e moleculares em camundongos *hairless* submetidos à LSS.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar com auxílio de câmera videodermastoscópica as alterações superficiais da pele dos animais controles, irradiados, com filtro ou com veículo.
- Analisar macroscopicamente o perfil da vascularização cutânea dos animais dos grupos de estudo.
- Analisar, através de técnica de microscopia óptica de rotina, a pele dos animais dos grupos de estudo.
- Avaliar, através de técnica de imuno-histoquímica, a expressão do Fator von Willebrand (VWF) na pele dos animais dos grupos de estudo.
- Analisar, através de cortes semi-finos, a pele dos animais de todos os grupos.
- Analisar, através de microscopia eletrônica de varredura, o padrão ultraestrutural da pele dos animais controles.

- Analisar estatisticamente as possíveis alterações morfológicas dos animais dos grupos de estudo

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos *hairless* machos adultos (HRS/J – UFRJ) (n=60) com 12 semanas, provenientes do biotério do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ foram mantidos em gaiolas à temperatura de 25 a 28°C, em fotoperíodo de 12/12 horas com iluminação artificial. Os animais receberam ração e água sem restrições até a época do sacrifício. Esses animais estavam agrupados em caixas, de acordo com o desenho do estudo (abaixo).

A utilização desse modelo animal foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências da Saúde – CCS protocolo **DAHEICB 065**.

Tabela 7: Desenho dos grupos de estudo

	G1	G2	G3	G4
Características dos Grupos	Animal não exposto à radiação (Controle)	Animal exposto à radiação sem fotoproteção (Irradiado)	Animal exposto à radiação com fotoproteção (Filtro)	Animal exposto à radiação coberto por formulação sem moléculas fotoprotetoras (Veículo)
Número de Animais para Análise Estatísticas	05	05	05	05

4.2 Formulação fotoprotetora contendo filtros solares químicos e veículo

Para o desenvolvimento de metodologia de avaliação do perfil fotoprotetor de filtros solares químicos foi utilizada uma formulação fotoprotetora na apresentação gel-creme de FPS 30, de procedência da Farmácia Universitária – FU – UFRJ, lote nº 69,

contendo as seguintes moléculas fotoprotetoras: octocrileno, benzofenona – 3 e octilmetoxicinamato.

Esta formulação foi obtida por um processo de incorporação direta das moléculas fotoprotetoras em um veículo gel-creme no qual constam os seguintes excipientes e suas devidas concentrações:

Tabela 8: Formulação gel-creme - veículo (Fase A e Fase B) e concentração das moléculas fotoprotetoras (Fase C).

Fase A	Fase B	Fase C
Glicerina 5,0%	Álcool Cetoestearílico Etoxilado 5,0%	Octilmetoxinamato 9,0%
Metilparabeno 0,1%	Ácido Estearílico 5,0%	Octocrileno 9,0%
Aminometilpropanol 95% /0,3%	Estearato de Isooctila 7,0%	Benzofenona - 3 / 8,0%
Structure XL 1,0%	Silicone DC 245 (344) 11,0%	
Imidazolidinil Uréia 0,2%	Monoestearato de Glicerila 3,0%	
	Silicone Dc 9,5%	
	Água destilada qsp 100mL	

O veículo gel-creme foi obtido através da mistura em temperatura média de 70°C, sob agitação constante, dos componentes da Fase A e B e posteriormente C. Os componentes da fase A foram solubilizados até atingir a temperatura de 70°C e os componentes da fase B, solubilizados também a quente até atingirem a temperatura de 75°C. Com ambas as fases em estado líquido e solubilizadas, foi vertida a fase B sobre a fase A, com auxílio de agitador com velocidade moderada e constante até a obtenção de uma emulsão. Após esta etapa, ainda sob agitação e temperatura de 40°C, foram adicionadas as moléculas fotoprotetoras e se manteve a agitação até chegar à temperatura ambiente (Procedimento Operacional Padrão para Fabricação de Filtros Solares, Farmácia Universitária UFRJ, Rio de Janeiro – RJ 2011).

4.3 Metodologia para irradiação

As condições descritas neste protocolo foram baseadas nos estudos de Sophie Queille *et al.*, 1998. Esses pesquisadores utilizaram a LSS proveniente de um simulador solar para induzir carcinogênese em camundongos *hairless* SKH: HR1 verificando a relação apenas dos comprimentos de onda UVA e UVB. O protocolo utilizado em nosso estudo foi o mesmo praticado no Laboratório de Radiobiologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, que utiliza em seus estudos a LSS proveniente de um simulador que mimetiza as características de um dia de sol no verão da cidade do Rio de Janeiro (Latitude - 22,9 e Longitude - 43,17) (IBGE, 2012 e CPTE, 2012). O Simulador solar utilizado foi o modelo 69920 da marca NewPort Oriel, o qual emite UVA $104,0 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (92,63%) e UVB $8,15 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (7,26%). Foram utilizados filtros atenuadores atmosféricos AMO + 81017.

O tempo de exposição de quinze minutos ao dia durante cinco dias à LSS foi determinado a partir de curva padrão dose *versus* resposta, desenvolvida pelo nosso grupo, pois o aspecto rosado do animal impossibilitou a administração de doses eritematosas.

Para a obtenção da curva, os animais foram anestesiados com solução ketamina/xilazina, expostos ao simulador solar a uma distância de 40 cm da fonte luminosa, e com a aplicação de um papel cartão de cor preta contendo orifícios para a passagem da LSS, que incidiu sobre o animal nos tempos de 15, 30 e 45 minutos. A dose mínima responsável por causar queimadura nos animais imobilizados foi de 15 minutos (Figura 23 e Figura 24). Esse tempo de exposição à LSS corresponde a uma dose diária de $16,65 \text{ kJ/m}^2/\text{s}$ de UVA e $3,33 \text{ kJ/m}^2/\text{s}$ de UVB. Durante as exposições o perfil de emissão de UVA e UVB provenientes do simulador solar foi aferido com auxílio de dosímetro (VILBER LOURMAT, VLX-3-W).

Durante as exposições dos grupos G1, G2, G3 e G4 à LSS, os animais não foram imobilizados fisicamente através de substâncias indutoras de analgesia, o que permitiu que eles pudessem caminhar pelo campo proposto (Figura 25) perfazendo uma dinâmica de movimentação com execução de movimentos em quatro patas, duas patas, saltos e produzindo sombras sobre seu corpo. (Figura 26 A e B).

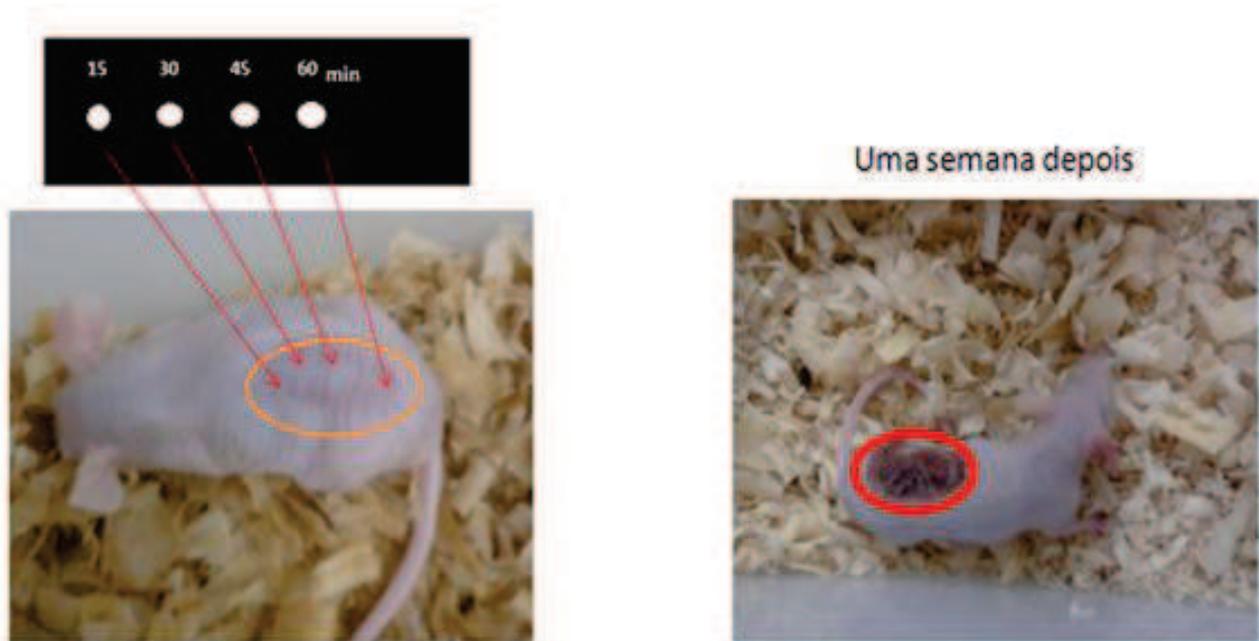


Figura 23: Esquema representativo da elucidação da dose mínima necessária para se produzir uma queimadura no animal modelo, utilizando simulador solar. O círculo laranja representa uma região edemaciada pós-ensaio de queimadura. As setas indicam o tempo de exposição à radiação sobre a pele. O círculo em vermelho indica uma região de queimadura sem distinção entre início e fim da lesão.

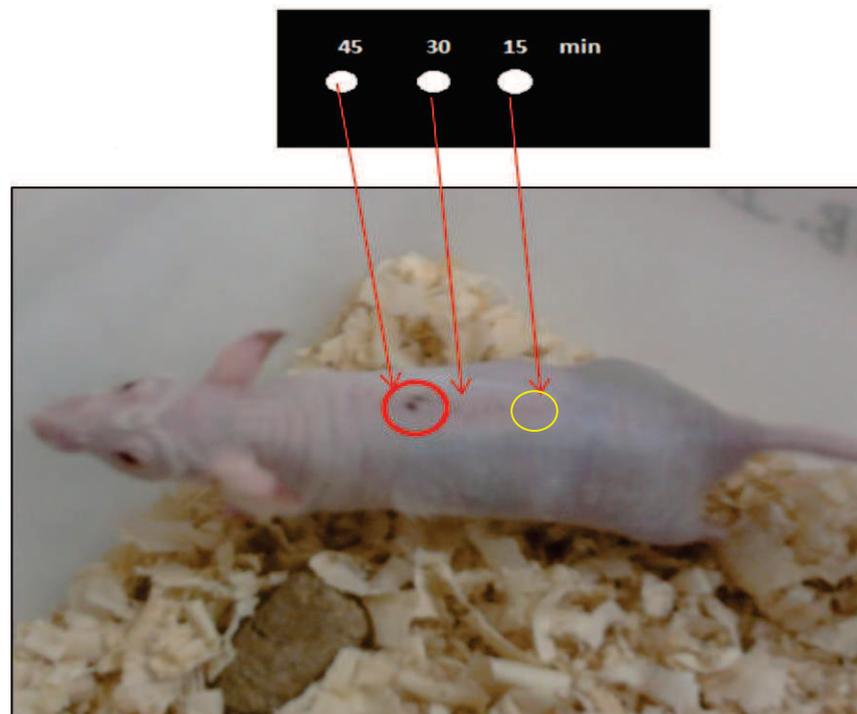


Figura 24: Esquema representativo da resposta para elucidação da dose mínima necessária para se produzir uma queimadura no animal modelo utilizando simulador solar. Aumento da distância entre os orifícios. Círculo em vermelho representando a queimadura solar, círculo em amarelo representando a dose mínima necessária para produzir uma queimadura solar.

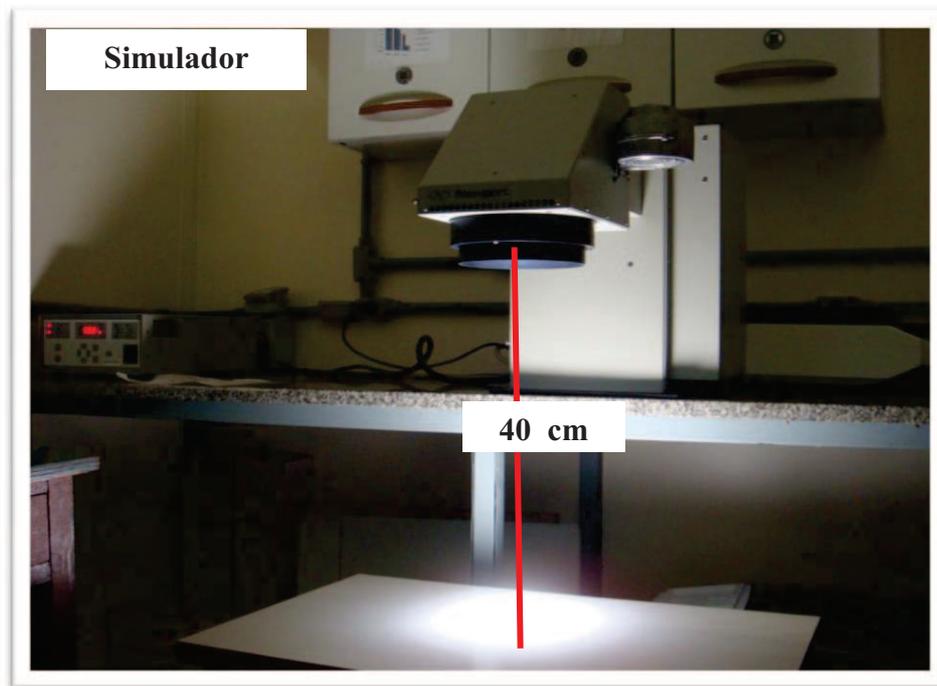
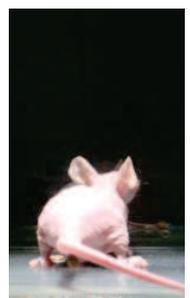
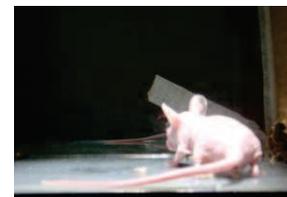
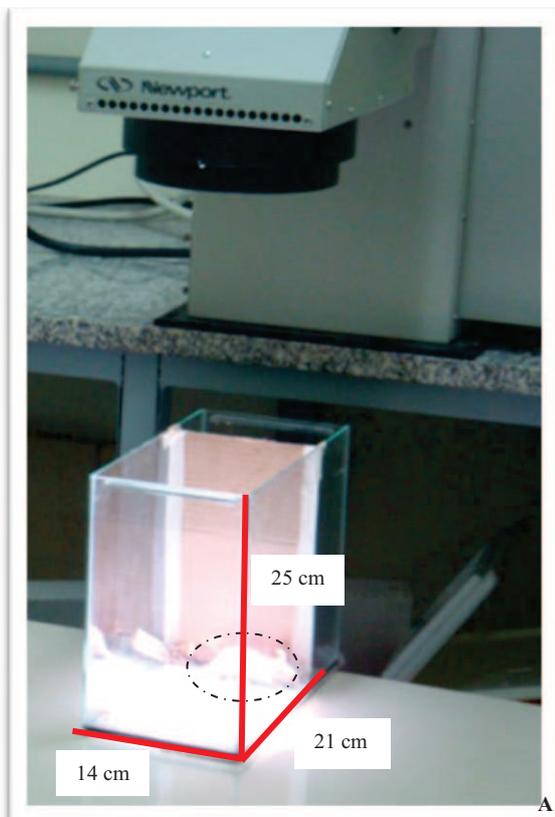


Figura 25: Fotografia do simulador de luz solar e aparato utilizado para irradiar os animais (campo). Destaque para a fonte luminosa a uma distância de 40 cm da base receptora.



B

Figura 26: Fotografia mostrando o animal sendo irradiado. Destaque para aquário adaptado para circunscrever o campo da fonte emissora com área de 294 cm². Destaque do animal (elipse tracejada) sob incidência da fonte emissora (A). Dinâmica geral de movimentações do animal durante o procedimento experimental. Setas apontam para a formação de sombra sobre o animal (B).

4.4 – Metodologia de aplicação da formulação fotoprotetora FPS 30 FU – UFRJ e formulação do veículo.

Antes da exposição, 2 mg/cm² de formulação fotoprotetora foram aplicadas sobre a pele do dorso dos animais do grupo filtro (ver item 4.1). A mesma metodologia foi utilizada para a aplicação da formulação sem moléculas fotoprotetoras (veículo). O tempo e quantidade utilizados seguem os *guidelines* das agências regulatórias internacionais como FDA e a União Europeia (OSTERWALDER & HERZOG, 2009) (Figura 27).

4.5 Análise da superfície da pele através de câmera videodermatoscópica

As análises da superfície da pele dos animais foram feitas em câmera dermatoscópica (Digital Mycroscope USB) com capacidade de aumento de 230 vezes. Antes dessas análises, a pele dos animais foi previamente limpa com água, à temperatura ambiente, com auxílio de algodão para que nenhum tipo de impureza interferisse na interpretação das imagens (Figura 27).

4.6 Análise de neovascularização

Para observação e análise do perfil da rede vascular da pele dos grupos em estudo (G1, G2, G3 e G4) utilizou-se câmera fotográfica SONY CYBER SHOT 14.4 mega pixels. Depois de feitas as biopsias, estas foram fixadas em solução de paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato pH 7,4 durante 5 minutos. Em seguida os fragmentos de pele foram fotografados para posterior análise estatística (Figura 27).

4.7 Metodologia para análise microscópica

4.7.1 Microscopia Óptica

O material proveniente das biópsias dos animais foi fixado em solução de paraformaldeído 4% e crioprotetado em sacarose 30% para montagem dos blocos.

Foram realizados cortes histológicos (7,0 µm) a partir de criostato (Leica CM1850 UV). Estes cortes foram submetidos à técnica de coloração de rotina (coloração por hematoxilina e eosina). As lâminas contendo os cortes foram cobertas com lamínulas e analisadas ao microscópio óptico (Zeiss Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss, Baltimore, Maryland, USA) (MIGUEL, 2002) (Figura 27).

4.7.2 Técnica para imuno-histoquímica

Para evidenciar a expressão do fator de fator de VWF os cortes histológicos foram submetidos a 5 banhos, com duração de 5 minutos cada, de uma solução de Triton a 0,3% em tampão fosfato (PBS). Os antígenos inespecíficos foram bloqueados utilizando solução de soro fetal bovino (BSA) (Sigma) 10% por 30 minutos. Após o bloqueio o material foi submetido a 5 lavagens, com duração de 5 minutos cada, com solução Triton a 0,3% em PBS e em seguida recebeu o anticorpo-primário, anti FvW (Dako, “Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor” código A0082 1:200) separadamente em lâminas distintas. As lâminas contendo o material histológico foram colocadas à 4°C em câmara úmida, ao longo da noite.

No dia seguinte as lâminas contendo o material foram submetidas a 5 banhos, com duração de 5 minutos cada, de solução de Triton a 0,3% em PBS e após, incubadas em anticorpo secundário (mouse anti-rabbit IgG-HRP sc-2357, Santa Cruz) durante o período de 2 horas. O material foi imerso em solução DAPI por 30 segundos e em seguida os cortes foram lavados com solução PBS e montados com *fluoromount* para a observação ao microscópio de fluorescência de rotina (Zeiss Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss, Baltimore, Maryland, USA) (Figura 27).

4.7.3 Microscopia óptica (Cortes semi-finos)

A pele da região dorsal (exposta à radiação) foi retirada dos animais em estudo com auxílio de tesoura cirúrgica. Após a retirada do material, o mesmo foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% em pH 4,7 durante 10 minutos. Em seguida os fragmentos de pele foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% tamponado com cacodilato de sódio (CaCo) 0,1 M em pH 7,4 4°C ao longo da noite em frasco do tipo eppendorf®.

Após esta etapa, no dia seguinte, foi realizado o descarte da solução pós-fixadora e em seguida lavou-se o material três vezes por 5 minutos (cada lavagem) em tampão CaCo e procedeu-se à etapa de osmificação do material em estudo.

Na osmificação o material ficou em contato com uma mistura de tetróxido de ósmio a 1% tamponado em CaCo 0,1 M, ferrocianeto de cálcio e cloreto de cálcio (1:1:1) durante 1:30 hora, protegido da luz com auxílio de papel laminado para impedir a precipitação do ósmio.

Como passo seguinte lavou-se três vezes o material por 5 minutos (cada lavagem) com tampão CaCo. Prosseguiu-se a lavagem do material em água destilada e posteriormente, submetendo o material à solução aquosa de acetato de uranila a 1% durante a noite. No dia seguinte, procedeu-se à desidratação do material em concentração crescente de acetona (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%).

Após a desidratação do material prosseguiu-se com a infiltração do mesmo em acetona e resina Poly Bed 812® (1:1) ao longo da noite, sob leve agitação. No dia seguinte a mistura foi substituída por resina pura cobrindo totalmente os fragmentos, ao longo da noite, sob leve agitação. Após esta etapa, o material permaneceu durante dois dias em contato com a resina pura a -4°C para infiltração desta no tecido, seguindo-se a feitura dos blocos.

