



Surgical & Cosmetic Dermatology
ISSN: 1984-8773
Sociedade Brasileira de Dermatologia

Addor, Flávia Alvim Sant'Anna

Efeito de um suplemento nutricional na proteção contra os danos
decorrentes da poluição em queratinócitos: comprovação in vitro

Surgical & Cosmetic Dermatology, vol. 10, núm. 4, 2018, Outubro-Dezembro, pp. 319-322
Sociedade Brasileira de Dermatologia

DOI: 10.5935/scd1984-8773.20181041264

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265562421006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais informações do artigo
- Site da revista em redalyc.org

redalyc.org
UAEM

Sistema de Informação Científica Redalyc

Rede de Revistas Científicas da América Latina e do Caribe, Espanha e Portugal

Sem fins lucrativos acadêmica projeto, desenvolvido no âmbito da iniciativa
acesso aberto

Efeito de um suplemento nutricional na proteção contra os danos decorrentes da poluição em queratinócitos: comprovação in vitro

Effect of a nutritional supplement in the protection against keratinocyte damage due to pollution: in vitro confirmation

DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.20181041264>

RESUMO

Introdução: A interação da pele com poluentes atmosféricos tem demonstrado efeitos na barreira cutânea, assim como o desencadeamento de processos oxidativos relacionados ao envelhecimento prematuro da pele. O receptor de aril hidrocarbonetos (AhR) é proteína de transcrição que interage com os xenobióticos, regulando a transcrição de genes envolvidos com estresse oxidativo, inflamação, imunossupressão e pigmentação, além de levar a processos relacionados ao envelhecimento e carcinogênese.

Objetivo: Avaliar a eficácia antipoluentes de uma associação antioxidante na prevenção da translocação nuclear do receptor AhR

Métodos: Um modelo *in vitro* (cultura de queratinócitos) foi exposto à fumaça de cigarro, e a presença de AhR foi medida por ensaio Elisa-sanduíche.

Resultados: A cultura tratada demonstrou inibição da translocação nuclear do AhR em todas as concentrações avaliadas: aumentos de AhR de 75,38%; 59,88% e 117,79% são observados nas concentrações de 0,316; 0,100 e 0,0316mg/ml, respectivamente.

Conclusão: Os resultados sugerem a capacidade da formulação avaliada em prevenir a ativação de genes responsáveis pelos efeitos nocivos da fumaça de cigarro.

Palavras-chave: Dano ao DNA; Poluição do Ar; Translocador Nuclear Receptor Aril Hidrocarboneto

ABSTRACT

Introduction: The interaction between the skin and air pollutants has demonstrated effects in the cutaneous barrier, as well as triggering oxidative processes related to premature ageing of the skin. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a transcription protein that interacts with xenobiotics, regulating the transcription of genes involved with oxidative stress, inflammation, immunosuppression and pigmentation, besides leading to processes related to ageing and carcinogenesis.

Objective: Evaluate the anti-pollution efficacy of an antioxidant association for the prevention of the nuclear translocation of the AhR receptor.

Methods: A *in vitro* model (keratinocyte culture) was exposed to cigarette smoke and the presence of AhR was measured through sandwich ELISA assay.

Results: The treated culture demonstrated inhibition of the nuclear translocation of AhR in all concentrations evaluated: AhR increase of 75.38%; 59.88% and 117.79% are seen with the concentrations of 0.316; 0.100 and 0.0316mg / mL, respectively.

Conclusion: The results suggest the ability of the formulation analyzed in preventing the activation of genes responsible for the damaging effects of cigarette smoke.

Keywords: DNA Damage; Air Pollution; Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

Artigo Original

Autores:

Flávia Alvim Sant'Anna Addor¹

¹ Medcin Pesquisa (Centro de Pesquisa Clínica - Grupo Medcin) - Osasco (SP), Brasil.

Correspondência para:

Flávia Alvim Sant'Anna Addor

Rua Atílio Delanina, 178

Vila Campesina

06023-000, Osasco, SP

Brasil

E-mail: flavia@medcinnonline.com.br

Data de recebimento: 01/10/2018

Data de aprovação: 08/12/18

Trabalho realizado na Instituição:
MEDCIN Pesquisa - Osasco (SP), Brasil.

