

Agen

Descrição

Bioestimulador de colágeno I, III e IV que atua por meio da regulação epigenética melhorando a firmeza e elasticidade além de reduzir rugas e estimular a renovação e diferenciação celular garantindo uma pele mais jovem e saudável. **Agen** é composto por extrato da maçã e extrato supercrítico do gengibre.

INCI

Canola Oil (and) Malus Domestica Fruit Extract (and) Zingiber officinale (Ginger) Extract

Introdução

O aumento da expectativa de vida e o impacto do envelhecimento sobre a função biológica e a aparência da pele é diretamente proporcional ao aumento da demanda na busca por dermatologistas, esteticistas, cirurgiões plásticos e ao abundante interesse por produtos anti-idade, uma vez que os indivíduos não são motivados apenas pelo desejo de estender sua existência, mas também de permanecerem e aparentarem saudáveis^{1,2}.

O envelhecimento é um processo biológico multifatorial e complexo compartilhado por todos os seres vivos. Ele se manifesta por um declínio gradual dos processos fisiológicos normais e acontece de maneira dependente do tempo. Por este motivo, diversos estudos são realizados constantemente para identificar os biomarcadores celulares e moleculares deste processo.

Os fenótipos comumente identificados durante o amadurecimento da pele são: aparição de rugas finas, ressecamento da pele, palidez e a falta de elasticidade do tecido^{2,3,4}. Desta forma, torna-se necessário destacar que estas alterações fisiológicas são observadas nas três primeiras camadas da pele, como por exemplo a redução na função de barreira e o aumento do tempo de renovação celular na região da epiderme⁵, o enfraquecimento da região subsequente (junção dermoepidérmica) e na camada mais profunda, derme, a redução da atividade celular e o conteúdo de fibras elásticas⁴.

A derme é a camada conjuntiva situada abaixo da junção dermoepidérmica e é composta principalmente de matriz extracelular (MEC), uma mistura complexa de macromoléculas bioativas produzidas por fibroblastos. A principal função da derme é provisionar força e elasticidade à pele, e sua espessura varia de 0,5 mm a 3 mm^{6,7,8}. Os fibroblastos são células responsáveis pela produção e organização da MEC e exercem um papel importante na homeostase da pele, por meio da síntese de colágeno e elastina. O colágeno é o principal componente da MEC, cerca de 90% da proteína dérmica total, sendo os tipos predominantes: colágeno tipo I (85-90%), III (8-11%) e V (2-4%)^{7,9}.

Isto posto, é importante destacar que a espessura da derme é um dos principais fatores responsáveis pela espessura total da pele e a sua variação é determinada diretamente pelo conteúdo de colágeno presente nesta camada^{10,11}. Durante o envelhecimento cronológico a derme é caracterizada por uma perda gradual de sua espessura, e apresenta atrofia da MEC devido ao nível baixo de fibras colágenas e elásticas².

As fibras de colágenos proporcionam à pele resistência, firmeza e elasticidade, entretanto, com a idade, os níveis de colágeno diminuem entre 1,0 e 1,5% ao ano (Figura 1). Desse modo, à medida que os níveis de colágeno começam a diminuir, a estrutura dele se torna mais frágil, quebradiça e desorganizada, levando ao enfraquecimento do suporte estrutural do tecido cutâneo, assim, a pele perde volume e firmeza e observa-se o aparecimento de linhas finas e rugas mais profundas¹².

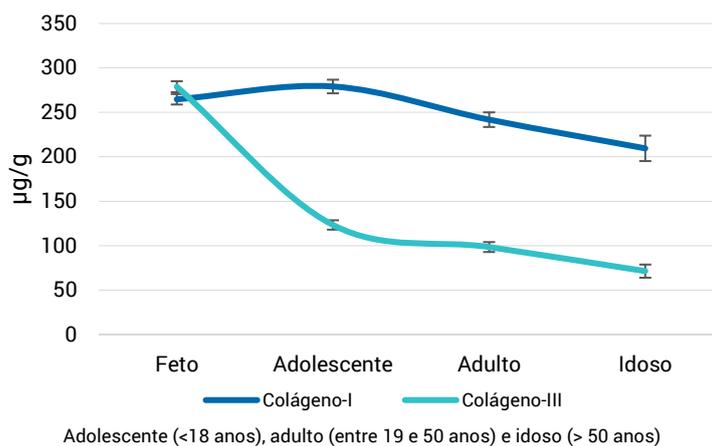


Figura 1 – Conteúdo de Colágeno I e III em diferentes faixas etárias¹³

É necessário ressaltar que a redução de colágeno-III (COL-III) ao longo dos anos é significativamente superior que a de colágeno-I (COL-I), com destaque ao grupo idoso no qual a diminuição é três vezes maior¹³. Em estudos realizados em fragmentos de pele humana, foi observado que a decomposição do colágeno tipo III no tecido cutâneo normal pode exceder sua síntese imediatamente após o nascimento e posteriormente levando à sua redução¹⁴.