Uma vez feitos os blocos contendo o material procedeu-se à etapa de trimagem dos mesmos para obtenção das pirâmides e feitura dos cortes ao ultramicrotomo. Então, cortes semi-finos de aproximadamente 500 nm foram obtidos (de cor verde e rosa) e corados pelo azul de toluidina a 1% (Figura 27).

4.7.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura foram seguidos os mesmos passos descritos no item 4.7.3, porém não foi realizada a fixação do material em acetato de uranila e as seguintes etapas foram realizadas: lavou-se três vezes o material por 5 minutos (cada lavagem) com auxílio de tampão CaCo e desidratou-se o material com auxílio de soluções de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 80, 90%, por duas vezes, sete minutos cada) até o etanol absoluto por duas vezes, 15 minutos cada.

Posteriormente o material foi secado através do ponto crítico (CPD 030, *Blazers Instruments, Liechtenstein*), fixado ao suporte com auxílio de fita dupla-face e então

pulverizado com o ouro (metalização pelo equipamento FL-9496 *Balzers Union Coater*). As amostras foram levadas ao microscópio eletrônico (JEOL JSM-5310) para captação das imagens (Figura 27).

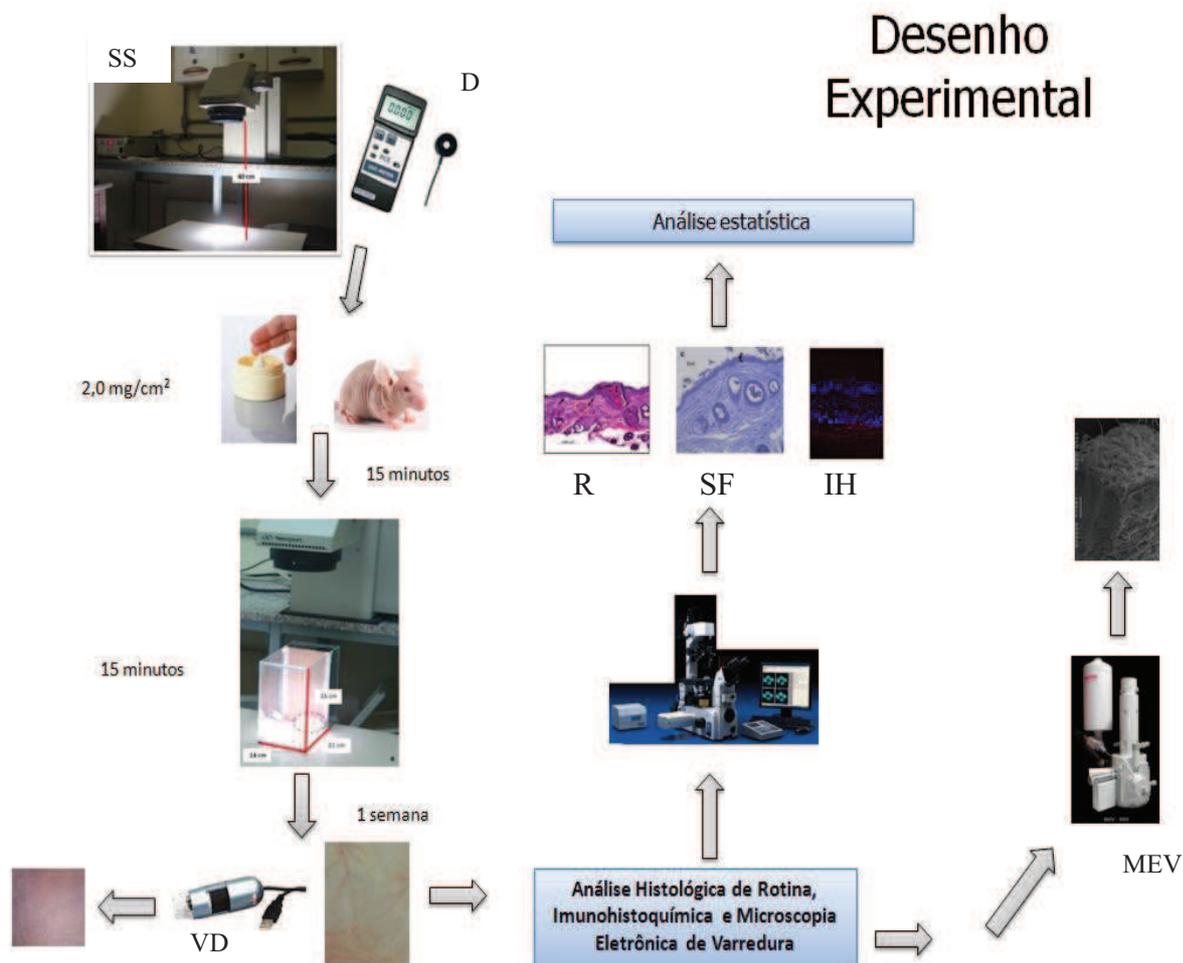


Figura 27: Resumo das principais etapas do experimento. Após aferir-se o perfil de emissão de UVA e UVB provenientes do simulador solar (SS) com auxílio de dosímetro (D). Os animais dos grupos G2, G3 e G4 foram expostos individualmente durante 15 minutos a LSS. Antes de expor-se os animais dos Grupos G3 e G4 estes foram cobertos por 2 mg/cm² da formulação fotoprotetora e veículo respectivamente 15 minutos antes da exposição para que houvesse a melhor penetração das moléculas fotoprotetoras e do veículo através da pele. Uma semana após a exposição as biópsias da pele do dorso foram realizadas. A superfície da pele fora documentada por câmera videodermatoscópica (VD) e a derme fora fotografada. Análise de microscopia óptica de rotina (R), cortes semifinos (SF), imunohistoquímica (IH) e análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas a partir das biópsias.

4.8 Estatística

4.8.1 Metodologia para análise das biópsias da pele dos grupos de estudo

Para a análise estatística da neovascularização nas biópsias foram selecionadas quatro áreas de 5 mm² por espécime, sem derrames. Após, foram escolhidas as extremidades dos vasos da pele da região dorsal (Figura 28).

As extremidades selecionadas foram analisadas com auxílio do software Image Pro 4.5.1.29 através da metodologia de segmentação da imagem, que consiste em transformar cada vaso sanguíneo em uma linha/pixel para que posteriormente este possa ser quantificado por área ocupada da derme.

4.8.2 Metodologia para análise da espessura da epiderme e celularidade da pele do dorso dos animais dos grupos estudados

Com o objetivo de medir a espessura média da epiderme entre os grupos estudados, foram escolhidas imagens com regiões livres de anexos da pele e queratose folicular. Foi realizado um traçado nos limites superior e inferior, e interno e externo da epiderme com auxílio do software Image Pro 4.5.1.29. O valor final encontrado foi resultante da média desses limites (SAUD *et al.*, 2012) (Figura 29.A).

Para a análise da celularidade foram escolhidas regiões também, sem anexos da pele. Então, selecionadas as regiões de estudo, cada núcleo de célula foi transformado em uma cor (análise por seguimentação de imagem) em seguida transformada em pixel para que posteriormente pudessem ser quantificados por área ocupada na derme (5 mm²) (SAUD *et al.*, 2012) (Figura 29.B).

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de múltipla correção de Dunns. O valor de significância estatística foi estabelecido ao nível de $p < 0.05$ utilizando o editor de gráfico Prisma (Software, Inc., USA versão 5.00).

5 – RESULTADOS

5.1 – Análise histológica para o ensaio de queimadura

A observação da evolução das lesões após uma semana de submissão dos animais ao ensaio de queimadura possibilitou-nos obter queimaduras em estágios de primeiro, segundo e terceiro graus. Todas as lesões apresentaram diferentes intensidades de: vasodilatação, edema epidérmico e dérmico seguidos de necrose epidérmica superficial e parcial nas lesões de primeiro grau e total nas de segundo. A queimadura de terceiro grau apresentou necrose de coagulação com espessura total da epiderme e derme e formação de cicatriz hialina (Figura 30).

5.2 - Perfil de Emissão Médio, por Estudo, de Irradiação Emitida pelo Simulador Solar ao Longo dos Grupos Estudados

Foram realizados doze estudos de exposição à LSS e foram selecionados os cinco que representavam melhor a metodologia desenvolvida. Em cada estudo foi utilizado um animal de cada grupo (G2, G3 e G4) acompanhando-se o perfil de emissão de UVA e UVB do Simulador Solar. Assim sendo o perfil médio de dose ao longo dos estudos de UVA foi de 415,647 kJ/m²/s e de UVB foi de 830,7 kJ/m²/s com pico médio de emissão de 433,800 kJ/m²/s de UVA e 85,950 kJ/m²/s no estudo cinco. Já no estudo quatro foram observadas as menores taxas de emissão 402,165 kJ/m²/s de UVA e 78,750 kJ/m²/s de UVB. Essas variações, entretanto, não se mostraram significativamente diferentes, indicando que ao longo de todo o estudo as doses totais de energia UV não variaram (Figura 31).

5.3 Análise da superfície da pele com câmera Videodermatoscópica

A observação da pele dos animais em estudo com auxílio de câmera videodermatoscópica não evidenciou alterações morfológicas superficiais nos animais dos diferentes grupos de estudo (G1, G2, G3 e G4). Não foram observadas alterações clínicas decorrentes da exposição como, por exemplo: a formação de rugas e queratoses (Figura 32).

5.4 Análises das biopsias

A observação das biópsias da pele dos animais controles mostrou ser esta constituída por quatro plexos vasculares: dois inferiores e dois superiores que se ramificam em segmentos vasculares de menor calibre (secundário), passando para segmentos cada vez menores (terciário e quaternário), observáveis macroscopicamente. (Figura 33.G1) (Figura 40)

As biópsias das peles dos animais expostos à radiação sem fotoproteção apresentaram intumescimento do segmento vascular principal com aumento de neovasos dos segmentos menores (terciário e quaternário). (Figura 33.G2) (Figura 40)

As biópsias das peles dos animais expostos à radiação cobertos por formulação fotoprotetora não apresentaram alterações morfológicas macroscópicas dos segmentos vasculares mostrando distribuição conforme os animais controle. (Figura 33.G3) (Figura 40)

As biópsias das peles dos animais expostos à irradiação e cobertas por formulação sem moléculas fotoprotetoras também apresentaram dilatação do segmento vascular principal com aumento de neovasos a partir dos segmentos menores, assim como dos animais expostos à radiação sem fotoproteção (Figura 33.G4) (Figura 40).

5.5 Análise imuno-histoquímica para o fator de von Willebrand

As análises imuno-histoquímicas mostraram a expressão do fator Von Willebrand na derme da pele dos animais em estudo. A expressão mais evidente deste fator foi observada na biópsia da pele dos animais expostos do grupo veículo (Figura 34.G4).

5.6 Análise Através da Microscopia Óptica de Rotina da Pele do Dorso

A análise morfológica através hematoxilina & eosina da pele do animal controle apresentou perfil histológico normal. A epiderme apresentou o epitélio pavimentoso com no máximo duas camadas de células e derme papilar e derme reticular delimitadas, sem diferenças morfológicas quanto à sua organização, isto é matriz extracelular, celularidade e anexos cutâneos (glândulas sebáceas e folículos pilosos) (Figura 35.G1) (Figura 42 e 43).

A análise histológica da pele do animal exposto à LSS sem fotoproteção apresentou alterações morfológicas, destacando-se espessamento da epiderme e infiltrado inflamatório na região estudada, presença de tampões foliculares e hiperplasia da glândula sebácea. (Figura 35.G2A e 35.G2B) (Figura 42 e 43)

A morfologia da pele do animal coberto por formulação sem moléculas fotoprotetoras apresentou espessamento da epiderme e infiltrado inflamatório quantitativamente maior quando comparado aos outros grupos de estudo (Figura 35.G4) (Figura 42 e 43).

A análise histológica da pele submetida à LSS dos animais fotoprotetidos apresentou perfil histológico similar ao do animal-controle, ou seja, sem alterações morfológicas estatisticamente significativas. (Figura 35.G3) (Figura 42 e 43)

5.7 Análise Através da Microscopia Óptica de Rotina da Pele de Orelhas

A análise histológica através da hematoxilina & eosina da pele das orelhas do animal controle apresentou perfil histológico normal com epiderme mostrando espessura delgada, derme sem alterações morfológicas quanto à organização da matriz extracelular, celularidade e anexos cutâneos (glândulas sebáceas e folículos pilosos) (Figura 36.G1). Já a histologia da pele do animal submetido LSS não fotoprotetido apresentou alterações morfológicas como o espessamento da epiderme e aumento da celularidade (Figura 36.G2). A morfologia da pele do animal submetido à LSS coberto por formulação fotoprotetora apresentou perfil similar ao do animal-controle, ou seja, sem alterações morfológicas significativas (Figura 36.G3). A morfologia da pele do animal submetida à LSS coberto por formulação sem moléculas fotoprotetoras apresentou espessamento da epiderme e intenso infiltrado inflamatório na região estudada (Figura 36.G4).

5.8 – Análises Através da Microscopia Óptica de Cortes SemiFinos

As fotomicrografias obtidas a partir de cortes semifinos da pele dos animais estudados apresentaram o mesmo padrão de alterações morfológicas visualizados nos cortes obtidos por congelamento, destacando-se o aumento de espessura da epiderme e o aumento da celularidade na região da derme (Figura 37).

5.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou a elucidação ultraestrutural da superfície da pele dos animais modelo, destacando-se a presença de pelos vestigiais em toda a região da pele do dorso do animal (Figura 38 e 39).

6 - ESTATÍSTICA

6.1 - Biopsia da Pele dos Grupos de Estudo

A análise estatística revelou diferença significativa entre o grupo G4 e os grupos G1 e G3 no nível de $P < 0.05$ de acordo com a metodologia teste utilizada (Figura 40).

6.2 Análise da Espessura da Epiderme e Celularidade da Derme da pele do Dorso dos Animais Dos Grupos Estudados

Embora a epiderme do grupo G4 tenha se demonstrado mais espessa que a dos grupos G1 e G3 e não muito diferente do grupo G2, a análise estatística demonstrou somente diferença significativa entre os grupos G1 e G4 e uma tendência entre os demais grupos no nível de $P < 0.05$ (Figura 41).

A análise estatística demonstrou que a celularidade dérmica do grupo G2 foi maior que dos grupos G1 e G3 mas não maior que G4 embora a relevância significativa tenha sido observada no grupo entre o grupo G2 e G3 (Figura 42).

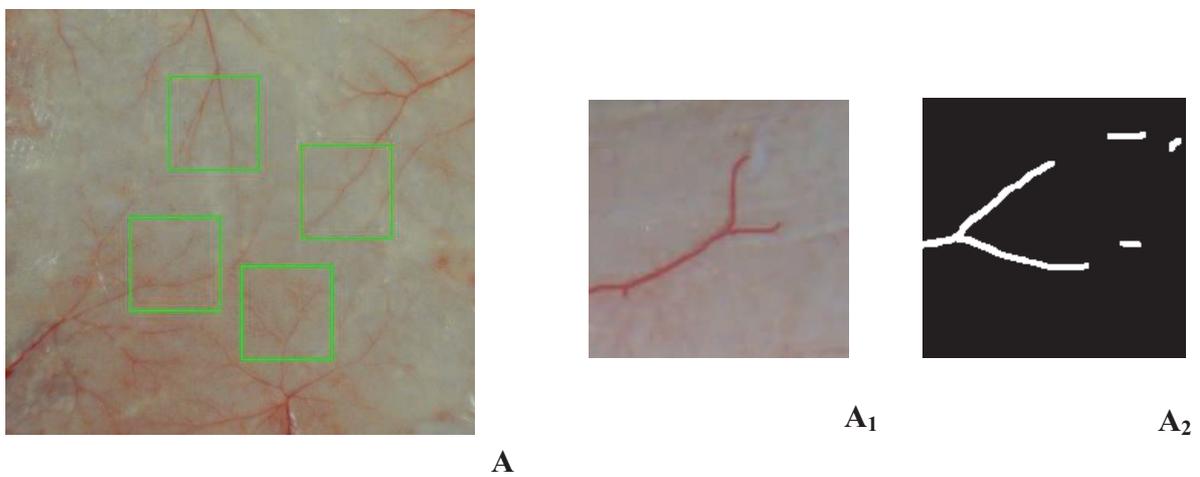


Figura 28: Fotomicrografias mostram as biopsias de áreas para análise estatística de neovascularização. Quadrados de 5 mm² indicam a extremidade de vasos que foram analisados (A). Área selecionada equalizada em maior aumento para análise de neovascularização (A₁). Aplicação do filtro analítico pelo programa Image Pro Plus 4.5.1.29 (A₂).

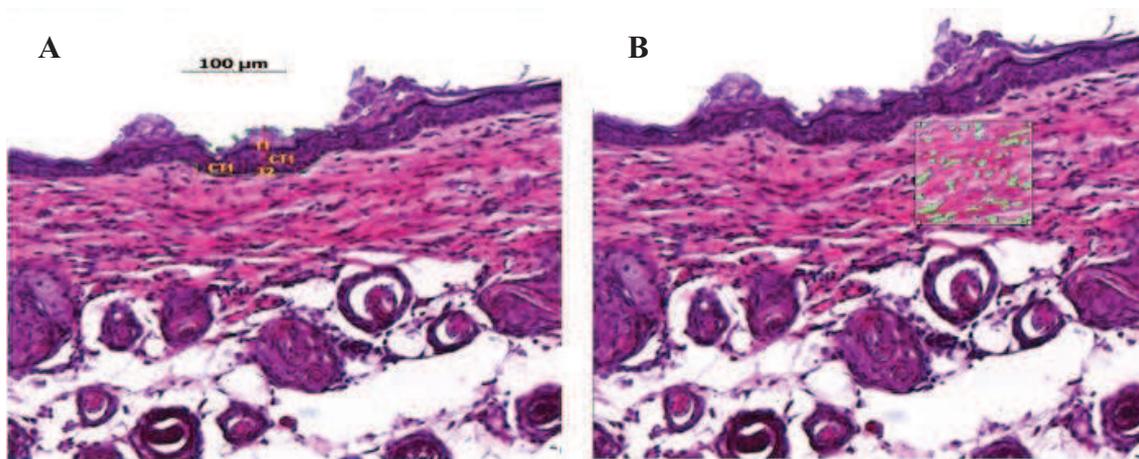


Figura 29: Corte histológico da pele de um animal *hairless* submetido à radiação (G4) com filtro analítico do programa Image Pro 4.5.1.29 para análise estatística da espessura da epiderme (A) e celularidade (B). CT1 e CT2 correspondem à espessura máxima e mínima encontradas entre os dois perfis e T1 e T2 seus respectivos limites. Os núcleos de células segmentados em uma área-teste estão destacados na cor verde no quadro em evidência (B).