Suporte financeiro: Estudo *in vitro* patrocinado pela Melora-FQM Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

Conflito de interesse: A metodologia, execução e análise dos resultados obtidos foram realizadas pela investigadora de pesquisa da instituição envolvida, sem qualquer interferência da indústria patrocinadora.



INTRODUÇÃO

Há evidências consistentes de que a poluição atmosférica exerce efeitos deletérios à saúde humana, com repercussões respiratórias e cardiovasculares; mais recentemente, a interação desses poluentes com a pele tem demonstrado efeitos na barreira cutânea,¹ além de desencadear processos oxidativos relacionados ao envelhecimento cutâneo prematuro, como ficou demonstrado em estudo de coorte em grandes centros urbanos na Alemanha.²

Os mecanismos desse dano envolvem expressão de mediadores pró-inflamatórios e da proteína de translocação AhR (*aryl hidrocarbon receptor*), atuando tanto em queratinócitos como em melanócitos, levando a aumento da produção de espécies livres de oxigênio.^{3,4}

O receptor do AhR é proteína de transcrição que interage com xenobióticos, compostos químicos estranhos ao organismo. Essa interação com os xenobióticos é similar à dos receptores hormonais. A ligação de um composto xenobiótico ativa o receptor, permitindo sua translocação para o núcleo, regulando a transcrição de genes envolvidos com estresse oxidativo, inflamação, imunossupressão, pigmentação, podendo, portanto, levar a processos de envelhecimento prematuro e carcinogênese. A inibição da ativação dos genes mediados por AhR poderia interferir significativamente nos sinais de envelhecimento e carcinogênese.^{4,5}

A fumaça de cigarro contém mais de 4000 compostos tóxicos, incluindo muitos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), dioxinas e furanos que exercem efeitos prejudiciais sobre a pele pela indução de genes que atuam na inflamação e oxidação,^{6,7} sendo capazes de ativar a translocação do AhR.^{8,9}

A exposição aos agentes xenobióticos contidos nos poluentes, por exemplo a fumaça de cigarro, pode *in vitro* reduzir a presença do AhR citoplasmático, pois esse receptor, uma vez ativado pelo agente (ex: HAP), migraria para o núcleo visando à ativação dos genes relacionados à inflamação e oxidação.¹⁰

Em 2015 esse efeito de inibição da translocação foi investigado em cultura de queratinócitos por Vanzo e colaboradores.¹¹

Uma estratégia para prevenir os danos causados pela exposição constante a agentes exógenos, em particular, a fumaça de cigarro, envolve a utilização de substâncias que inibem a translocação do AhR para o núcleo, evitando assim o desequilíbrio da homeostase celular cutânea e a progressão das reações em cadeia que oxidam substratos orgânicos.

OBJETIVO

Avaliar a eficácia antipoluentes de uma associação de nutrientes na prevenção da translocação nuclear do receptor aril hidrocarboneto (AhR), induzida em modelo *in vitro* (cultura de queratinócitos) pela exposição à fumaça de cigarro.

MATERIAL E MÉTODO

Este ensaio foi conduzido em cultura de queratinócitos humanos HaCat, adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

As culturas foram incubadas em três concentrações não citotóxicas previamente determinadas da formulação avaliada de

Exímia Temporize® (Melora-FQM Rio de Janeiro (RJ) Brasil), constituída por vitaminas E, C, betacaroteno, luteína, licopeno, óleo de linhaça, zinco e selênio, de 0,316, 0,100 e 0,0316mg/ml respectivamente. As células foram mantidas em contato com a formulação durante 48 horas.

Após 48 horas de tratamento, as culturas foram submetidas à fumaça de cigarro utilizando uma câmara apropriada que permitiu a combustão completa de dois cigarros. As células foram incubadas por adicionais 24 horas com a formulação avaliada. Após esse período, as células foram submetidas à obtenção do lisado citoplasmático (três ciclos de congelamento a -20°C, com intervalo de 20 minutos entre cada ciclo, e posterior centrifugação a 10.000rpm durante 10 minutos) em que foi realizada a quantificação do mediador AhR.