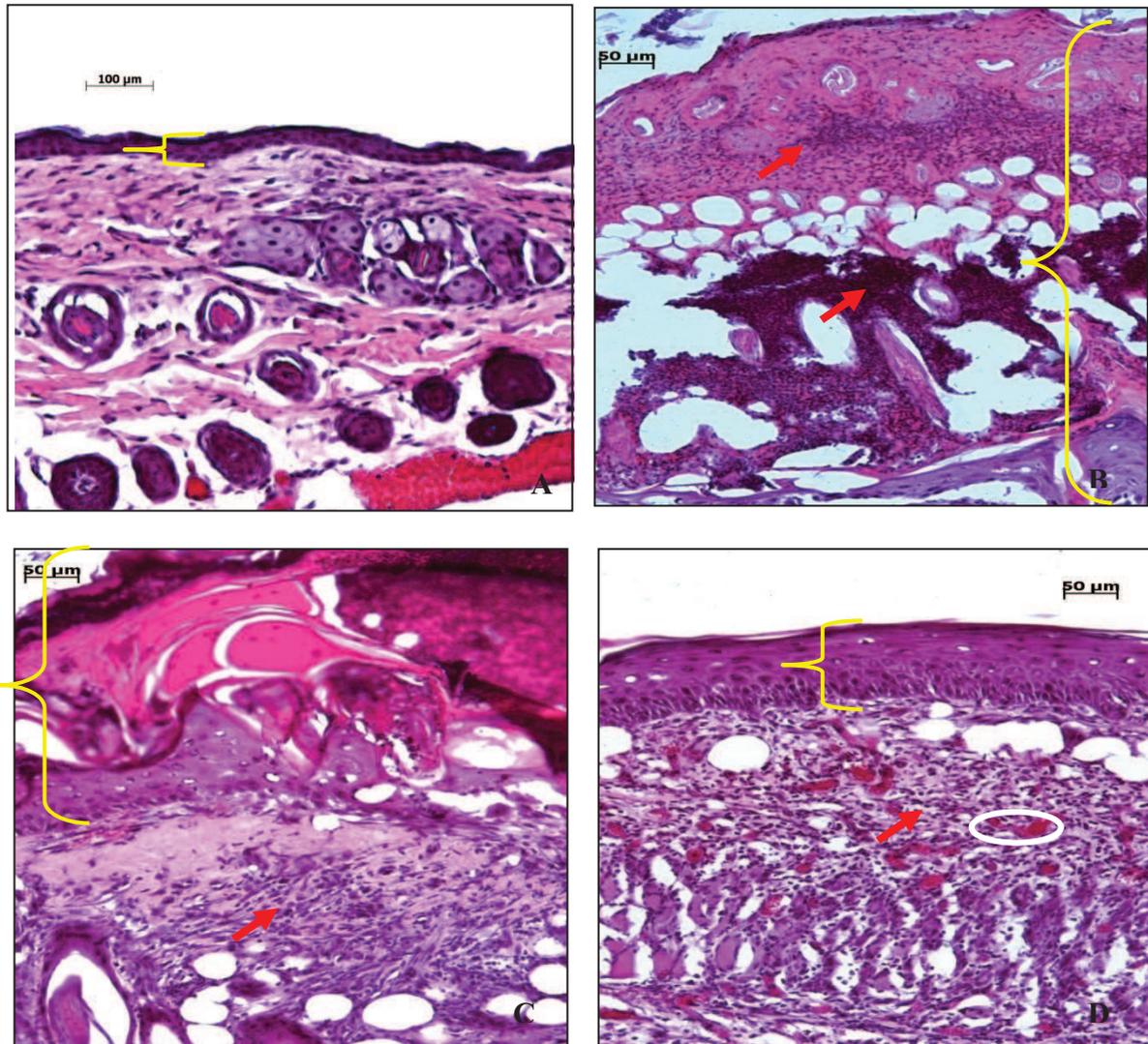


Figura 30: Fotomicrografia da pele de um camundongo *hairless* controle (não irradiado) (A). Fotomicrografia da pele de um camundongo *hairless* uma semana após ser submetido a 15 minutos de exposição ao simulador solar (B). Fotomicrografia da pele de um camundongo *hairless* uma semana após ser submetido a 30 minutos de exposição ao simulador solar (C). Fotomicrografia da pele de um camundongo *hairless* uma semana após ser submetido a 45 minutos de exposição ao simulador solar (D). O colchete delimita a espessura da epiderme, a seta aponta infiltrado celular e elipse hemorragia.

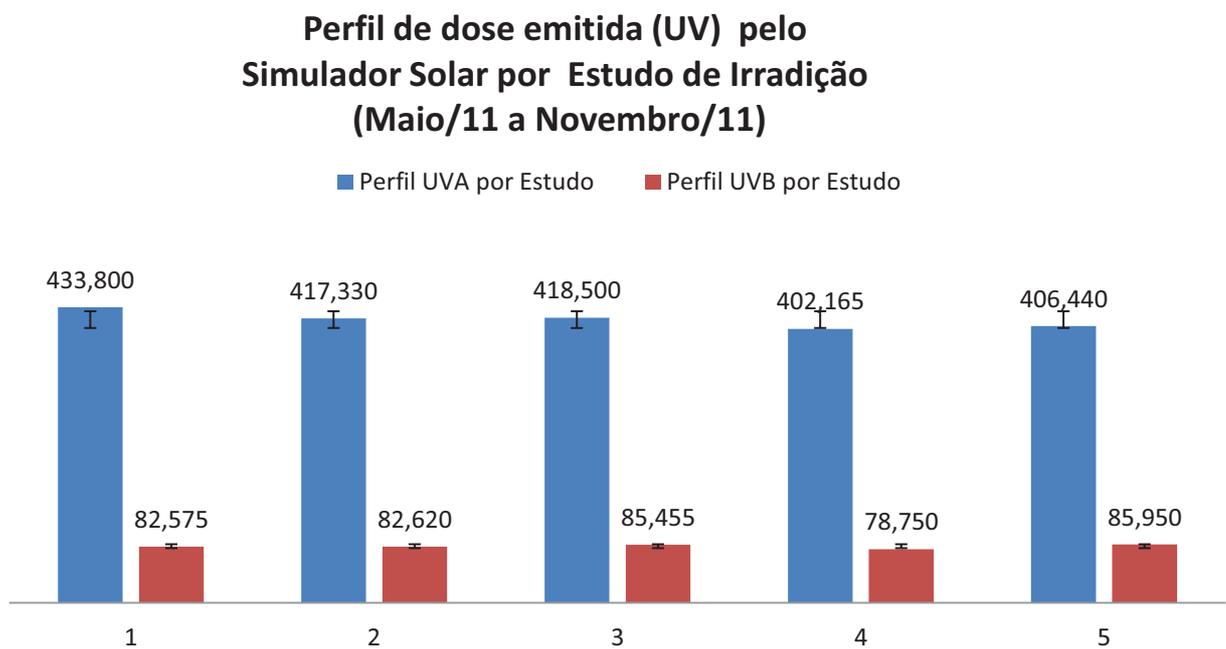


Figura31: Média de dose de UVA e UVB em kJ/m²/s por estudo conforme Anexo II.

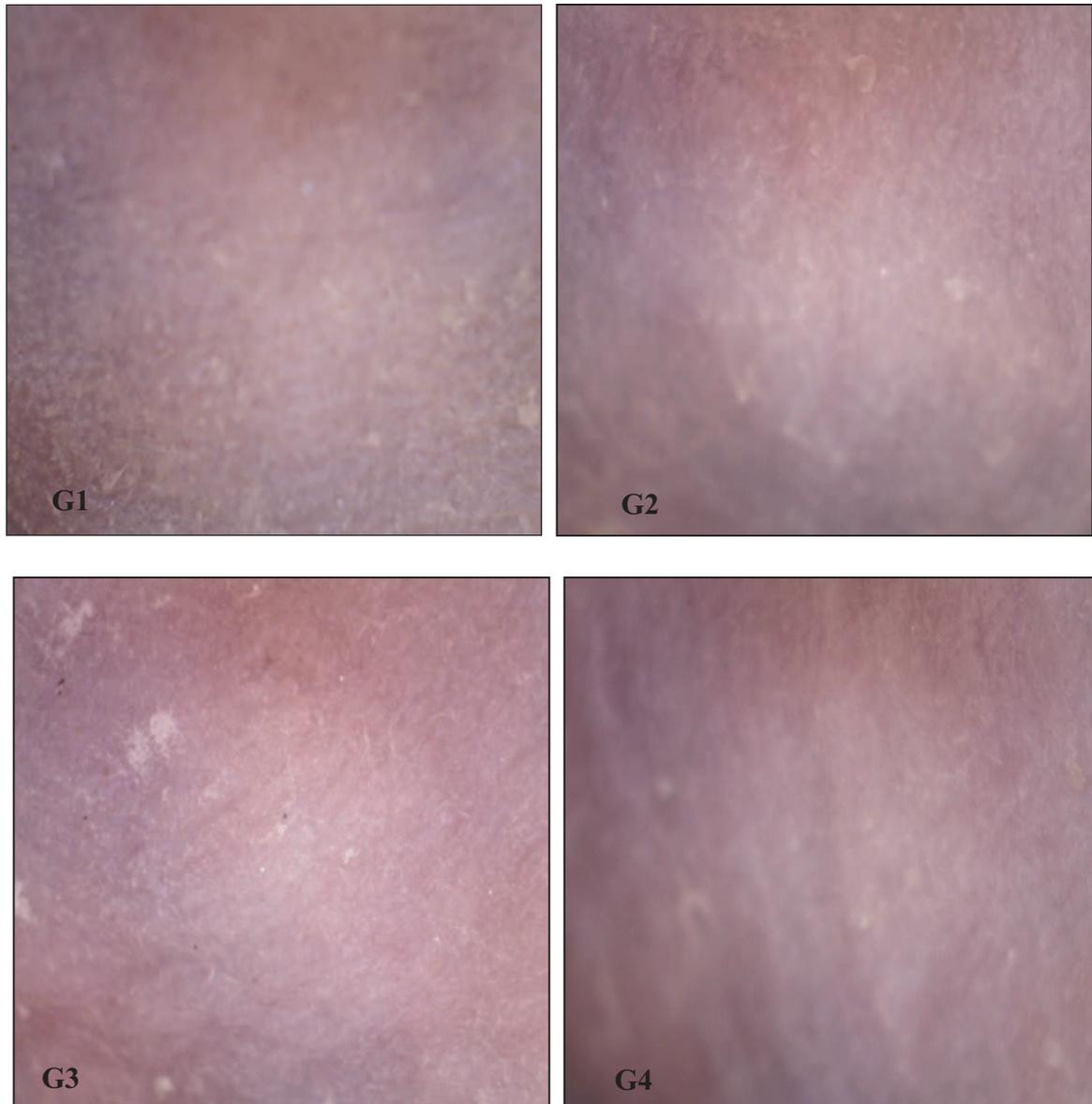


Figura 32: Fotomicrografias da superfície da pele de animais *hairless* obtidas com câmera dermatoscópica. Pele de um animal *hairless* não submetido à irradiação (G1). Animal submetido à irradiação e não fotoprotegido (G2). Animal fotoprotegido (G3). Animal coberto por formulação sem moléculas fotoprotetoras (G4). Aumento 230 vezes.

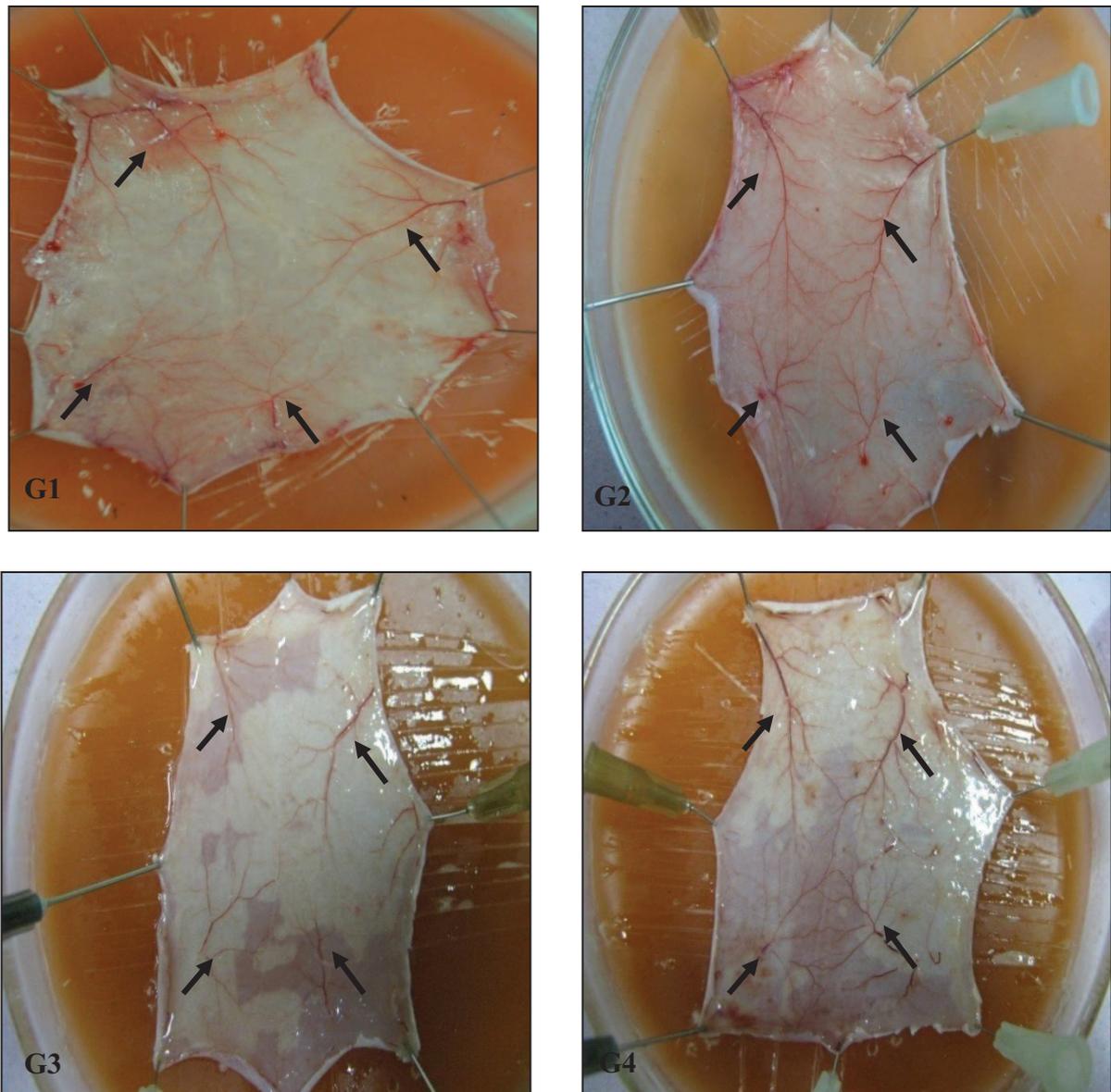


Figura 33: Biópsia da pele de um camundongo *hairless* não submetido à radiação proveniente do simulador solar (G1). Animal submetido à radiação não fotoprotegido (G2). Animal fotoprotegido (G3). Animal coberto por formulação com veículo sem moléculas fotoprotetoras (G4) Setas indicam perfil de vascularização da derme.

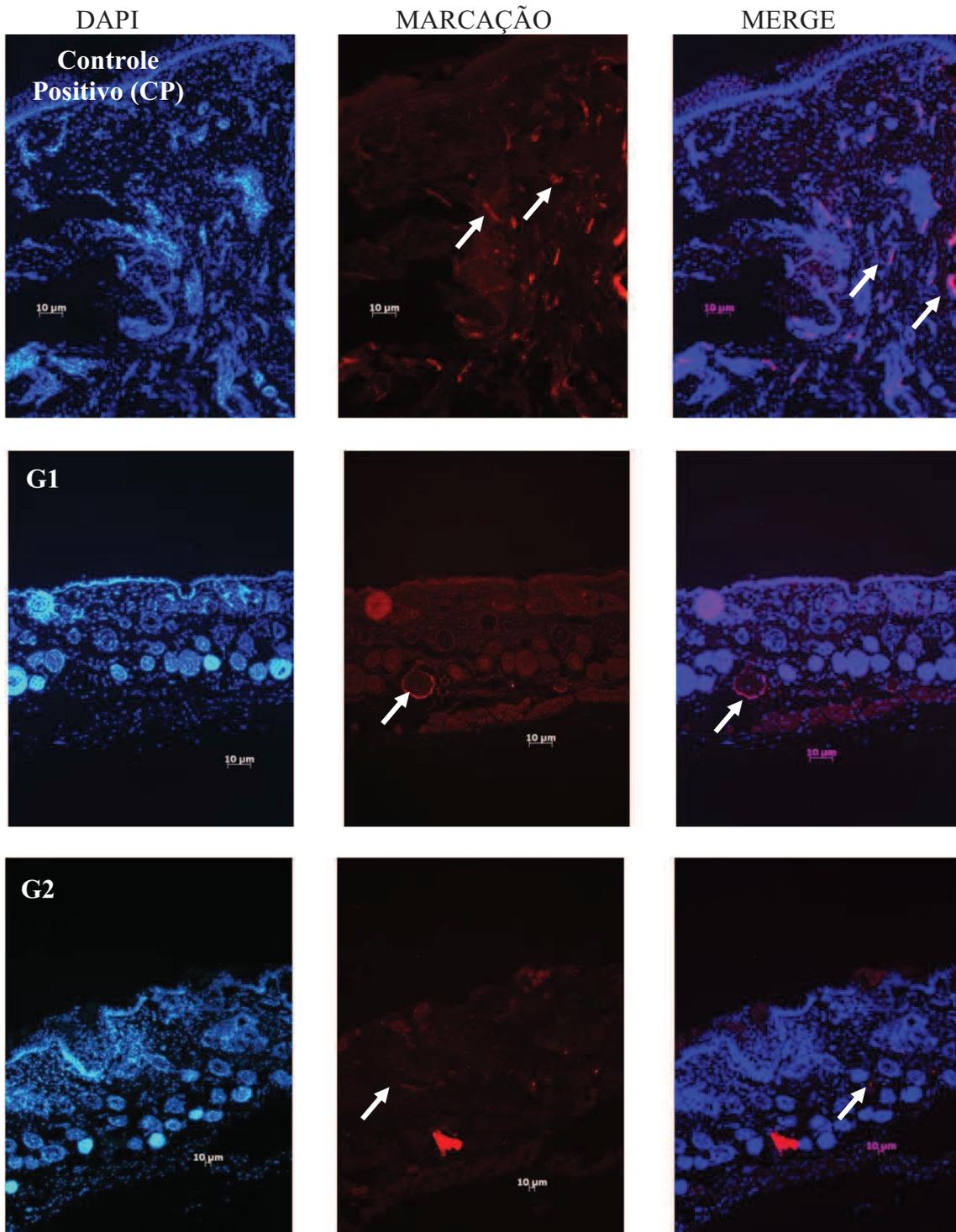


Figura 34: Fotomicrografia de fluorescência para o fator de Von Willebrand. Tumor de pele humano (controle positivo(CP)). Pele de animal *hairless* não submetido à radiação (G1). Animal não forotprotegido (G2).

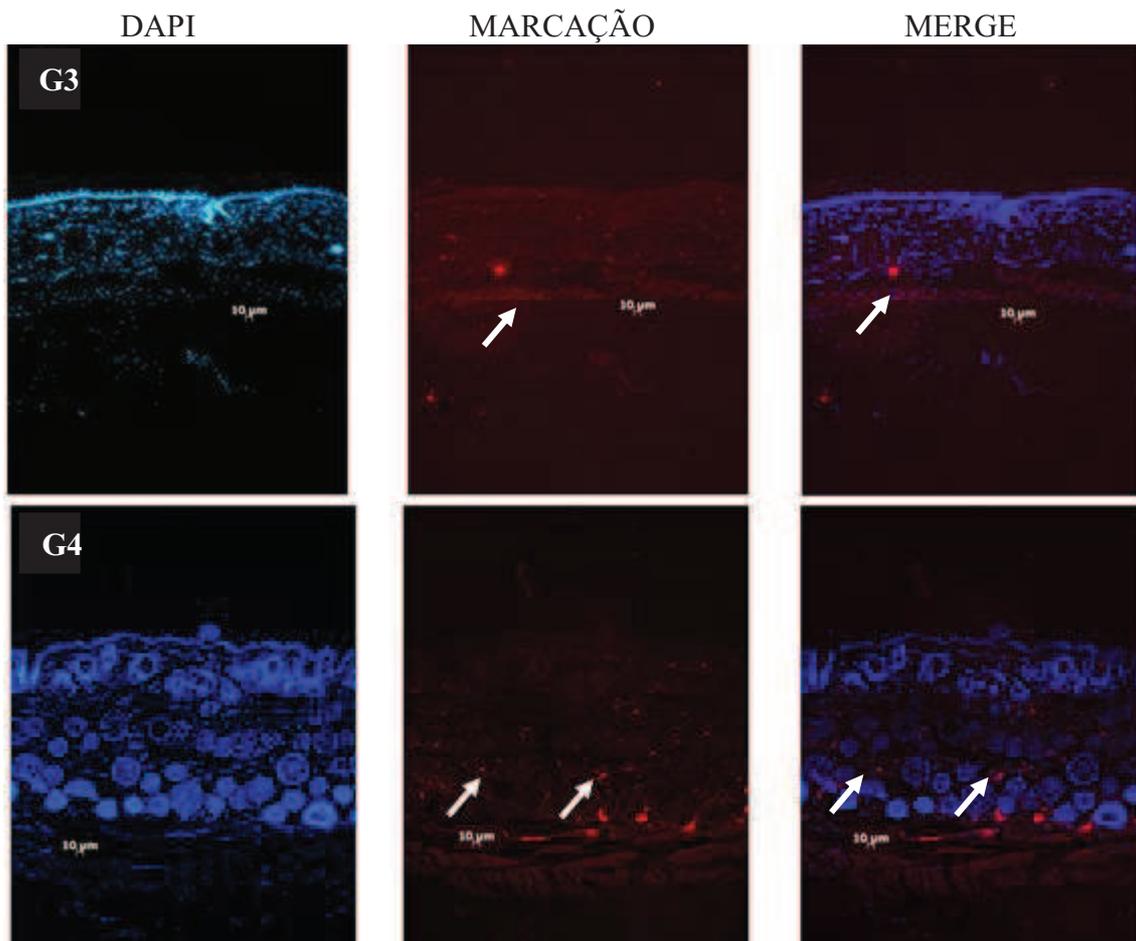


Figura 34: Fotomicrografia de fluorescência para o fator de Von Willebrand Animal fotoprotegido (G3). Animal coberto com formulação sem moléculas fotoprotetoras (G4). Setas indicam marcação.

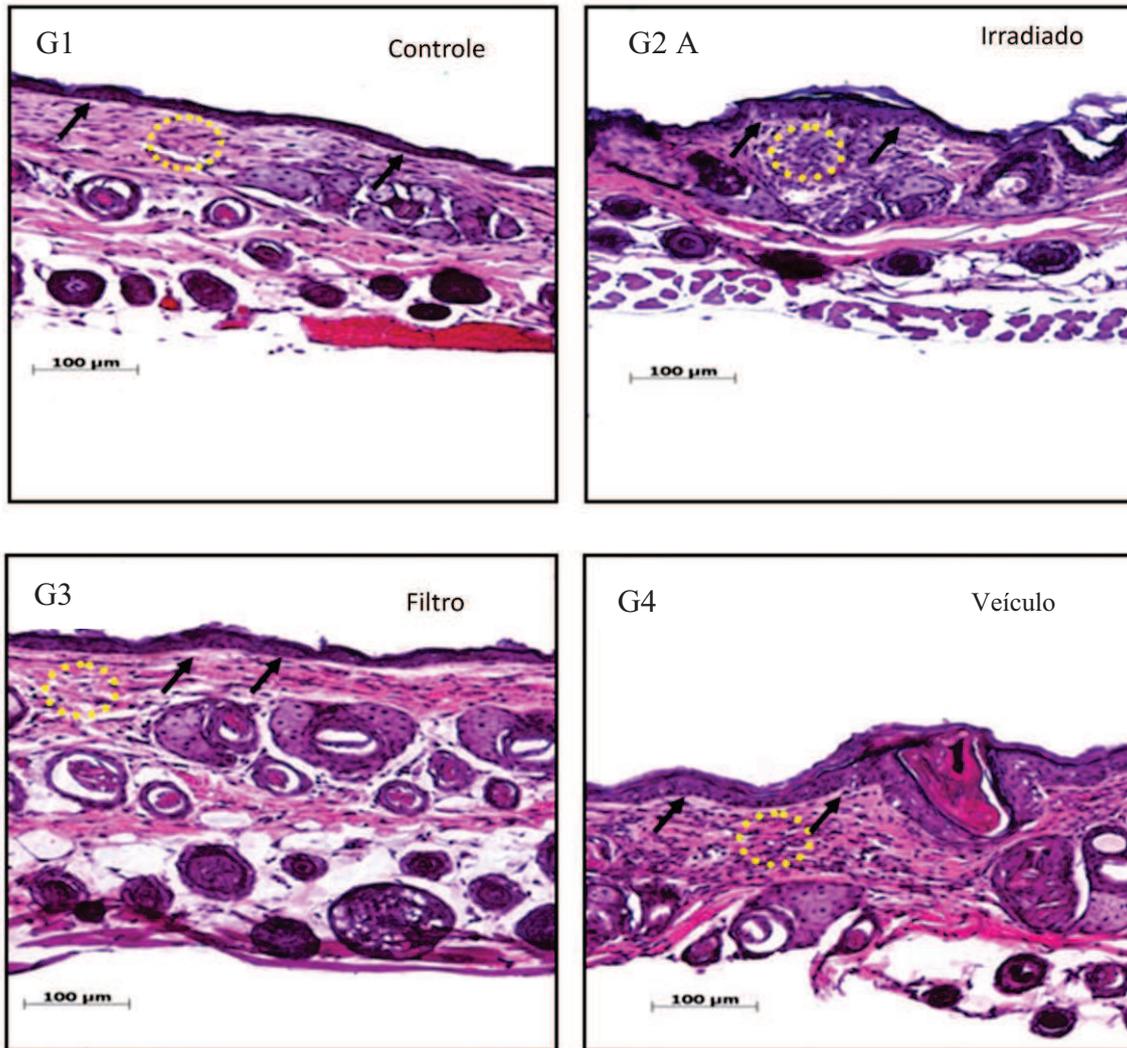


Figura 35: Fotomicrografia da pele de um camundongo *hairless* controle (G1). Animal sem fotoproteção (G2A). Animal coberto por formulação fotoprotetora (G3). Animal coberto por formulação sem moléculas fotoprotetoras (G4). Epiderme (setas); infiltrado inflamatório celular na região da derme (círculo pontilhado).

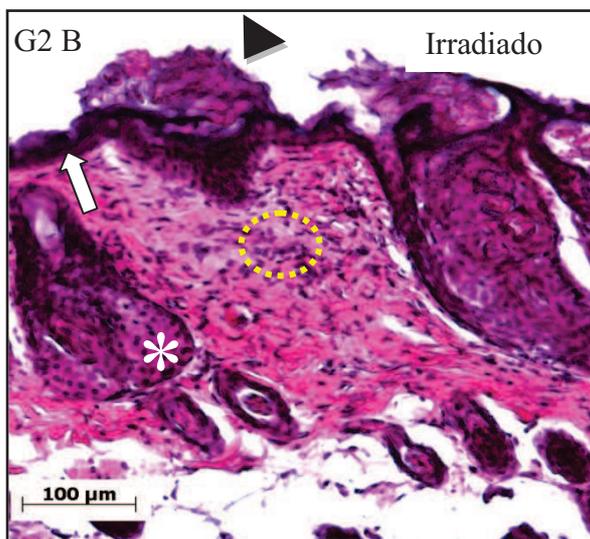


Figura 35: Fotomicrografia da pele de camundongo *hairless* irradiado sem fotoproteção (G2B). Epiderme (seta); tampão folicular (cabeça de seta); infiltrado celular na região da derme (círculo pontilhado) e hiperplasia da glândula sebácea (*).

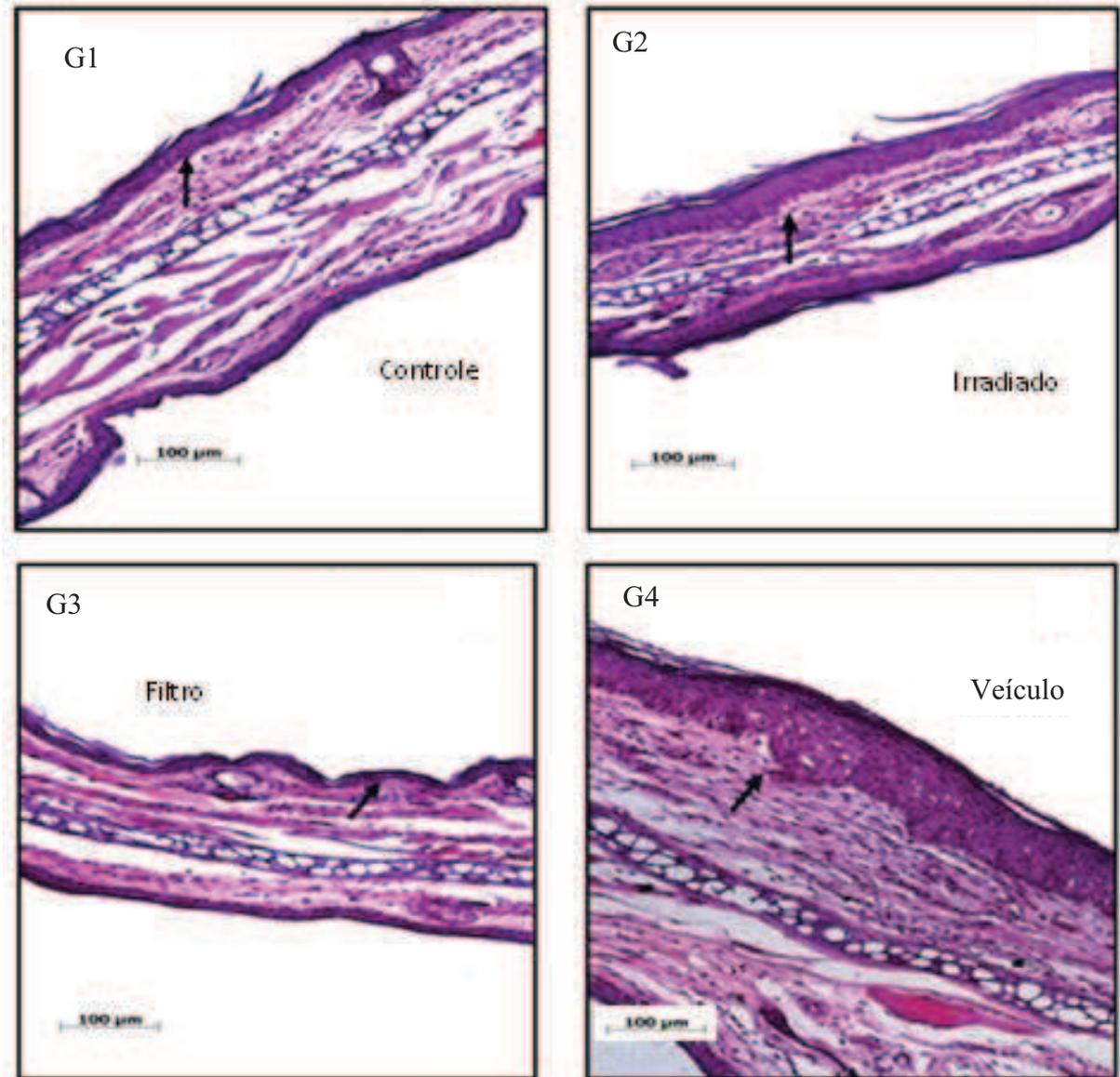


Figura 36: Fotomicrografia da pele da orelha de um camundongo *hairless* controle (G1). Animal irradiado sem fotoproteção (G2). Animal fotoprotetido (G3). Animal coberto por formulação sem moléculas fotoprotetoras (G4). Epiderme (setas).

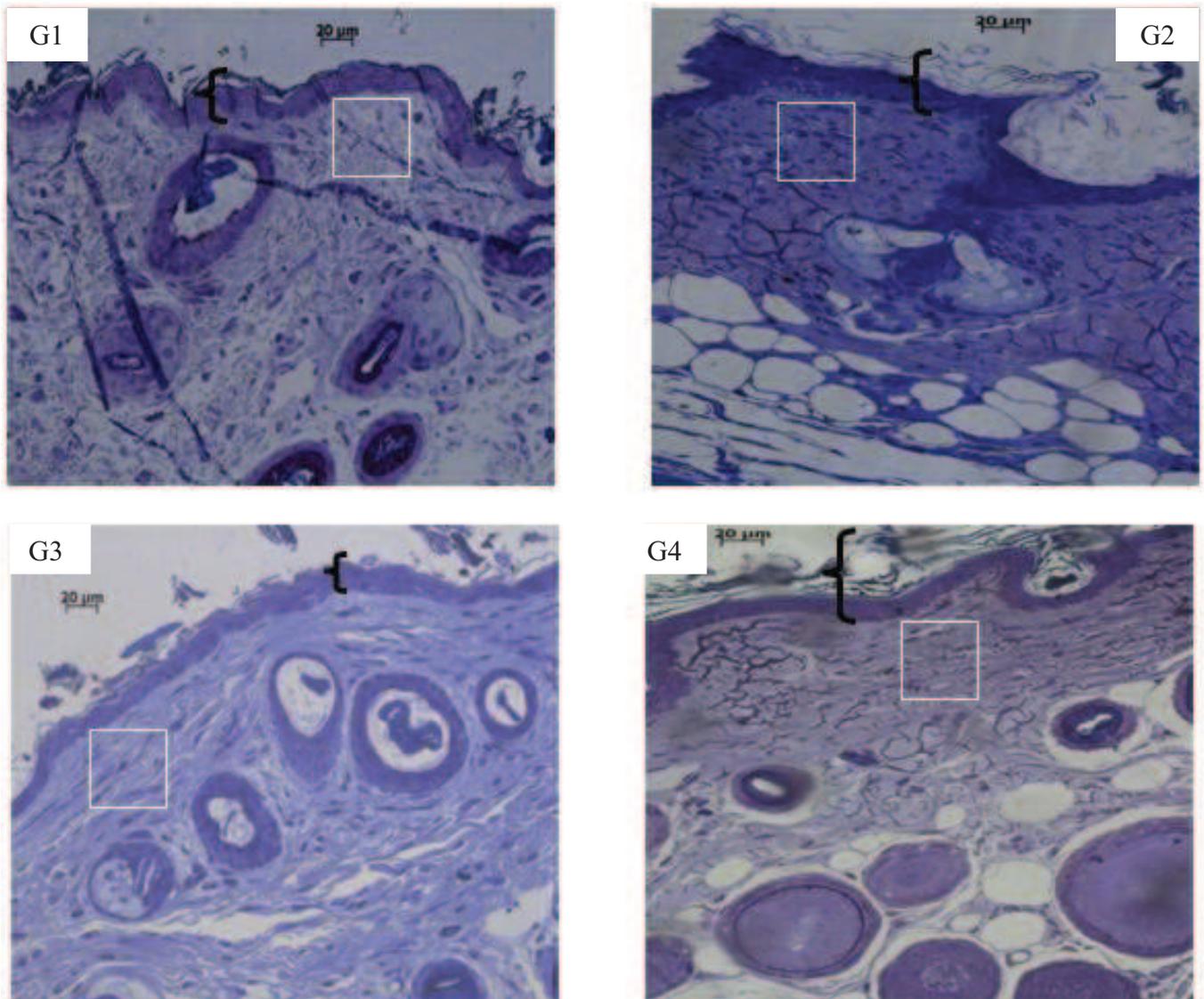


Figura: 37 Fotomicrografias de cortes semifinos da pele de um camundongo *hairless* corados com azul de toluidina. Animal controle (G1). Animal não fotoprotegido (G2). Animal fotoprotegido (G3). Animal coberto com formulação sem moléculas fotoprotetoras (G4) Epiderme (colchete); população celular (quadrado).

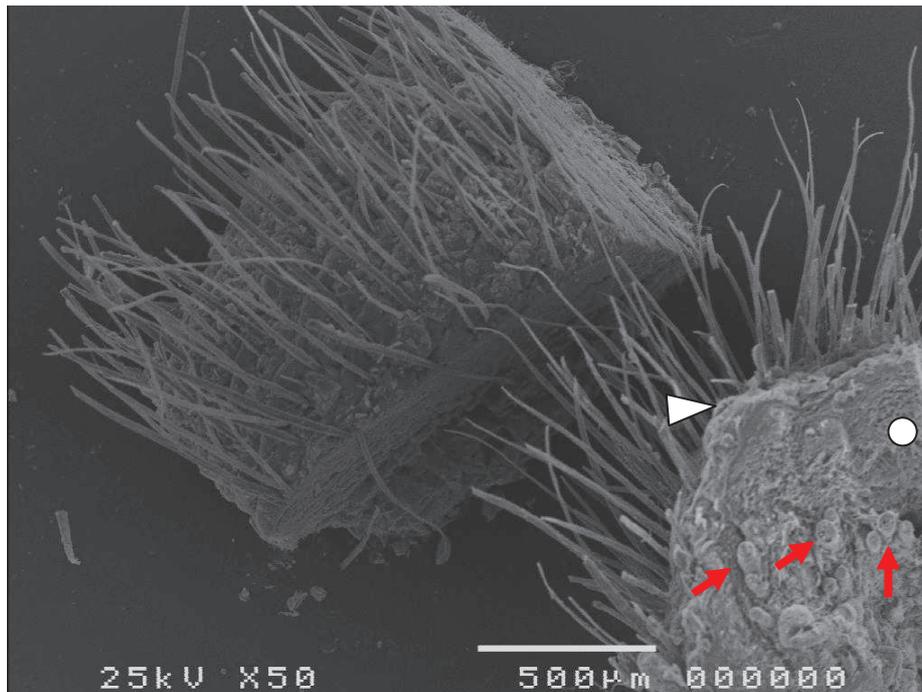


Figura 38: Eletromicrografia de varredura de dois fragmentos de pele de um camundongo *hairless* controle em duas perspectivas. Vista superior da superfície epidérmica demonstrando pelos vestigiais e extenso enrugamento. Vista lateral evidenciando espessura da epiderme (cabeça de seta) e da derme (círculo) e fibras da matriz dérmica em corte transversal (setas).

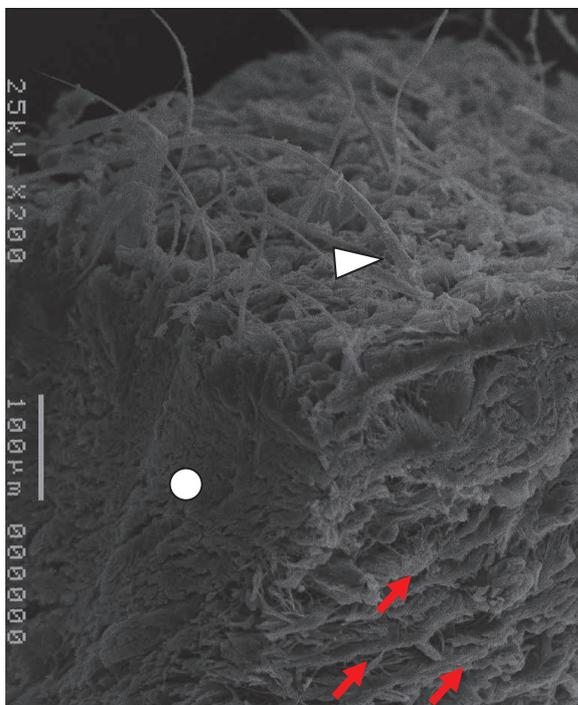


Figura 39: Eletromicrografia de varredura de um fragmento de pele de um camundongo *hairless* controle. Visão da pele evidenciando superfície epidérmica com pelos vestigiais (cabeça de seta) e derme (círculo) em duas faces com destaque para as fibras da matriz em corte longitudinal (setas).

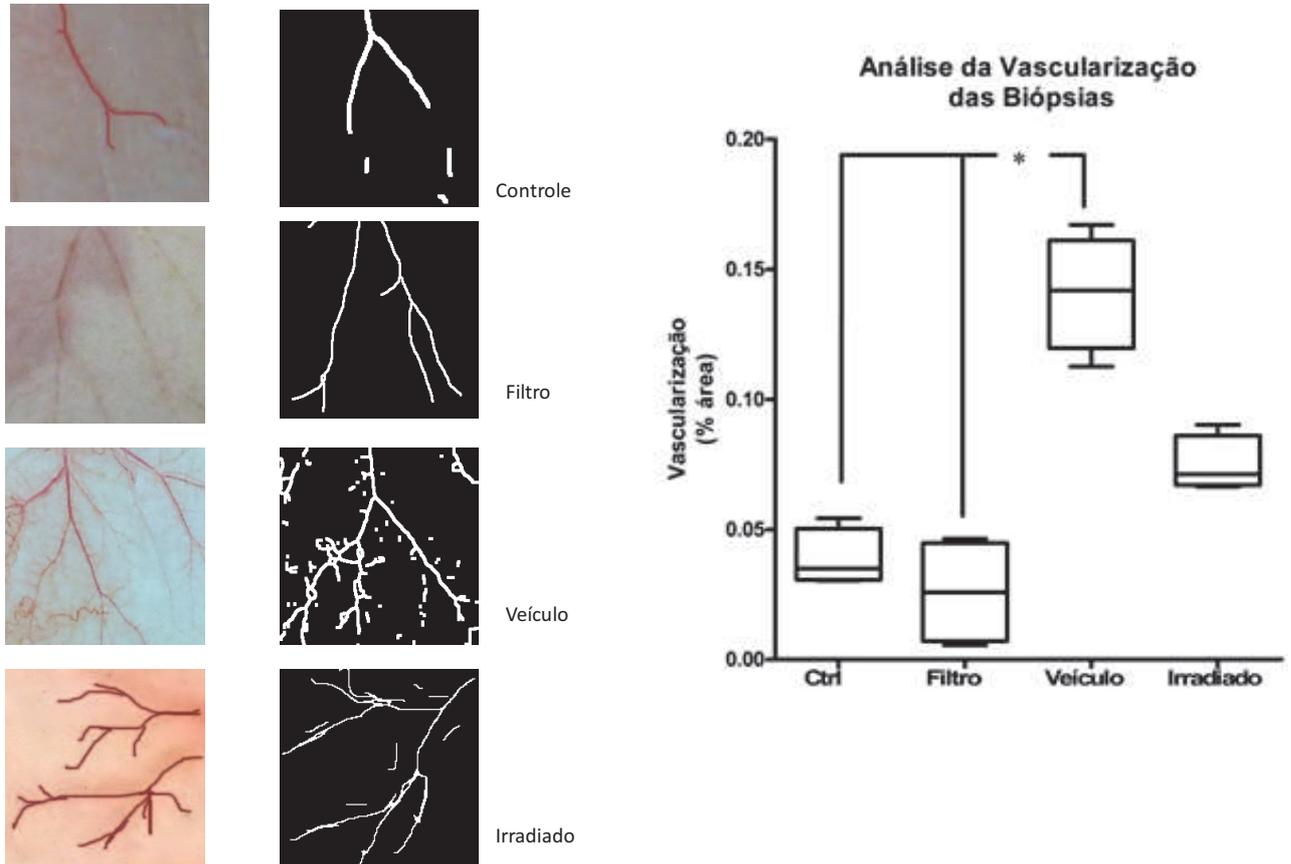


Figura 40: Distribuição estatística da análise de neovascularização da pele do dorso dos animais dos grupos estudados. Gráfico indicando análise da vascularização das biópsias.