Medida de AhR

A presença de AhR foi mensurada por meio de Elisa-sanduíche (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), utilizando kits adquiridos comercialmente (Uscn Life Science Inc., Houston, TX, USA). A leitura da absorbância foi realizada em monocromador Multiskan GO. Os valores de AhR foram normalizados pelo total de proteínas da amostra mensurado pela técnica de Bradford.¹²

Para análise dos resultados, a avaliação estatística utilizou o teste Anova, que permitiu mensurar a variação dos dados, comparando-os entre os grupos, seguido do pós-teste Bonferroni. Foi utilizado o nível de significância de 5% (GraphPad Prism v6).

RESULTADOS

Exposição à fumaça de cigarro X controle não exposto

A exposição das células à fumaça de cigarro promoveu redução de 42% na disponibilidade de AhR no citoplasma da célula quando comparado ao controle basal não exposto ($P < 0,001$). Esse resultado indica possível migração do AhR para o núcleo celular acoplado ao agente xenobiótico.

Culturas previamente tratadas com a formulação avaliada X controle não tratado, expostos à fumaça de cigarro

O pré-tratamento das culturas com a formulação avaliada demonstrou inibir a translocação nuclear de AhR em todas as concentrações avaliadas, sendo que o valor de inibição atingido foi superior a 100% em relação as células expostas à fumaça de cigarro. Observou-se aumento de 7,38%; 59,88% e 117,79% nas concentrações de 0,316; 0,100 e 0,0316mg/ml, respectivamente. Os resultados sugerem a capacidade da formulação avaliada de impedir a ativação de genes responsáveis pelos efeitos danosos da fumaça de cigarro (Gráfico 1).

DISCUSSÃO

A fumaça de cigarro exerce efeitos danosos à pele, mediados pelo receptor AhR, que é um fator de transcrição citosólico encontrado em forma inativa, que se liga ao agente tóxico e o transloca ao núcleo celular. No núcleo, o AhR regula a transcrição de genes envolvidos em estresse oxidativo, inflamação,

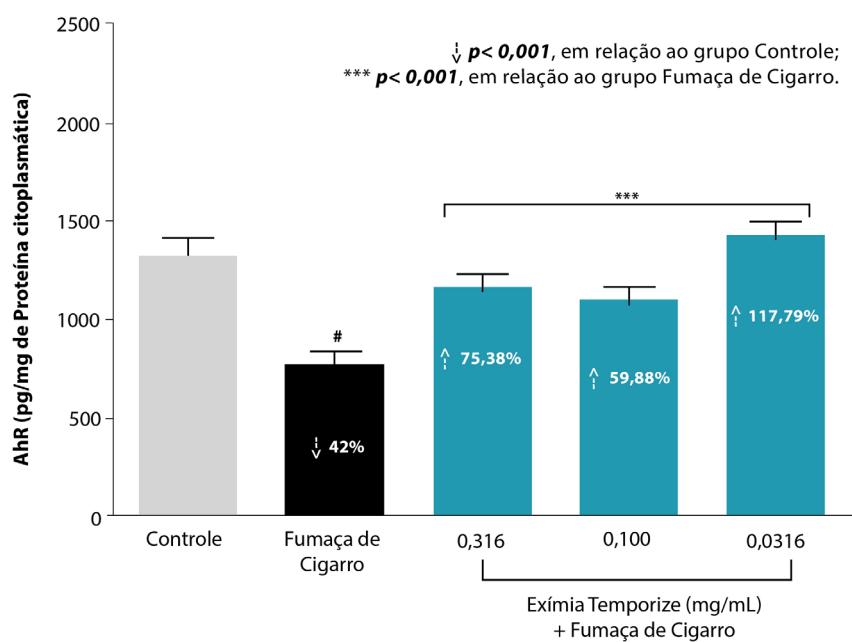


GRÁFICO 1: Quantificação de AhR na cultura de queratinócitos humanos tratados com a formulação teste contra os controles: sem exposição e sem tratamento, com níveis normais de AhR (coluna cinza) e expostos a fumaça sem tratamento (coluna preta), com redução de AhR, pela translocação nuclear. Observar o efeito protetor do uso da formulação teste, próximo aos níveis normais de receptores, mesmo diante do estímulo poluente

imunossupressão, pigmentação, envelhecimento prematuro e carcinogênese.¹³

O AhR pode ser regulado também por mecanismos oxidativos além de mediar esses mecanismos em nível nuclear. Portanto, inibir a translocação do AhR impediria os danos dos xenobióticos junto ao núcleo celular.¹⁴

Para analisar o envolvimento do AhR no envelhecimento cutâneo decorrente da fumaça de cigarro, Ono e colaboradores em 2008¹⁰ expuseram fibroblastos humanos primários a um extrato da fumaça de tabaco, observando aumento da indução do RNAm para metaloproteinase 1, associado a maior expressão do citocromo P1B1 (CYP P1B1).