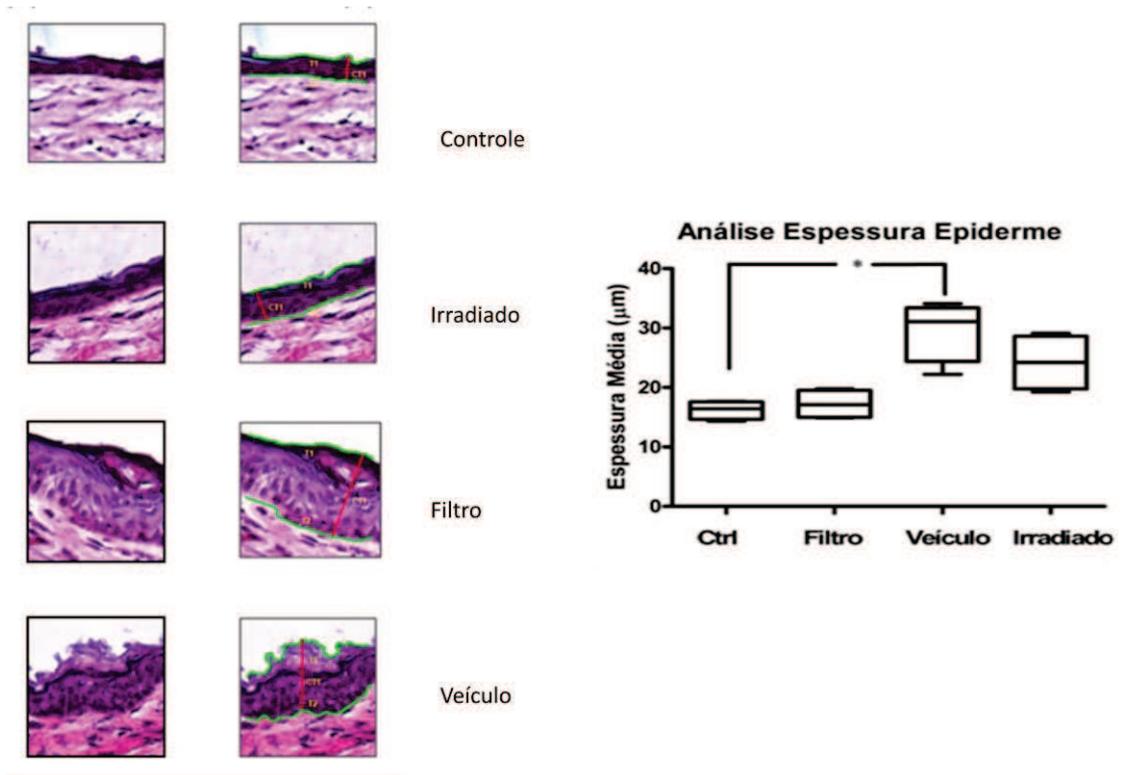


Figura 41: Distribuição estatística da análise da espessura da epiderme nos diferentes grupos estudados e seu respectivo gráfico.

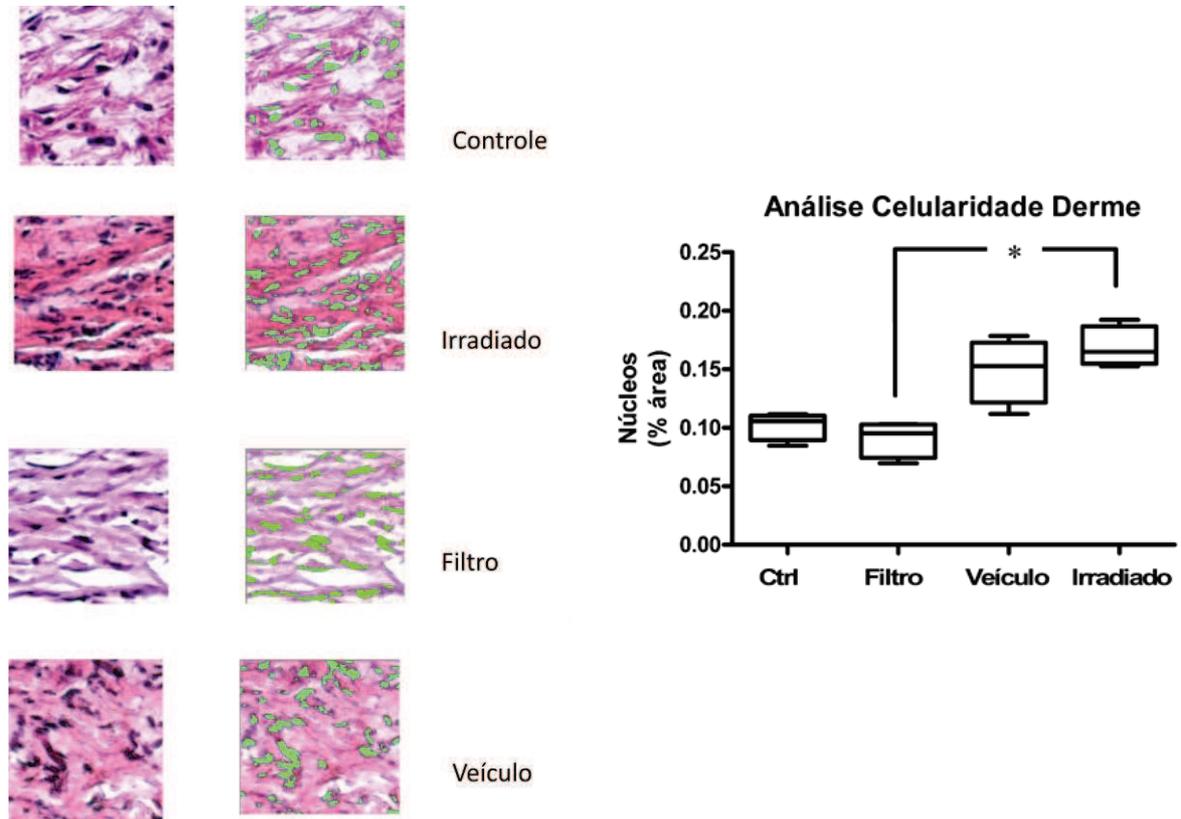


Figura 42: Distribuição estatística da análise de celularidade nos diferentes grupos estudados e seu respectivo gráfico.

7 - DISCUSSÃO

Mercado e Métodos Analíticos em Fotoproteção.

A indústria cosmética tem atingido patamares bilionários de faturamento nos últimos anos, tendo chegado em 2011 à cifra de 425.886,5 bilhões de dólares e taxa de crescimento de 9,8%. O Brasil está em terceiro lugar no *ranking* mundial de consumo de cosméticos, tendo atingido o patamar de 42.029,5 bilhões de dólares e apresentando a maior taxa de crescimento do mundo, de 18,9%. Estas *cifras* refletem a preocupação da população mundial com a vaidade, e a expectativa de vida crescente gera o sentimento de não aparentar a idade real (EUROMONITOR, 2011 e FARANGE *et. al.*, 2008).

Sabidamente os filtros solares são a ferramenta de primeira escolha para prevenção do envelhecimento extrínseco da pele. Com os olhares voltados para esse ponto, os órgãos sanitários mundiais tem se demonstrado mais rígidos quando ao registro e comercialização de sistemas fotoprotetores e de certa maneira, eles têm trabalhado harmonicamente em busca de metodologias que garantam ao consumidor transparência e fidelidade no que tange às alegações de uso destes sistemas (DIFFEY, 2009).

Desde sua criação, em 1962, pelo pesquisador australiano Franz Greite, o FPS é a forma mais popular e fácil de entender como um filtro solar pode auxiliar na proteção da pele através da observação do eritema imediato induzido pela UVB (PALM, & O'DONOGUE, 2007). O método de Franz passou a ser padrão ouro para rotulagem de sistemas fotoprotetores especialmente para as formulações cosméticas. Porém, por só estar relacionado à perspectiva dos efeitos dos raios eritematosos (UVB), o FPS negligenciou os efeitos dos demais comprimentos de onda do espectro solar, *i.e.*, UVA, IV e a luz visível (OSTERWALDER & HERZOG, 2009). Assim sendo, novas metodologias e moléculas que garantam a proteção da pele contra o espectro solar têm sido desenvolvidas por diferentes grupos de pesquisa (PALM, & O'DONOGUE, 2007).

As vias e mecanismos pelos quais o sol é capaz de induzir alterações na pele levando a seu envelhecimento acelerado são o norte para desenvolvimento de sistemas fotoprotetores eficazes. Entendendo-se as alterações induzidas e os alvos envolvidos neste processo podemos eleger então, entidades terapêuticas a serem utilizadas nos

diferentes estágios do envelhecimento solar e os filtros solares são opções terapêuticas seguras (RABE *et al.*, 2006).

Fonte Luminosa e Modelos (*in vivo* e *in vitro*)

Para mimetizar os efeitos biológicos da luz solar sobre a pele, diferentes grupos de pesquisa têm lançado mão da utilização de fontes artificiais de luz solar que, de certa forma, possam se aproximar dos efeitos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos de exposições ocupacionais às radiações solares (SVOBODOVÁ & VOSTÁLOVÁ, 2010).

Ao longo do tempo as pesquisas em fotoenvelhecimento lançaram mão de diversos modelos biológicos. Inicialmente, partiu-se em busca do entendimento e da interpretação dos achados clínicos de heliodermite em biópsias de pele humana de indivíduos que ocupacionalmente se expunham às radiações solares ao longo da vida. Em segundo momento, submeter à pele humana sadia a fontes de UV para se acompanhar cronologicamente a sucessão de eventos do fotoenvelhecimento, foi a metodologia científica adotada. Posteriormente, as experiências laboratoriais com ratos depilados permitiram à comunidade científica uma ferramenta de fácil acesso e manejo para estudo dos efeitos deletérios das radiações solares (BENAVIDES, 2009, KILGMAN, 1996, MONTAGNA, 1954).

Com o surgimento do modelo camundongo *hairless* houve uma revolução neste segmento de pesquisa. A comunidade científica teve acesso a uma pele totalmente permissiva à exposição solar tendo em vista a eliminação dos pelos interferentes. Mesmo com a adoção de diferentes modelos biológicos *in vivo*, os principais achados clínicos, histológicos e bioquímicos têm se demonstrado similares ao longo das pesquisas, com pequenas variações em sua intensidade e frequência de ocorrência (BENAVIDES, 2009, KILGMAN, 1996, MONTAGNA, 1954).

As fontes artificiais de energia solar exploradas conduziram as pesquisas em fotoenvelhecimento ao entendimento das bases de seus efeitos biológicos. O estudo dos efeitos de comprimentos de onda isolados demonstrou, em sua grande maioria, efeitos histopatológicos, bioquímicos e fisiológicos distintos. Já a utilização de comprimentos de onda como, por exemplo, UVA e UVB conjuntamente e a luz solar simulada revelou efeitos mais proeminentes ou até mesmo outros efeitos inéditos (SVOBODOVÁ & VOSTÁLOVÁ, 2010).

Os ensaios de avaliação de sistemas fotoprotetores da atualidade estão relacionados ao FPS, metodologia intimamente ligada aos efeitos biológicos da UVB (queimadura /eritema) e do PPD/ FPA, que avalia aos efeitos da UVA (alterações pigmentares) sobre a pele. Esses ensaios permitem observações macroscópicas de efeitos agudos destes comprimentos de onda e perspectivas de vias de atuação e possíveis efeitos finais histológicos e fisiológicos (OSTERWALDER & HERZOG, 2009).

A perspectiva de se ter uma metodologia mais abrangente e detalhada para a observação e o entendimento dos efeitos morfológicos, bioquímicos, enzimáticos e clínicos da luz solar sobre a pele, contemplando todo seu espectro, passa a ser necessária tendo em vista a complexidade de interações deletérias daquela (DIFFEY, 2009). Ter em mão um ensaio capaz de prever os estágios iniciais, as vias e alvos atingidos pelas radiações solares são de fundamental importância para se conseguir produtos de natureza cosmética, medicamentosa ou alimentícia eficazes para este propósito (GONZÁLEZ *et al.*, 2008). Extratos vegetais, substâncias alimentícias e moléculas sintéticas têm sido amplamente testadas em modelo *hairless*, cultura de células e explantes de pele humana, como ensaios pré-clínicos, para que futuramente tais substâncias possam ser comercializadas (GONZÁLEZ *et al.*, 2008, MORGANTI, 2009 e GILCHEREST, 1996).

DME

O nosso estudo percorreu o caminho do desenvolvimento de um método de exposição à LSS proveniente do simulador New Port Oreiel modelo 69920, com o objetivo de mimetizar uma exposição solar ambiental ao meio dia de dia de verão na cidade do Rio de Janeiro e a partir destas condições, reproduzir experimentalmente o fotoenvelhecimento da pele em modelo *hairless* de cepa HRS/J – UFRJ que possui padrão morfológico de pele consonante com os de outras cepas utilizadas para o mesmo propósito (BENAVIDES *et al.*, 2008, KLIGMAN, 1996, MOTAGNA *et al.*, 1954). O modelo *hairless* por não apresentar pelos característicos permite uma superfície de exposição à radiação maior possibilitando assim fácil acesso a interpretação e respostas biológicas produzidas por nosso ensaio.

Poucos estudos de envelhecimento da pele que utilizam camundongos *hairless* como modelo biológico lançam mão da LSS. Inicialmente as pesquisas em fotoenvelhecimento que utilizaram esse modelo estavam mais concentradas em entender

os efeitos dos comprimentos de onda da radiação solar individualmente (MOON, YOUM & KIM, 2000; BERG *et al.*, 1993; LECHER *et al.*, 2008 e LECHER *et al.*, 2009). Assim sendo, através da utilização da LSS pode-se ter, de fato, um ensaio mais aproximado da exposição ocupacional ao sol, tendo em vista que esta possui todos os comprimentos de onda do espectro solar, e o camundongo *hairless* nos permitiu o uso de um modelo com a pele totalmente exposta.

Um desafio do nosso estudo foi determinar o tempo e o número de exposições que pudessem deixar o camundongo *hairless* sob o simulador solar e que representasse uma exposição ambiental à UV. A literatura (KLIGMAN, 1996 e Anexo I) apontou para as DME, porém tendo em vista a tonalidade rosada do animal, não conseguimos observar com exatidão o momento em que o animal apresentava tal efeito. Assim, partimos para o ensaio de queimadura experimental e conseguimos observar, através de uma curva dose-resposta, a dose mínima necessária para se produzir uma queimadura solar no nosso modelo em evidência. O tempo de 15 minutos representou um terço (1/3) da dose necessária para se produzir uma queimadura no animal. Com este parâmetro determinado, o animal foi exposto uma vez ao dia durante cinco dias à LSS. Em nosso estudo buscamos não imobilizar os animais, pois a imobilização não refletiria uma exposição ambiental, diferente do observado na literatura (FAURSCHOU *et al.*, 2007).

Formação de Rugas

As alterações morfológicas observadas neste trabalho vão de encontro com os resultados encontrados na literatura (GILCHEREST *et al.*, 1981), porém com tempo de exposição à radiação solar menor. As análises dermatoscópicas realizadas pelo nosso grupo não apontaram o surgimento de rugas superficiais na pele dos animais dos grupos G2 e G4. Este fato pode estar atrelado ao tempo e número de exposições dos animais à LSS. Diferentes grupos de pesquisa que conseguiram evidenciar esta alteração macroscópica necessitaram de cinco a dez semanas de exposições à UV para produzirem rugas na pele do dorso de camundongos *hairless* (KAWADA, OHTANI & ISHII, 2010 e KAMBAYASHI *et al.*, 2001).

Vascularização

Após a exposição dos nossos animais à LSS os grupos G2 e G4 apresentaram aumento do padrão de árvore vascular com formação de neovasos a partir de ramos

principais da pele do dorso. Ao longo do desenvolvimento e maturidade normais, o camundongo *hairless*, não apresentam alterações de microvascularização. Segundo Vollmar *et al.* (2000) há ausência de formação de neo-vasos durante o envelhecimento dos animais e as alterações morfológicas evidenciadas por este grupo perfazem aumento do diâmetro de arteríolas e vênulas na 36^a semana de vida e redução da densidade capilar em 40 %, com conseqüente diminuição da perfusão sanguínea local na 78^a semana de vida.

Vollmar *et al.* (2000) evidenciaram que o padrão de alteração da rede vascular dos camundongos *hairless* estudado está em consonância com as alterações da rede vascular tegumentar em humanos. Durante seu envelhecimento intrínseco, a pele humana passa por uma redução da expressão de VEGF e conseqüente diminuição da vascularização. A exposição aguda à radiação UV, em especial UVB, leva a um aumento da expressão do VEGF e fator Von Willebrand (CHUNG & EUN, 2007, GIACOMONI & D’ALESSIO, 1996).

A exposição da pele do dorso de camundongos *hairless* à UVB foi também objeto de estudo de Kawada, Ohtani & Ishii (2010). Após um período de cinco semanas de exposição da pele destes animais àquela fonte luminosa pode-se observar por análises macroscópicas e moleculares, o aumento da neovascularização da pele dos mesmos. Yano *et al.* (2005) foram os responsáveis por um estudo do aumento de alterações vasculares em voluntários de pele saudável expostos à UVB. Esses pesquisadores conseguiram evidenciar também, em consonância com os resultados experimentais em modelos animais, pronunciada angiogênese na pele destes voluntários.

Hiperplasia da Epiderme, Celularidade, Queratose folicular e Hiperplasia da Glândula Sebácea

Continuando as observações das alterações morfológicas características de uma pele fotoenvelhecida, estas foram marcadamente observadas ao longo dos nossos estudos nos grupos G2 e G4 quando de sua exposição aguda à LSS sem nenhuma ferramenta fotoprotetora resultando em espessamento da epiderme, aumento do plexo vascular e da celularidade dérmica. Estes resultados também foram mostrados em pesquisas de fotoenvelhecimento de diferentes grupos: Comparando os achados de Gilcherest *et al.* (1981) com os nossos resultados no que tange o grupo irradiado não

fotoprottegido (G2), observamos proliferação celular, espessamento da epiderme, hiperplasia da glândula sebácea, queratose folicular.

Gilcherest *et al.* (1981) pesquisaram, com auxílio de uma lâmpada de mercúrio com 80% de emissão de UVB e uma dose três vezes maior que a eritematosa mínima, o aspecto morfológico e molecular da pele de voluntários sadios por trás da visualização do eritema. As análises morfológicas evidenciadas pelo grupo de Gilcherest mostraram queratinócios danificados com perfil disqueratótico (queratinócitos de citoplasma eosinofílico e núcleo picnótico) e vacuolizados, classicamente conhecidos como *sunburn cells*, e desaparecimento das células de Langerhans. Na derme, após 30 minutos de exposição à UVB, houve o aumento na dimensão das células endoteliais, com pico em 24 horas. Estes achados morfológicos persistiram até 72 horas após a exposição. Também foi observada, a degranulação dos mastócitos associada ao edema perivascular, sendo a histamina e a prostaglandina os marcadores bioquímicos em maior concentração. Ainda, foi observado infiltrado linfocitário após 24 horas de exposição da pele à radiação persistindo até 72 horas nas biópsias, com concentração maior das células na derme papilar.

Resolvemos observar também o perfil de alterações morfológicas na pele das orelhas dos diferentes grupos pesquisados (G1, G2, G3 e G4), foram confirmadas as seguintes alterações: hiperplasia da epiderme e o aumento da celularidade dérmica dos grupos G2 e G4 acompanhando ou padrão morfológico de alterações ocorridas na pele do dorso. O grupo de Bielenberg *et al.*, (1998) observou as mesmas alterações morfológicas nas orelhas de camundongos C3H/HeN (MTV-) após uma única exposição à UVB. Ao longo de uma semana o grupo de Bielenberg observou o aumento do espessamento da epiderme, aumento da expressão de VEGF, de PCNA e aumento de células CD31 positivas. O grupo de Hirakawa *et al.* (2005) observou após dez semanas de exposição à radiação UVB o aumento de neovascularização e migração de células da pele do dorso e orelhas de camundongos *hairless*, das regiões estudadas.

Abordagens para prevenção e tratamento

A preocupação mundial com os danos causados à pele pela exposição solar tem gerado uma grande corrida em busca de sistemas que possam ser eficazes em prevenir e tratá-los. Extratos vegetais, substâncias alimentícias e moléculas sintéticas têm sido amplamente testadas em modelo *hairless*, cultura de células e explantes de pele

humana, como ensaios pré-clínicos, para que futuramente tais substâncias possam ser comercializadas (GONZÁLEZ *et al.*, 2011, MORGANTI, 2009 GILCHEREST, 1996). Dal Belo *et al.* (2011) avaliaram o potencial fotoprotetor de uma formulação contendo *Ginkgo biloba* e chá verde, utilizando a LSS em modelo *hairless*. Os parâmetros utilizados para a observação de fotoproteção deste grupo foram a formação de eritema e outras alterações morfológicas incluindo aumento de densidade celular. A formulação testada demonstrou-se eficaz na prevenção dos parâmetros avaliados.

Ropke *et al.*,(2004) avaliou o potencial fotoprotetor do extrato de raízes *Pothomophe umbellata* observando alterações morfológicas da UVB sobre a pele de camundongos *hairless*, como espessamento da epiderme, formação de rugas, parâmetros-chave evidenciados e inibidos quando do uso do extrato.

A cafeína demonstrou perfil fotoprotetor frente à UVB em modelo *hairless* por Koo *et al.* (2007). Esta substância diminui o número de queratinócitos apoptóticos, porém não demonstrou capacidade de reduzir a angiogênese.

O efeito fotoprotetor de filtros solares nas terminações nervosas livres da pele foi estudo por Rodriguez *et al.* (2009) em modelo *in vitro* de pele obtida de cirurgias plásticas. Os explantes foram expostos à UVA e UVB em grupos experimentais distintos (i.e., pele irradiada na ausência e presença da formulação fotoprotetora). Através desta metodologia o grupo de Rodriguez conseguiu evidenciar o efeito fotoprotetor da formulação solar teste em terminações nervosas livres.

O perfil fotoprotetor do licopeno foi alvo do estudo de Rizwan *et al.* (2010). A utilização na dieta desta substância por humanos que posteriormente foram expostos a uma lâmpada de UV com amplo espectro e pico de emissão de 311 nm aumentou a DEM nos voluntários devido ao caráter antioxidante do licopeno, que tem a propriedade de neutralizar radicais livres gerados e reduzir, assim, a expressão de metaloproteinases.

Sabidamente os de filtros solares são as ferramentas mais populares de proteção e prevenção da pele contra os danos decorrentes da exposição solar. (DIFFEY, 2009 e RABE *et al.*, 2006). Porém para indivíduos fotossensíveis apresentando erupção polimórfica à luz, lupos eritematoso discóide e queratose actínica crônica, o grupo de pesquisa de Azurdi *et al.* (1999) demonstrou que o uso de formulação solar comercial não confere boa fotoproteção a esses grupo. (AZURDIA *et al.*, 1999)

Ao FPS 30 é conferido alto fator de proteção solar (OSTERWALDER & HERZOG, 2009) e o uso de uma formulação com este fator estimado pode ser a ferramenta-chave para a validação da metodologia proposta em nosso trabalho. A

quantidade aplicada da formulação, 2mg/cm², antes de cada uma das exposições diárias dos animais dos grupos G3 à LSS estava em harmonia com o preconizado nos *guidelines* de ensaios de avaliação de eficácia e segurança de formulações fotoprotetoras exigidos pelos órgãos sanitários (OSTERWALDER & HERZOG, 2009).

A quantidade e a forma de aplicação dos filtros solares têm sido amplamente criticadas por grupos de pesquisa em fotoproteção e fotoenvelhecimento, bem como o tempo de espera entre a aplicação do mesmo e a exposição à luz solar. Estes grupos têm mostrado, através de estudos de utilização de formulação fotoprotetora, que a população em geral utiliza bem menos quantidade de filtro solar do que o mínimo recomendado. Muitas vezes os indivíduos, por esquecimento, acabam privando áreas como as orelhas, as mãos e pescoço da aplicação do filtro solar, áreas estas fotoexpostas rotineiramente (SCHERSCHUM & LIM, 2001, DIFFEY, 2001, DIFFEY, 2009, REICH *et al.*, 2009).

Em nosso estudo nos preocupamos em fazer a aplicação da quantidade preconizada da formulação e esperar o tempo mínimo de 15 minutos para melhor penetração dos filtros na pele dos animais antes de suas submissões à LSS, ponto preconizado pelos órgãos sanitários. Acreditamos que essas ações corroboram para os resultados obtidos no grupo G3, que apresentou comportamento similar ao grupo G1, apontando para a eficiência da formulação fotoprotetora em proteger a pele das alterações morfológicas.

O nosso estudo sobre os efeitos da formulação veículo (G4) utilizada para avaliar os efeitos desta demonstrou alterações morfológicas mais pronunciadas do que aqueles evidenciados no grupo G2. Pode-se observar superior aumento no espessamento da epiderme, na neovascularização e de celularidade dérmica. As alterações morfológicas na pele da orelha do grupo G4 também apresentaram alterações morfológicas mais proeminentes em relação aos demais grupos estudados. Assim sendo a formulação veículo demonstrou-se ser um sensibilizante frente à LSS.

Esses resultados nos fizeram pensar melhor na composição do veículo da formulação fotoprotetora e verificamos que um dos componentes, o metilparabeno, possui potencial sensibilizante. Os metilparebenos são utilizados como conservantes há mais de 50 anos em alimentos, medicamentos e cosméticos, tendo em vista seu amplo espectro de inibição do crescimento microbiano e sua segurança toxicológica (MOWAD, 2000).

Handa *et al.* (2006) avaliaram o potencial de indução de dano do metilparabeno *in vitro* em cultura de queratinócitos quando irradiada com UVB. O grupo de Handa

evidenciou em seus experimentos, aumento da morte celular, estresse oxidativo e peroxidação lipídica. As conclusões do estudo do grupo mencionado levantaram a questão de que o uso de metiparabenos associado à exposição solar pode não ser seguro. As alterações morfológicas exacerbadas do grupo G4 em relação ao potencial fotosensibilizante podem estar em forte consonância com os dados dos autores mencionados a cima.

Para confirmarmos as nossas avaliações das alterações morfológicas feitas em rotina para MO em nosso estudo lançamos mão de uma solução com maior poder de fixação, esta contendo paraformaldeído 4% em pH 7,4 e Glutaraldeído 2,5% 1:1. Com essa metodologia observamos em todos grupos estudados G1, G2, G3 e G4 o mesmo padrão de alterações morfológicas observados nas análises obtidas em material fixado em paraformaldeído 4% em pH 7,4.

Observamos em nosso modelo animal, através de MO de rotina a presença de folículos pilosos então, resolvemos avaliar através MEV a superfície da pele dos mesmos para a observação da superfície livre do pelo. Verificamos a presença de pelos vestigiais como descrito na literatura, observação esta que consideramos de extrema importância já que a presença destes (KANITAKIS, 2002, LEVER, 2009) contribui para a proteção da pele aos possíveis danos induzidos por agentes físicos e químicos e ao mesmo tempo a presença de células trocos nessas regiões proporcionam a esse sistema uma maior eficácia de reparação o que intensifica a nossa proposição em afirmar ser o camundongo *hairless* um modelo ideal de avaliação de perfil fotoprotetor.

É necessário enxergar outros efeitos, além dos macroscópicos, i.e, eritema e pigmentação, pois mesmo não se observando nenhuma alteração macroscópica concreta na superfície da pele dos animais-modelos pós-exposição à LSS e durante a semana antes do sacrifício, nosso grupo de pesquisa pode evidenciar alterações morfológicas e moleculares.

A diversidade de eventos decorrentes do fotoenvelhecimento tem sido, ao longo dos anos, maciçamente estudada nos mais diferentes modelos, incluindo o próprio homem (GIACOMONI & D'AILESSIO, 1996 e GILCHEREST *et. al.*, 1981). A construção de um ensaio experimental que avalie alterações morfológicas e moleculares para o estudo do desenvolvimento de sistemas fotoprotetores, antioxidantes e de tratamento do fotoenvelhecimento deve ser buscado para que possamos utilizar seguramente os produtos disponíveis no mercado. A metodologia proposta por nosso grupo passa a ter grandes perspectivas para o mercado cosmético, indústrias

desenvolvedoras de novas tecnologias antienvhecimento e para a clínica dermatológica.

8 - CONCLUSÃO

- ✓ O método foi validado para avaliar o potencial fotoprotetor da formulação em estudo.
- ✓ O filtro solar contendo as moléculas fotoprotetoras: benzofenona – 3 e octocrileno e octilmetoxinamato foi eficaz na prevenção do fotodano da pele.
- ✓ O veículo (gel-creme) utilizado para incorporação das moléculas fotoprotetoras pode ser um possível sensibilizante quando submetido à LSS.
- ✓ As alterações morfológicas descritas neste estudo agudo (neovascularização, hiperplasia da epiderme e aumento de densidade celular) corroboraram com os dados da literatura por outras metodologias aplicadas (i.e uso de lâmpadas separadamente ou conjuntas e imobilização de animais).
- ✓ O metodologia proposta foi eficaz para avaliação do filtro solar avaliado neste estudo.

9 - PERSPECTIVAS

- ✓ Analisar através de imunohistoquímica o padrão de expressão das proteínas VEGF, P53 e MTPs (1 e 3) dos grupos G1, G2, G3 e G4.
- ✓ Irradiar animais cobertos por uma formulação de FPS 30 estimado contendo filtros solares físicos (Dióxido de Titânio e Óxido de Zinco).
- ✓ Analisar morfológicamente por técnica de rotina (H&E) e imunohistoquímica a pele dos animais cobertos por uma formulação de FPS 30 estimado contendo filtros solares físicos
- ✓ Realizar Análises Ultraestruturais na pele do modelo em estudo.

10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – ABIHPEC, disponível em: < <http://blog.euromonitor.com/articles> > Acessado em março de 2012

AZULAY, D.R & AZULAY R.D. **Dermatologia**, 3. ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro 910pp, 2004

AZURDIA, R. M. *et al.* **Sunscreen application by photosensitive patients is inadequate for protection.** British Journal of Dermatology, v. 140, p. 255 – 258, 1999

BAUMANN, L. & SAGHARI, S., **Basic science of the epidermis.** In: Comestic Dermatology: Principles and Practice, ed. 2, Mc. Graw Hill, cap. 1 e 2 p. 3-13, pp. 366 2009

BENAVIDES, F. *et al.* **The Hairless mouse in skin reseach.** Journal of Dermatological Science v.53, p. 10-18, 2009

BENEDETTO, A. V. DO. **The environment and skin aging,** Clinics in Dermatology, v. 16, p. 129-139, 1998

BENY, M. G. **Fisiologia da pele,** Cosmetics & Toiletries (Edição em Português), v. 12, p. 44-50, 2000

BERG, R. J. W.; GRUIJL, F. R.; VAN DER LEUN, J. C. **Interaction between ultraviolet A and ultraviolet B radiations in induction in hairless mice skin cancer.** Cancer Research, v. 53, p. 4212-4217, 1993

BIELELENBERG, D. R. *et al.* **Molecular regulation of UVB-induced cutaneous angiogenesis.** Journal of Investigative Dermatology, v. 111, p. 864-872, 1998

BURNETT, M. E.; WANG, S. Q. **Current sunscreen controversies: a critical review.** Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine, v. 27, p. 58-67, 2011

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. **The cornified envelope: a model of cell death in the skin.** Nature reviews molecular and cell biology, v. 6 p. 328-340, 2005

CARMELIET, P. **Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.** Nature Medicine, v. 6, p. 389-395, 2000

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. **Animais de laboratório: o camundongo.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.28, p. 11-23, 2007

CHUNG, J. H. & EUN, H. C. **Angiogenesis in skin aging and photoaging.** Journal of Dermatology, v. 34, p. 593-600, 2007

CHUNG, J. H. *et al.* **Differential effects of photoaging vs intrinsic aging on the vascularization of human skin.** Archives of Dermatology, v. 38, p.1437-1442, 2002

DAL BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. **Photoprotective Effects of Topical Formulations Containing a Combination of Ginkgo biloba and Green Tea Extracts.** Phytotherapy Research, v. 25, p. 1854-1860, 2011

DENDA, M.; FUZIWARA, S. **Visible Radiation affects epidermal permeability barrier recovery: selective effects of red and blue light.** The journal of investigative dermatology, v. 128, p. 1335 – 1336

DETMAR, M. **The role of VEGF and Thrombospondins in skin angiogenesis.** Journal of Dermatological Science, v. 24, p. 78-84, 2000

DETMAR, M.; BROWN, L. F.; SCHÖN M. P. **Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice.** Journal of Investigative Dermatology, v. 111, p. 1-6, 1998

Diário Oficial da União – DOU, 2012, ANVISA, 2012, nº 107, p. 83 disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e15afe804c58f17fb8f0f8dc39d59d3e/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+N%C2%BA+30,+de+1%C2%BA+de+Junho+de+2012.pdf?MOD=AJPERES> > Acessado em julho de 2012

DIFFEY, B. **Sunscreen: expectation and realization.** Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, v. 25, p. 233-236, 2009

DIFFEY, B. **When should sunscreen be reapplied?** Journal of American Academy of Dermatology v. 45, p. 882–885, 2001.

DOMYATI, E. L. *et al.* **Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin.** Experimental Dermatology, v. 5, p. 398-405, 2002

DUTHIE, M. S.; KIMBER, I.; NORVAL, M. **The effects of ultraviolet radiation on human immune system.** The British Journal of Dermatology, v. 140, p. 995-1009, 1999

Euromonitor International – EUROMONITOR, 2012, disponível em: < <http://blog.euromonitor.com/articles> > Acessado em março de 2012

EVERITT, A. V. **Food restriction, pituitary hormones and ageing.** Biogerontology 4, 47–50, 2003

FARAGE, M. A. *et al.* **Intrinsic and extrinsic factors in skin aging: a review, Internacional.** Journal of Cosmetic Science, v. 30, p. 87-95, 2008

FAURSCHOU, A. *et al.* **Squamous cell carcinoma induced by ultraviolet radiation originates from cells of the hair follicle in mice.** Experimental Dermatology, v. 16, P. 485-489, 2007

FERRARA, N.; GERBER, H-P.; LECOUTER, J. **The biology of VEGF and its receptors.** Nature Medicine, v. 9, p. 669-676, 2003

GIACOMONI, P.U. & D' ALESSIO, P. **Open questions in photobiology IV. Photoaging of the skin.** Journal of Photochem. and Photobiology B: Biology, v. 33, p. 267-272, 1996

GIACOMONI, P.U. **Aging of human skin.** In: Handbook of Models for Human Aging, ed. 1, Academic Press, cap. 82, p. 993-998., 2006

GIACOMONI, P.U. **Aging and cellular defence mechanisms.** In: Franceschi, C., Crepaldi, G., Cristofalo, V. (Eds.), Ageing and Defence Cellular Mechanism, New York Academy of Sciences, New York, pp. 1-3., 1992

GIACOMONI, P.U. *et al.* **Aging of human skin: review of a mechanistic model and first experimental data.** IUBMB-Life, v. 49, 259-263, 2000

GIACOMONI, P.U. & REIN, G. **A mechanistic model for the aging of human skin.** Micron, v.35, p. 179-184, 2004

GILCHEREST, A. B. **A influência do tipo de pele no fotoenvelhecimento.** Cosmetic & Toiletries (Edição em Português), v. 6, p. 22-24, 1994

GILCHEREST, B. A. **The human sunburn reaction: histologic and biochemical studies.** The Journal of American Academy Dermatology, v. 5, p. 411-422, 1981

GILCHEREST, B.A. **A review of skin ageing and its medical therapy.** British Journal of Dermatology, v.135, p.867-875, 1996

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. **The latest on skin photoprotection.** Clinics in Dermatology, v. 26, p. 614-626, 2008

HANDA, O. *et al.* **Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes.** Toxicology, v. 227, p. 62-72, 2006

HANSEN, J. *et al.* **Enciclopédia de absorvedores de UV para produtos com filtro solar.** Cosmetic & Toimetries (Edição em Português). v. 7 , p. 47-58, 1995

HART, P. H.; GORMAN, S.; JONES, J. J. F. **Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D?** Nature reviews immunology, v.11, p 584-597, 2011

HAWK, J. L. M.; MURPHY, G. M.; HOLDEN, G. A. **The presence of neutrophils in human cutaneous ultraviolet – B inflammation.** The British Journal of Dermatology, v. 118, p. 27-30, 1998

HIRAKAWA, S. **Vascular endothelial growth factor promoter sensitivity to ultraviolet - B induced cutaneous photodamage, Hemostasis.** Thrombosis and Vascular Biology, v. 105, p. 2392-2399, 2005

ICI – International Commission on Illumination, 2012. Disponível em: <<http://www.cie.co.at/>> Acesso em Maio de 2012

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, **Projeção Populacional do Brasil, 27/11/2008** disponível em: <www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1272> Acesso em maio de 2012

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos – CPTE – Brasil available at: <<http://bancodedados.cptec.inpe.br/tabelaestacoes/faces/estacoesprestado.jsp>> Acesso em 05/2011

JENNIFER, S. R.; GORDON, D. M. & BRIEVA, C. J., **Unilateral dermatoheliosis.** The New England Journal of Medicine, v. 16, p. 25, 2012

KAMBAYASHI, H. *et al.* **Epidermal Change cause by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse.** Journal of Dermatological Science, v. 1, p. 19-25, 2001

KATIYAR, S. Grape sees proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. **Molecular Nutrition & Food Research, v. 52, p. 71-76, 2008**

KAWADA, S.; OHTANI, MASARU.; ISHII, N. **Increased oxygen tension attenuates acute ultraviolet-B-induced skin angiogenesis and wrinkle formation.** American Journal of Physiology Regular Integrative and Comparative Physiology, v. 299, p. 694-701, 2010

KIM, D. W. *et al.* **Coenzyme Q effects on manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the hairless mouse skin induced by ultraviolet B irradiation.** Biofactors v. 30, p.139-147 2007

KLIGMAN, H. L. **The Hairless Mouse Model for Photoaging.** Clinics in Dermatology, v.14, p. 183-195, 1996

KNITATKIS, J. **Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.** European Journal of Dermatology, v. 12, p. 390-401, 2002

KOO, S.W. *et al.* **Protection from photodamage by topical application of caffeine after ultraviolet irradiation.** The British Journal of Dermatology, v. 156, p. 957-964, 2007

LECHER, C. M. *et al.* **Topical hydrocortisone, clobetasol propionate, and calcipotriol do not increase photocarcinogenesis induced by simulated solar irradiation in hairless mice.** *Experimental Dermatology*, v. 11, p. 973-979, 2010

LECHER, C. M. *et al.* **Topical pimecrolimus and tacrolimus do not accelerate photocarcinogenesis in hairless mice after UVA or simulated solar radiation.** *Experimental Dermatology*, v. 18, p. 246-251, 2009

LEITÃO, A. C. *et al.* **Radiobiologia e fotobiologia. Respostas celulares às lesões induzidas por agente físicos e químicos.** Apostila; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biosíntese Carlos Chagas Filho. 2005

LEVER, **Histopatologia da Pele.** ed. 10, Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, pp.1193, 2009

LIPPENS, S. *et al.* Cell death in the skin. *Apoptosis*, v.14, p. 549-569, 2009

MAHMOUD B. H.; HEXSEL C. L.; HAMZAVI I. H.; **Effects of visible light on the skin,** *Photochemistry and photobiology* v. 84, p. 450- 462, 2008

MASSIRIONI, S. M.G. *et al.* **Skin morphology of mutant hairless USP mouse** v. 38, p. 33-39, 2005

MONTAGNA, W.; CHASE, H. B.; BROWN, P. J. **The skin of hairless mice.** *The Journal of Investigative Dermatology*, p. 259-269, 1954

MONTEIRO-RIVIERE, N. & RIVIERE, J. E. **Skin** In: *Toxicology*, ed. 1, Academic Press, cap. 18, p. 439-445, 1999

MOON, S. E.; YOUN, J. L.; KIM, J. A. **The effect of ultraviolet B exposure scheduling on the photodamage of hairless mouse skin.** *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, v. 16, p. 74-77, 2000

MORGANTI, P. **The photoprotective activity of nutraceuticals.** *Clinics in Dermatology*, v. 27, p. 166-174, 2009

MOWAD, C. M. **Allergic contact dermatitis caused by parabens: 2 case reports and a review.** *American Journal of Contact Dermatitis*, v. 11, p.53–56, 2000

NISHIGORI, C. **Cellular aspects of photocarcinogenesis,** *Photochemical & Photobiological Science*, v. 5, p. 208 – 214, 2006

OSTEWALDER, U.; HERZOG, B. **Sun protection factors: world wide confusion.** *British Journal of Dermatology*, v. 161, p. 13-24, 2009

PALM, M. D.; O'DONOGHE, M. **Update on photoprotection.** *Dermatologic Therapy*, v. 20, p. 360-376, 2007

PANTELEYVEV, A. *et al.* **The role of the hairless (*hr*) gene in the regulation of hair follicle catagen transformation.** American Journal of Pathology, v. 155, p. 159-171, 1999