O presente estudo demonstrou que o tratamento de queratinócitos com a associação de nutrientes evitou a translocação

nuclear, mantendo os receptores AhR no citoplasma. Essa prevenção da translocação, caracterizada pelo aumento da concentração desses receptores, chegou a 117,79% em relação à área exposta à fumaça de cigarro sem nenhum tratamento.

CONCLUSÃO

A associação de nutrientes contida na formulação avaliada exerceu efeito protetor celular contra o dano dos poluentes xenobióticos aos queratinócitos, uma vez que protegeu a translocação nuclear do receptor AhR, atingindo valor superior a 100% em relação ao controle. Esses achados demonstram que o tratamento avaliado possui ação coadjuvante na prevenção e no tratamento do processo de envelhecimento cutâneo por fatores extrínsecos, representados neste estudo pela fumaça de cigarro. ●

REFERÊNCIAS

1. Farage MA, Katsarou A, Maibach HI. Sensory, clinical and physiological factors in sensitive skin. *Contact Dermatitis*. 2006;55(1):1-14.
2. Vierkotter A, Schikowski T, Ranft U, Sugiri D, Matsui M, Kramer U, et al. Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *J Invest Dermatol*. 2010;130(12):2719-26.
3. Choi H, Shin DW, Kim W, Doh SJ, Lee SH, Noh M. Asian dust storm particles induce a broad toxicological transcriptional program in human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett*. 2011;200(1-2):92-9.
4. Krutmann J, Liu W, Li L, Pan X, Crawford M, Sore G, et al. Pollution and skin: from epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *J Dermatol Sci*. 2014;76(3):163-8.
5. Morita A, Torii K, Maeda A, Yamaguchi Y. Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2009;14(1):53-5.
6. Kasai A, Hiramatsu N, Hayakawa K, Yao J, Maeda S, Kitamura M. High levels of dioxin-like potential in cigarette smoke evidenced by in vitro and in vivo biosensing. *Cancer Res*. 2006;66(14):7143-50.
7. Kitamura M, Kasai A. Cigarette smoke as a trigger for the dioxin receptor-mediated signaling pathway. *Cancer Lett*. 2007;252(2):184-94.
8. Nakamura M, Ueda Y, Hayashi M, Kato H, Furuhashi T, Morita A. Tobacco smoke-induced skin pigmentation is mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Exp Dermatol*. 2013;22(8):556-8.
9. Ono Y, Torii K, Fritzsche E, Shintani Y, Nishida E, Nakamura M, et al. Role of the aryl hydrocarbon receptor in tobacco smoke extract-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Exp Dermatol*. 2013;22(5):349-53.
10. Ono Y, Yasuda Y, Shintani Y, Sakakibara N, Abel J, Fritzsche E, et al. Tobacco smoke extract induces matrix metalloproteinase (MMP-1) expression in human skin fibroblasts through the aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway. *J Invest Dermatol*. 2008;128(Suppl 1):S42.
11. Vanzo ACJR, Pereira AFC, Cascais LC, Lage R, Andrade CC, Araujo RB, et al. Uso de metodologia in vitro para o estudo de efeitos antipoluição para formulações cosméticas. Poster of II Congreso latino-americano sobre métodos alternativos en los ensayos, la investigación, la industria y la educación (COLAMA); 2015 Jul 5-9; Balneario de Varadero, Cuba. Havana: Red Latino-Ibero-Americana para Métodos Alternativos; 2015.
12. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
13. Abel J, Haarmann-Stemmann T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem*. 2010;391(11):1235-48.
14. R. Brigelius-Flohe R, Flohe L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(8):2335-81.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:

Flávia Alvim Sant'Anna Addor |  ORCID 0000-0003-1851-7342

Execução do estudo, compilação e revisão dos dados, supervisão da avaliação estatística e confecção do relatório.