QUEILLE, S. *et al.* p53 mutations in cutaneous lesions induced in the hairless mouse by a solar ultraviolet light simulator. Molecular carcinogens, v. 3, p. 167-174, 1998

Questel Orbit, disponível em: < <http://www.questel.com/> > Acessado em novembro de 2011

RABE, J. H. *et al.* **Photoaging: mechanisms and repair.** Journal of America Academy of Dermatology v. 55, p. 1-19, 2006

RAGEL, V. L. B. I.; CORRÊA, M. A. **Fotoproteção.** Cosmetics & Toiletries (Edição em Português), v. 14, p. 88-95, 2002

RAMOS-E-SILVA, M. & CARNEIRO, S. C. S. **Cosmetic for the elderly,** Clinics in Dermatology, v.19, p. 413-423, 2001

REICH, A. *et al.* **Application of sunscreen preparations: a need to change the regulations.** Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, v. 25, p. 242-244, 2009

RIZWAN, M. *et al.* **Tomato past rich in lycopene protects against cutaneous photodamage in human in vivo: a randomized controlled trial.** The British Journal of Dermatology, v. 164, p. 154-162, 2010

RODRIGUEZ, A. L. *et al.* **Effects of ultraviolet radiation on human cutaneous nerve fibers.** Cell Proliferation, v. 42, p. 562-567, 2009

ROPKE, C. D. *et al.* **Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse.** Journal of Clinical da Experimental Dermatology, v. 30, p. 272-276, 2005

SAMS W. M.; SMITH, J. G. **The histochemistry of chronically sun damage skin.** Journal of Investigative Dermatology, v. 37, p. 447-452, 1964

SAUD, E.S. *et al.* **Clinical and histopatoloigcal outcome of subconjuntival triamcinolone injection for the treatment of acute ocular alkali burn in rabbits.** Cornea, v. 31, p.181-187, 2012

SCHERSCHUM, L.; HENRY, W. L. **Photoprotection by sunscreens.** Americal Journal of Clinical Dermatology, v. 3, p. 131-134, 2001

SCHIEKE, S. M.; SHROEDER, P, KRUTMAN, J. **Cutaneos effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms.** Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine, v. 19, p. 228 – 234, 2003

SERGER, D. R. *et al.* **Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.** *Science*, v. 219, p. 983-985, 1983

SHAATH, N. A. **The encyclopedia of Ultraviolet Filters**, ed. 1 Allured Publishing Corporation, USA, pp.222, 2007

SHROEDER, P.; HAENDLER, J.; KRUTMAN, J. **The role of near infrared radiation in photoaging of the skin.** *Experimental Gerontology*, v. 43, p. 629-632, 2008

SKOBE, M. & DETMAR, M. **Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system.** *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 5, p. 14-19, 2000

SVOBODOVÁ, A.; VOSTÁLOVÁ, J. **Solar radiation induced skin damage: Review of protective and preventive options.** *Int. J. Radiat. Biol.* v. 86, p. 999-1030, 2010

SVOBODOVÁ, A. *et al.* **Ultraviolet light induced alterations to the skin** .*Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomonuc Czech Repub.* v. 150, p. 25-38, 2006

URBACH, F. **The historical aspects of sunscreen.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 64, p. 99-104, 2001

VOLLMAR, B. *et al.* **Skin microvascular adaptations during maturation and aging of hairless mice.** *American Journal of Physiology Heart Circulation*, v. 279 p. 1591-1599, 2000

WOLF, R. & OUMEISH, O. Y. O. **Photodermatoses.** *Clinics in Dermatology*, v. 16, p. 41-57, 1998

YAAR, M. & GILCHEREST, A. B. **Photoaging: mechanism, prevention and therapy,** *British Journal of Dermatology*, v. 157, p. 874-887, 2007

YANO, K. *et al.* **Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and by downregulation of thrombospondin-1.** *British Journal of Dermatology*, v. 152, p. 115-121, 2005

ZASTROW, L. *et al.* **The missing link – light induced (280 – 1,600 nm) free radical formation in the human skin.** *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 22, p. 31-44, 2009

ZHEVAGO N. A.; SAMOILOVA K. A.; CALDERHEAD R. G. **Polychromatic light similar to the terrestrial solar spectrum without its UV component stimulates DNA synthesis in human peripheral blood lymphocytes in vivo and in vitro.** *Photochemistry and photobiology*, v.82, p. 1301-1308, 2006

ANEXO I – Mercado cosmético em fotoproteção e antienvelhecimento

O Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial de consumo de produtos cosméticos perdendo posições para os Estados Unidos (1º lugar) e o Japão (2º lugar). O desempenho do crescimento médio nacional deste setor gira em torno de 18,9%, superior à taxa média mundial, que gira em torno de 9,8% e coloca o Brasil no pice do crescimento médio do setor (ABIHPEC, 2012).

Tabela 9 : Ranking mundial do mercado cosmético em 2011. Adaptado de ABIHPEC, 2012

Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos	2010	2011	Crescimento %	Participação %
	US\$ Milhões (preço ao consumidor)	US\$ Milhões (preço ao consumidor)		
Mundo	387.727,1	425.866,5	9,8	
1 Estados Unidos	60.744,0	63.086,4	3,9	14,8
2 Japão	43.381,7	47.267,7	9,0	11,1
3 Brasil	36.186,9	43.028,5	18,9	10,1
4 China	23.879,4	27.704,3	16,0	6,5
5 Alemanha	17.730,3	19.419,9	9,5	4,6
6 França	16.079,1	17.294,7	7,6	4,1
7 Reino Unido	15.592,8	17.019,8	9,2	4,0
8 Rússia	12.373,0	14.187,0	14,7	3,3
9 Itália	12.158,1	12.964,7	6,6	3,0
10 Espanha	10.473,3	11.007,4	5,1	2,6
Top Ten	248.598,6	272.980,4	9,8	64,1
©2012 Euromonitor International				

O Brasil é primeiro no ranking de consumo de perfumaria e desodorantes, segundo no consumo de produtos para cabelo, produtos para higiene oral, tanto masculino como infantil, filtros solares; terceiro em cosméticos de cores (i.e. maquiagens); quarto em produtos depilatórios e quinto em *skin care* (ABIHPEC, 2012).

O mercado cosmético é bastante heterogêneo com empresas atuantes apenas em alguns sub-segmentos (ex. Shiseido atuante somente nos segmentos pele ou *skin care* e maquiagem) ou atuando em todos os setores (ex. Procter & Gamble). No ranking da disputa desse mercado destacam-se: Procter & Gamble com capital de vendas estimado em US\$ 28,2 bilhão, L'Óreal com US\$ 25,8 bilhão e Unilever com US\$ 18,2 bilhão de dólares. A Natura é a única empresa brasileira que aparece no ranking das 20 maiores empresas do setor e encontra-se na décima quarta posição, com capital de vendas de 2,9 bilhão (Euromonitor Internacional, 2012).

A corrida pela liderança de qualquer segmento comercial passa pela inovação e pela busca de novas tecnologias. A indústria de beleza, como não poderia ser diferente, é ávida por novas tecnologias e quando se circunscrevem essas tecnologias no âmbito das tecnologias antienvelhecimento e fotoproteção, pode-se observar através de uma

análise panorâmica na base de dados de patentes privadas Questel Orbit, que até o ano de 2011 estão sob detenção patentária 362 tecnologias em fotoproteção. Dentre estas, 55,52% são de titularidade da multinacional francesa L'Óreal, totalizando em números 201 documentos, 4,69% sendo de titularidade da Procter & Gamble, totalizando 17 documentos e 3,59% são de titularidade da Unilever, totalizando 13 documentos (Questel Orbit, 2011).

As primeiras evidências científicas que correlacionaram a exposição solar ao surgimento de cânceres datam de 1884 foram de Paul Gerson Unna (1859★ – 1929■) , médico alemão e pesquisador que desenvolveu a dermatologia como especialidade médica e também ajudou a fundar a Nívea Cosméticos (WOLF & OUMEISH, 1998).

A linha do tempo da inovação tecnológica em fotoproteção aponta o surgimento de sua primeira patente no ano de 1987 (Questel Orbit, 2011). Entre os anos de 1995 e 2006 ocorreu um aumento expressivo na descoberta e patenteamento de novas tecnologias fotoprotetoras e anti-envelhecimento (Questel Orbit, 2011). (Figura 23)

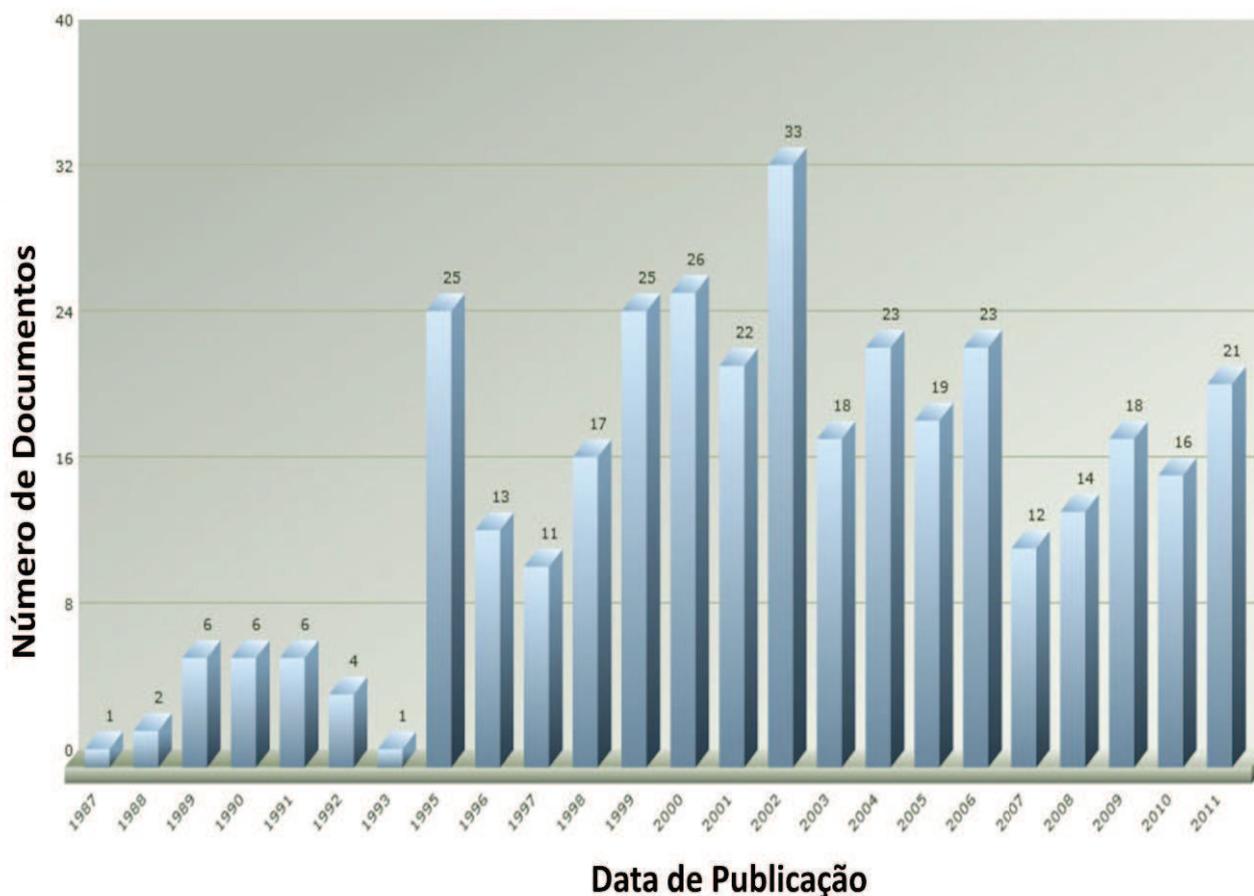


Figura 43: Evolução temporal de patentes concedidas a partir de 1987 até o ano de 2011. Fonte: Adaptado de Questel Orbit, 2011.

Acompanhando a evolução patentária da empresa líder mundial no segmento de beleza – L’Óreal – pode-se observar que em 1995, das 25 patentes em fotoproteção cedidas pelos órgãos regulamentadores 18 são de propriedade da mesma, e esta se mantém com picos de depósitos até 2011 (questel.com, acessado 11/2012). (Figura 24 e Figura 25)

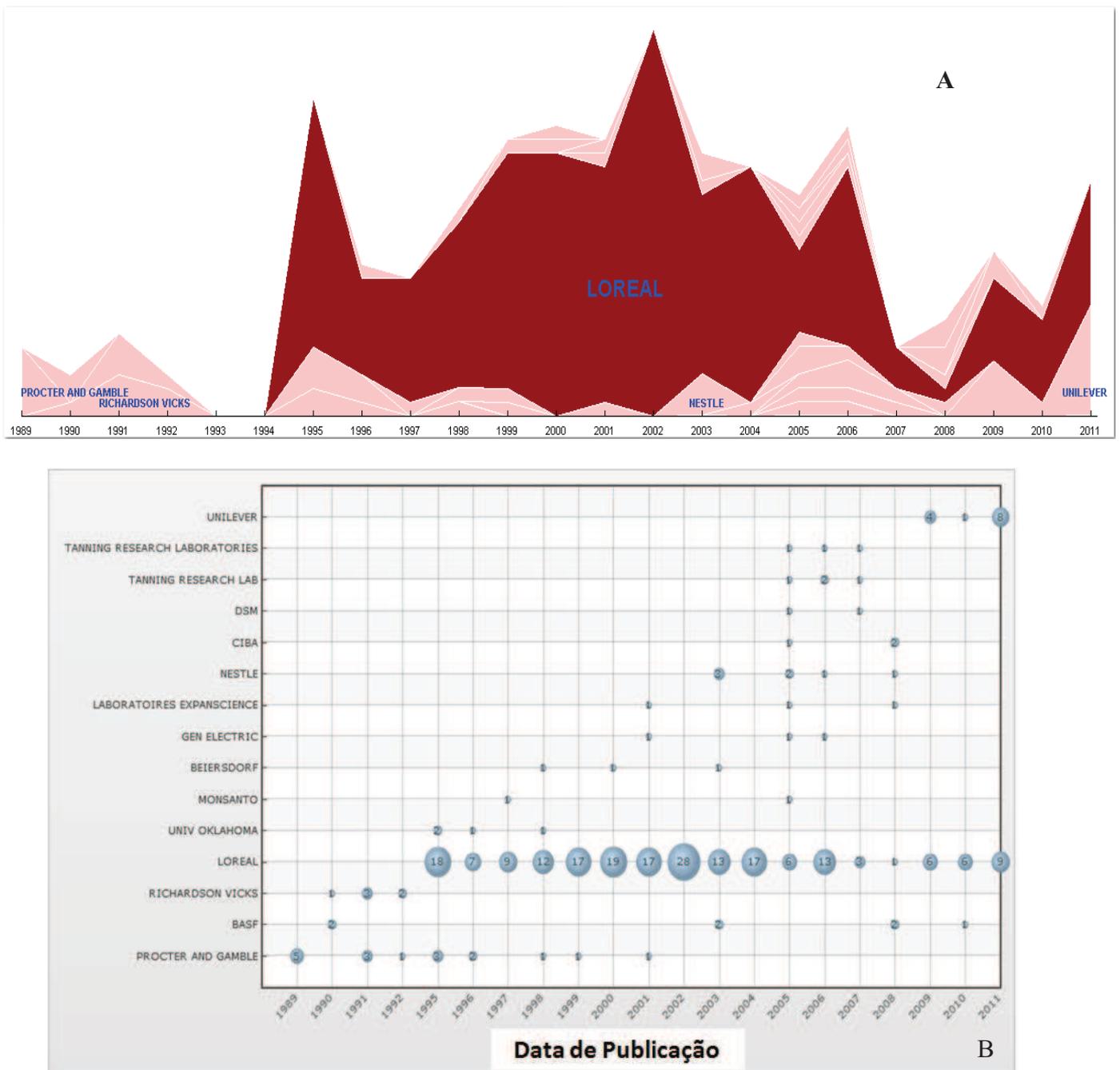


Figura 44: Evolução temporal de patentes concedidas pelos principais depositantes a partir de 1989 até o ano de 2011. Destaque para a líder mundial no segmento de Beleza, L’Óreal, fonte: Questel Orbit, 2011. Distribuição dos principais depositantes (A). Distribuição quantitativa (B). Adaptado de Questel Orbit, 2011.

O atraso tecnológico das demais empresas do ramo fica nítido após esta análise, e sua confirmação fica ainda mais precisa quando se observa o perfil de citação da multinacional francesa nas cartas patentes das demais empresas, consolidando a mesma como a grande indústria da beleza (Questel Orbit 2011) (Figura 25).

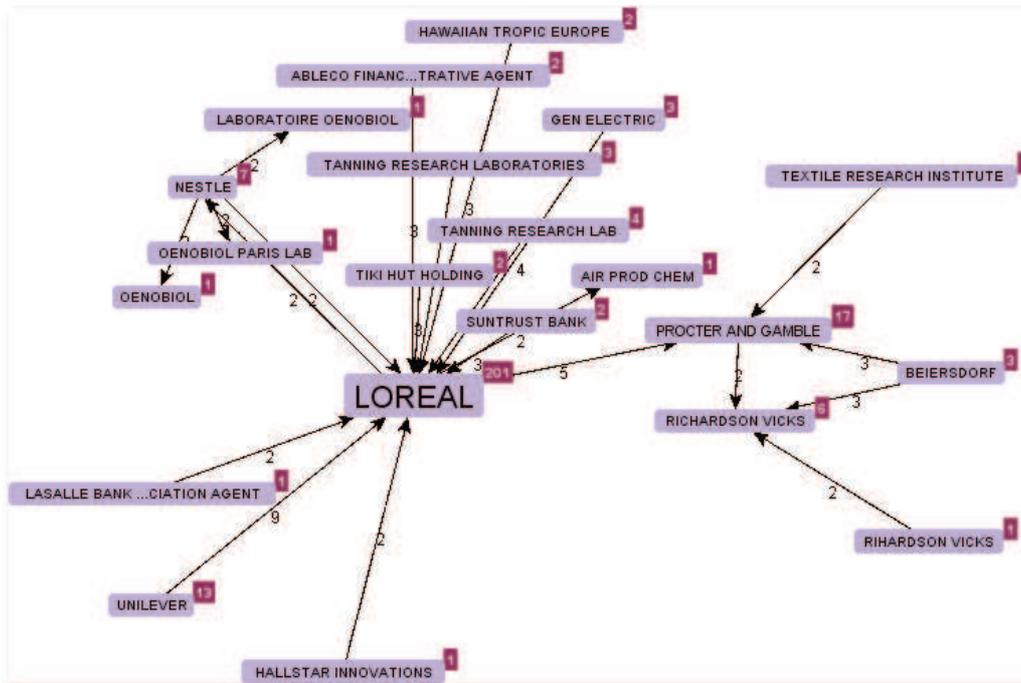


Figura 45: Perfil de citação de literatura patentária por depositante. Destaque para L'Óreal como maior perfil de citação Adaptado de Questel Orbit, 2011.

ANEXO II - A

**Revisão do estudo para evidencição de alterações morfológicas e bioquímicas
com a radiação ultravioleta – parte 1**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cepa	5kh:HR-1	H05:HR-1	HR-/Kud	5kh:HR-1	5kh:HR-1	5kh:HR-1	XXX	5kh:HR-1	(MF1/h)
Idade	8w	7 w	5w	10 w	6 – 8w	6 – 8w	8 – 12w	10w	2 – 3 M
Sexo	F	F	F	XX X	F	XXX	XXX	F	F
Nº de exposições por grupo	1 – 3x w 2 – 6x w	3x w	5x w	3x w	3x w	3x w	XXX	XXX	1 - 3 x w (UVA) 2- 5x w (UVB)
Nº de animais	10 por grupo (20)	20 por grupo (10)	20 por grupo (40)	1 – 10 por grupo 2 - 20 por grupo (30)	30 por grupo (60)	XXX	6 por grupo	XXX	XX
Tempo	10w	36w	10w	10w (10min/d até 4 w e ↑↑ 5min a cada 2 w até 10 w 10w 30min/d)	24w	30w	XXX	5 – 10W	1 – 52w (UVA) 2 – 12w (UVB)
Distância		XXX	40cm	45cm	16cm	XXX	XXX	XXX	45cm
Tipo de radiação	UVB	UVA UVB	UVB	UVA UVB	UVB	UVB	UVB	XXXX	1 – UVA 2 - UVB
Pico		XXX	310nm	XXX	XXX	XXX	310nm (270- 350)	XXX	XXX
Perfil de dose	70mj/m ² 1 – 0,5MED 2- 1MED ↑ 0,5 até 2MED p/w	30 J/cm ² (UVA) 40 mj/cm ² (UVB).	70mj /cm ²	0,1 J/cm ² de UVA e UVB (Início) 0,3 J/cm ² de UVA e UVB (Fim)	0,06 J/cm ² por 4 minutos	0,05J/cm ² 4xMED	0,15J/cm ² 7,5xMED	XXX	1 - ½ MED (35J/cm ²) (UVA) 2 - 0,5 ME/w ↑↑ 20% até 12w (4J/cm ²)
Presença de filtro	Sim	Sim	Não	XXX	Sim	XXX	XXX	XXX	XXX
Data do estudo	2000	1994	2001	1988	1989	1988	2006	1989	2000

Revisão do estudo para evidenciação de alterações morfológicas e bioquímicas com a radiação ultravioleta – parte 2

10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
5kh-1	5kh-1	5kh-1	5kh-1	HWY/sl	HOS :HR-1	OFA-hr /hr	5kh - 1	HR-1	HR5/J
8 - 12 w	6 - 8 w	10 w	6 - 8w	6w	XXX	6 w	6 - 8 w	XXX	XXX
F	XXX	F	XXX	F	XXX	M	XXX	F	XXX
5 x w	1 - 3x w (UVA) 2 - 4 x w (UVB)	5 x w	7x W	1 vez	3 x w	XXX	1 - 3x w (UVB) 2 - 3x w (UVA)	1 vez	XXX
10 por grupo	12 por grupo	XXX	XXXX	XXX	XXX	XXX	12 por grupo (60)	30	24
1 - 12w 2 - 24w 3 - 30w 4 - 36w	1 - 32w 2 - 20 até 30w	1 - 5w 2 - 10w 3 - 15w 4 - 20w	40 dias	3 minutos	10w	XXX	1 - 30w (UVB) 2 - 34 w (UVA)		
60cm	38cm	20cm	XXX	XXX	65 cm UVA 26 cm UVB	XXX	XXX	XXX	20cm
UVB	UVA UVB	UVA	UVA (46%) UVB(52%)	UVA	UVA UVB	UVA UVB	UVA - BL UVA - alta dose UVB Simulador Solar Simulador de amplo espectro	UVB	Simulador
313nm (275-400)	UVA (340nm) UVB (313nm)	352 nm	XXXX	XXXX	XXXX	312	XXX	XXX	XXX
UVB (62mj/cm²)	25 J/cm² com ↑ 100J/cm² na última w UVA 0,1 J/cm² UVB	16,3 J/cm²	70J/m²	20mW/cm²	14 J/cm² (UVA) e 20mj/cm² (UVB)	7 J/cm²	0,07J/cm² UVB 35J/cm² UVA	200 mj/cm²	0,399mw/cm² UVB
XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	Sim	XXX	Sim
1986	1993	1999	2007	2003	2003	2008	1985	2003	2011

**Revisão do estudo do efeito protetor de fármacos e cosméticos
frente à radiação UV – Parte 1**

	1	2	3	4
Cepa	5kh:HR-1	5kh:HR-1	5kh:HR-1	5kh:HR-1
Idade	8 – 10w	8 – 10w	6 – 8w	XXX
Sexo	F	F	F	F
Nº de exposições	3x w	5x w	3x w	5x w
Nº de animais	XXX	XXX	5 grupos (90)	4 grupos (10)
Tempo	10w	XXX	10w	XXX
Distância	XXX	XXX	40cm	XXX
Tipo de radiação	UVB UVA (28% de contaminação)	UVB	Simulador Solar	Simulador Solar
Filtro	315nm	315nm	290nm (UVB) 360nm (UVA)	XXX
Perfil de Dose	Início 1MED ↑↑↑ 0,5MED/w até 4MED (0,24 J/cm ² UVB) Em 10w de estudo 4,6J/cm ² de UVB and 1,8J/cm ² de UVA.	dose final acumulativa 2,62J/cm ² 30 minutos de sol em um dia de inverno em Nova York	0,018 J/cm ² UVB e 0,96 J/cm ² UVA	Total acumulado de UV 3460 J/cm ²
Presença de filtro	Sim	Sim	Sim	XXX
Data do estudo	1995	1999	1996	1994

**Revisão do estudo do efeito protetor de fármacos e cosméticos
frente à radiação UV – Parte 1**

5	6	7	8
Skh:HR-1 e Skh: HR-2	Skh-1	Hos:HR-1	Skh:HR-1
6 - 8 w	3 - 4w	10 w	10w
XXX	XXX	F	XXX
3x w por 30 min	XXX	5x w	4x w
5 por grupo (800)	XXX	8 animais por grupo (40)	4 animais por grupo (20)
30w	1 - 6 w 2 - 1 dia	20w	
45	60cm	20cm	26cm
Simulador Solar	UVB (80%) UVA (20%)	UVA	0,07 J/cm ² of UVB
XXX	297nm	352nm	XXX
UVB 0,18J/cm ² UVA 0,17J/cm ²	0,48 - 0,50J/cm ² de UVB	Total acumulado de UV 1080 J/cm ²	≈0,7MED para este animal (0,11J/cm ²) .
XXX	XXX	XXX	XXX
1981	1999	2001	2004

**Revisão do estudo do efeito protetor de extratos vegetais e
ingredientes alimentares – parte 1**

	1	2	3	4
Cepa	BALB:cA Kud-hr	XXX	HRM	HOS: HR-1
Idade	6 – 8w	8 – 12w	5 w	5w
Sexo	F	F	M	M
Nº de exposições	1x w	1x w	7x w	3x w
Nº de animais	5 grupos (75)	XXX	XXX	XXX
Tempo	XXX	29min	19w	12w
Distância	XXX	XXX	XXX	XXX
Tipo de radiação	UVB	Simulador solar	UVB	UVB
Pico	305nm	XXX	312nm	312nm
Perfil de Dose	3.43 KJ/m ²	2.8 W/cm ² de UVA e UVB	Dose inicial 36mj/cm ² Com ↑ 18mj/cm ² a cada 3 w do final 180mj/cm ²	36mj/cm ² de UVB
Presença de filtro	XXX	Sim	XXX	XXX
Data do estudo	2000	1996	2009	2009

Revisão do estudo do efeito protetor de extratos vegetais e ingredientes alimentares – parte 2

5	6	8	9	10
HRS/J	5kh:HR-1	5kh:HR-1	5kh-1	HRS/J
XXX	6 w	10w	12 – 18w	10w
M	XXX	XXX	XXX	XXX
XXX	5x w	4x w	3x w	4x w
2 grupos (60)	XXX	4 grupos (20)	4 grupos (20)	XXX
XXX	3w		11 W	10min ao dia por 1 w
20cm	40m	26cm	XXX	XXX
UVA (27%) UVB (73%)	UVB	UVB	UVB	UVB
313nm	XXX	XXX		285nm
61,56 mJ/cm ²	1 - KJ/m ² (2w) de UVB 15KJ/m ² 2 - 1w com ↑0,15KJ/m ² /wate 0,9KJ/m ²	0,11J/cm ² de UVB	45 mJ/cm ²	0,07 J/cm ² de UVB
XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
2006	2002	2004	2007	2005

Revisão dos estudos de indução de carcinogênese – Parte 1

	1	2	3	4	5*
Cepa	SKH:HR1	SKH:HR1	SKH:HR1	SKH:HR1	SKH:HR1
Idade	10-15w	8 – 10w	6 e 10 w	4w	6-9w
Sexo	F	F	M e F	F	XXX
Nº de exposições	5x w	3x w	7x w	7x w	XXX
Nº de animais	XXX	XXX	XXX	XXX	7 grupos (168)
Tempo	1 – 23w 2 - 26 w 3 - 27w	XXX	75min/dia (UVC e B) 12h de UVA	2w	XXX
Distância	XXX	35cm (UVB) 10cm (SSR)	XXX	XXX	20cm
Tipo de radiação	Simulador Solar	Simulador Solar UVB	UVB UVA UVC	Simulador solar	UVB 73% UVA 27%
Pico	305nm	XXX	XXX	XXX	XXX
Perfil de Dose	2.3 mW/cm ² de UVB e 290mW/cm ² de UVA	(UVB) 55 mJ/cm ² de cada radiação ≈0,8MED (SSR) 540 mJ/cm ² ≈0.8 x MED	36 mJ/cm ²	(UVB) 2.4x10 ⁻⁴ W/cm ² (UVA) 1.8x10 ⁻³ W/cm ²	0.31–3.69 J/cm ² .
Presença de filtro	XXX	Sim	Sim	XXX	XXX
Data do estudo	1998	1990	1992	1998	1993

Revisão dos estudos de indução de carcinogênese – Parte 2

6	7	8	9	10	11
SKH – 1	C3.Cg/ TifBomTac	C3H/tif	C3.Cg/ TifBomTac	SKH:HR1	Balb/cA Kud-hr
XXX	15 – 23w	10 – 15w	15 – 23 w	6 – 10 w	12 – 15 w
XXX	F	F	F	XXX	
3x w 30s	XXX	XXX	3xw por 5 min e 55s	XXX	3x w
	12 grupos (300)	211	11 grupos (275)	XXX	3 grupos (30)
25w	XXX	XXX	XXX	XXX	30w
XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	40cm
UVB (10%) UVA (90%)	Simulador Solar	UVA UVB	Simulador Solar	UVA UVB	UVB (65%)
XXX	365nm	340 nm	365	XXXX	311nm
Total acumulado 6,75 J/cm ²	XXX	XXX	25 J./cm ²	XXXX	350 - 850 mJ/cm ² 170 - 250 mJ/cm ²
XXX	XXX	XXX	XXX	XXXX	XXX
2000	2009	2007	2008	1991	2007

ANEXO II – B**1 – Lista Descritiva Revisão dos estudos para evidência de alterações morfológicas e bioquímicas com a radiação ultravioleta**

- 1 – The effect of ultraviolet-B exposure scheduling on the photodamage of hairless mouse skin
- 2 – Disaccharide analysis of the skin glycosaminoglycans in chronically ultraviolet light-irradiated hairless mice
- 3 – Degenerative Alterations of Dermal Collagen Fiber Bundles in Photodamaged Human Skin and UV-Irradiated Hairless Mouse Skin: Possible Effect on Decreasing Skin Mechanical Properties and Appearance of Wrinkles
- 4 – Connective tissue alteration in the skin of ultraviolet Irradiated hairless mice
- 5 – Collagen metabolism in Ultraviolet Irradiated hairless mice and its correlation histochemical observations
- 6 - An ultrastructural study of ultraviolet - Induced elastic fibre damage in hairless mice skin
- 7 - Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation
- 8 – Alterations in dermal collagen in ultraviolet irradiated hairless mice
- 9 - Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin Effect of UV-irradiation
- 10 – UVB induced collagen changes in the skin of hairless mice Albino Mouse
- 11 – UVA induced ultrastructural changes in hairless mice skin : A comparison to UVB induced damage.
- 12 - Quantitative alterations of hyaluronan and dermatan sulfate in the hairless mouse dorsal skin exposed to chronic UV irradiation
- 13 - Growth stimulation of UV-induced DNA damage retaining epidermal basal cells gives rise to clusters of p53 overexpressing cells
- 14 – Yasui *et. al*, Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light, 2003
- 15 – kambayashi Involvement of changes in stratum corneum keratin in wrinkle formation by chronic ultraviolet irradiation in hairless mice, 2003
- 16 – Mulero *et. al*, Polypodium leucotomos extract inhibits glutathione oxidation and prevents Langerhans cell depletion induced by UVBUVA radiation in a hairless rat model, 2007
- 17 - Kligman *et. al*, The contribution of UVA and UVB to connective tissue damage in Hairless mice, 1985
- 18 – Yano *et. al*, Ultraviolet B-Induced Skin Angiogenesis Is Associated with a Switch in the Balance of Vascular Endothelial Growth Factor and Thrombospondin-1 Expression, 2003
- 19 – Dal Belo *et. al*, Photoprotective Effects of Topical Formulations Containing a Combination of Ginkgo biloba and Green Tea Extracts, 2011

2 – Lista descritiva dos estudos do efeito protetor de fármacos e cosméticos frente à radiação UV

- 1- *All-trans-retinoic acid enhances collagen gene expression in irradiated and non-irradiated hairless mouse skin*
- 2- *Reduction of UV induced skin tumor in hairless mice by selective COX- 2 inhibition*
- 3- *Topical tretinoin enhances corticosteroid-induced inhibition of tumorigenesis in hairless mice previously exposed to solar simulating radiation Reduction of UV induced skin tumor in hairless mice by selective COX- 2 inhibition*
- 4 - *Protection against UV photocarcinogenesis by fabric materials*
- 5 – *Prevention of Ultraviolet Damage to the dermis of hairless mice by suncreams*
- 6- *Chemoprevention Activity of Celecoxib, a Specific Cyclooxygenase – 2 Inhibitor, and Indometachin Against Ultraviolet Light – Induced Skin Carcinogenesis*
- 7- *Prevention of the photodamage in the hairless mouse dorsal skin by kojic acid as an iron chelator*
- 8 - *Topical hydrocortisone, clobetasol propionate, and calcipotriol do not increase photocarcinogenesis induced by simulated solar irradiation in hairless mice, 2009*

3 – Lista descritiva dos estudos de efeito protetor de extratos vegetais e ingredientes alimentares

- 1 – *Preventive effect of antioxidant (olive oil) on ultraviolet-induced skin cancer in mice*
- 2 – *Efficacy of Topically Applied Tocopherols and Tocotrienols in Protection of Murine Skin from Oxidative Damage Induced By Uv-Irradiation*
- 3 – *Effects of turmeric extract(Curcuma longa) on chronic ultraviolet B irradiation-induced skin damage in melanin-possessing hairless mice*
- 4 - *Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice*
- 5 - *Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice*
- 6 - *Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein*
- 7 - *Dal Belo et. al, Photoprotective Effects of Topical Formulations Containing a Combination of Ginkgo biloba and Green Tea Extracts, 2011*
- 8 - *Koo et. al, Protection from photodamage by topical application of caffeine after ultraviolet irradiation, 2007*
- 9 - *Photoprotective effect of Pothomorphe umbellata root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse*

4 – Lista descritiva de estudos de indução de carcinogênese

- 1 – *p53* Mutations in Cutaneous Lesions Induced in the Hairless Mouse by a Solar Ultraviolet Light Simulator
- 2 – Chronic ultraviolet radiation-induced skin tumors and associated changes in basal epidermal ornithine decarboxylase activity
- 3 - Wavelength Dependence of Skin Cancer Induction by Ultraviolet Irradiation of Albino Hairless Mice
- 4 - Protection by black tea and green tea against UVB and UVA + B induced skin cancer in hairless mice
- 5 - Interaction between Ultraviolet A and Ultraviolet B Radiations in Skin Cancer Induction in Hairless Mice
- 6 - Starcher, Role for tumour necrosis factor- α receptors in ultraviolet-induced skin tumours, 2000
- 7 - Lerche *et. al*, Photocarcinogenesis and toxicity of benzoyl peroxide in hairless mice after simulated solar radiation, 2009
- 8 - Faurschou *et al*, Squamous cell carcinoma induced by ultraviolet radiation originates from cells of the hair follicle in mice, 2007
- 9 - Lerche *et. al*, Topical pimecrolimus and tacrolimus do not accelerate photocarcinogenesis in hairless mice after UVA or simulated solar radiation, 2008
- 10 - Gruijl *et. al*, Wavelength Dependence of Skin Cancer Induction by Ultraviolet Irradiation of Albino Hairless Mice, 1993
- 11 - Kunisada *et. al*, Narrow-Band UVB Induces More Carcinogenic Skin Tumors than Broad-Band UVB through the Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimer, 2007

ANEXO III

Perfil de Emissão do Simulador Solar New Point Oriel 69920 do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF – UFRJ ao longo dos estudos

PERFIL UVA/UVB (mW/cm ²)										
9/5/2011		10/5/2011		11/5/2011		12/5/2011		13/5/2011		
UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	
2,02	0,388	2,006	0,306	1,942	0,362	1,92	0,377	1,9	0,336	
1,981	0,4	1,99	0,352	1,89	0,38	1,92	0,36	1,914	0,378	
2,007	0,389	1,998	0,37	1,85	0,355	1,888	0,337	1,964	0,379	
1,941	0,391	1,99	0,367	1,873	0,365	1,882	0,364	1,934	0,392	
1,89	0,39	1,96	0,363	1,863	0,36	1,825	0,37	1,856	0,37	
1,935	0,325	1,989	0,353	1,885	0,371	1,82	0,372	1,899	0,397	
2,035	0,38	1,895	0,36	1,865	0,366	1,864	0,399	1,877	0,36	
1,861	0,376	1,992	0,365	1,8811429	0,361	1,938	0,384	1,868	0,375	
16	3,039	15,82	2,836	15,049143	2,92	15,057	2,963	15,212	2,987	Soma
2	0,379875	1,9775	0,3545	1,8811429	0,365	1,882125	0,370375	1,9015	0,373375	Média

Perfil de emissão de Radiação UVA e UVB do estudo I - 09/05/11 – 13/05/11

Soma Total de UVA **Soma Total de UVB**
 9,64 mW/cm² 1,835 mW/cm²

PERFIL UVA/UVB (mW/cm ²)										
01/8/2011		02/8/2011		03/8/2011		04/8/2011		05/08/2011		
UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	
1,884	0,361	1,846	0,306	1,984	0,396	1,859	0,370	1,776	0,380	
1,837	0,304	1,810	0,37	1,950	0,396	1,838	0,375	1,852	0,379	
1,875	0,372	1,805	0,367	1,890	0,380	1,840	0,366	1,820	0,386	
1,830	0,351	1,810	0,363	1,908	0,394	1,836	0,365	1,835	0,368	
7,426	1,388	7,271	1,406	7,732	1,566	7,373	1,476	7,283	1,513	Soma
1,8565	0,347	1,8177	0,351	1,933	0,391	1,8432	0,369	1,821	0,378	Média

Perfil de emissão de Radiação UVA e UVB do estudo II - 01/08/11 – 05/08/11

Soma Total de UVA **Soma Total de UVB**
 9,27 mW/cm² 1,836 mW/cm²

PERFIL UVA/UVB (mW/cm ²)										
19/09/2011		20/09/2011		21/9/2011		22/9/2011		23/09/2011		
UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	
1,951	0,400	1,866	0,381	1,852	0,361	1,842	0,397	1,701	0,369	
1,966	0,386	1,904	0,378	1,905	0,379	1,789	0,374	1,895	0,365	
1,894	0,389	1,855	0,389	1,888	0,352	1,784	0,371	1,875	0,378	
1,886	0,405	1,831	0,379	1,894	0,392	1,851	0,375	1,798	0,376	
7,697	1,388	7,456	1,527	7,539	1,484	7,266	1,517	7,269	1,488	Soma
1,9242	0,395	1,864	0,382	1,885	0,371	1,816	0,379	1,817	0,372	Média

Perfil de emissão de Radiação UVA e UVB do estudo III -19/09/11 – 23/09/11

Soma Total de UVA **Soma Total de UVB**
 9,30 mW/cm² 1,899 mW/cm²

PERFIL UVA/UVB (mW/cm ²)										
24/10/2011		25/10/2011		26/10/2011		27/10/2011		28/10/2011		
UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	
1,794	0,362	1,866	0,340	1,816	0,352	1,633	0,358	1,777	0,342	
1,754	0,350	1,755	0,355	1,739	0,350	1,757	0,345	1,773	0,355	
1,728	0,350	1,711	0,346	1,895	0,381	1,774	0,339	1,864	0,358	
1,780	0,348	1,756	0,339	1,968	0,334	1,775	0,348	1,835	0,355	
7,056	1,408	7,088	1,380	7,418	1,417	6,939	1,390	7,249	1,410	Soma
1,764	0,352	1,772	0,345	1,8545	0,354	1,7348	0,347	1,812	0,352	Média

Perfil de emissão de Radiação UVA e UVB do estudo IV - 24/10/11 – 28/10/11

Soma Total de UVA **Soma Total de UVB**
 8,887 mW/cm² 1,750 mW/cm²

PERFIL UVA/UVB (mW/cm ²)										
21/11/2011		22/11/2011		23/11/2011		24/11/2011		25/11/2011		
UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	UVA	UVB	
1,807	0,333	1,837	0,375	1,747	0,361	1,823	0,370	1,818	0,361	
1,809	0,336	1,802	0,346	1,841	0,358	1,816	0,364	1,824	0,365	
1,818	0,359	1,781	0,352	1,768	0,368	1,823	0,357	1,783	0,361	
1,808	0,356	1,772	0,357	1,846	0,360	1,837	0,370	1,772	0,352	
7,242	1,384	7,192	1,430	7,202	1,447	7,299	1,461	7,197	1,439	Soma
1,8105	0,346	1,798	0,3575	1,800	0,482	1,825	0,365	1,799	0,360	Média

Perfil de emissão de Radiação UVA e UVB estudo V - 21/11/11 – 25/11/11

Soma Total de UVA **Soma Total de UVB**
 9,03 mW/cm² 1,910 mW/cm²