O COL-III é uma fibra crucial para a fibrilogênese e regulação do diâmetro do COL-I, desta forma, observa-se que a regulação e a homeostase dos níveis de COL-I e COL-III são importantes marcadores biológicos no envelhecimento da pele¹⁴.

Nove biomarcadores do envelhecimento foram recentemente identificados como denominadores comuns em diferentes organismos: instabilidade genômica, desgaste telomérico, alterações epigenéticas, homeostase proteica, desregulação de nutrientes, disfunção mitocondrial, exaustão das células tronco e comunicação intercelular alterada¹⁶. No entanto, é preciso levar em conta que essas causas do envelhecimento não são independentes. Mecanismos epigenéticos controlam a atividade gênica e, portanto, diretamente ou indiretamente, afetam todos os outros biomarcadores. Portanto, epigenética representa um mecanismo crucial por trás da deterioração das funções celulares observadas durante o envelhecimento e em transtornos relacionados à idade¹⁷.

Epigenética e seus mecanismos

O termo “epigenética” tem origem do grego, em que “epi” significa “acima, perto, a seguir” e foi utilizado pela primeira vez em 1942¹⁹, e representa os mecanismos hereditários reversíveis, espontâneos ou estimulados por influências internas e externas (tais como: alimentação, atividades físicas, exposição ao sol ou poluição e

interações sociais) que ocorrem sem qualquer alteração da sequência do DNA e que podem causar padrões de envelhecimento distintos mesmo entre dois indivíduos geneticamente iguais¹⁷.

A regulação de alguns dos genes relacionados a componentes celulares e estruturais da pele são afetadas por mecanismos epigenéticos podendo desencadear alterações biológicas comumente encontradas na pele envelhecida, tais como: desorganização de componentes da matriz extracelular (MEC) e perda da integridade da derme, devido a alterações na MEC, impedindo sua associação com fibras de colágeno e, como consequência, reduzindo as propriedades mecânicas da pele²⁰.

Existem diferentes tipos de mecanismos epigenéticos, incluindo, mas não limitado à presença ou ausência de histonas em qualquer sequência de DNA específica, a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e a transcrição de RNAs não codificadores (ncRNAs)^{17,18}.

Apesar dos mecanismos de metilação do DNA e modificações de histonas serem mediadores epigenéticos durante o envelhecimento, os ncRNAs receberam considerável atenção pelo seu papel não apenas no envelhecimento, mas também em doenças relacionadas ao avanço da idade²¹. O RNA (ácido ribonucleico) é a principal molécula envolvida durante o processo e controle de síntese de proteína celular. Composto por uma única fita, o RNA é produzido no núcleo da célula (mimetizando uma das fitas do DNA), e em seguida é encaminhado para o citoplasma para produção de proteínas. Duas classes de espécies de RNA (Figura 2) são transcritas a partir de genomas de todos os organismos: RNAs mensageiros (mRNAs) e RNAs não-codificadores (ncRNAs)²². Os mRNAs são moléculas capazes de carregar a mensagem até o citoplasma para a tradução e, em seguida, sintetizar uma determinada proteína de acordo com a informação genética contida. Os ncRNAs não são traduzidos em proteínas, porém muitos deles são capazes de regular a expressão gênica, a transcrição ou até a tradução de mRNAs, sendo assim, uma espécie de “interruptor genético”²².

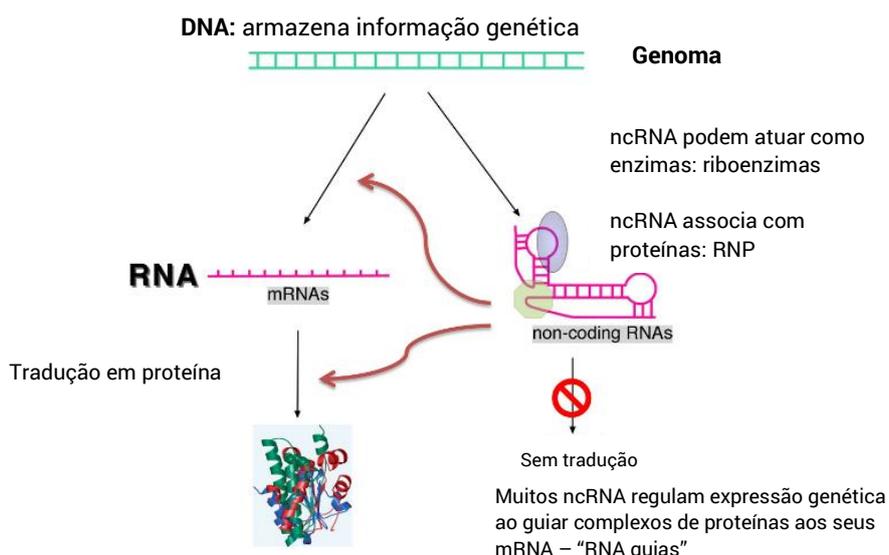


Figura 2: RNAs mensageiros (mRNAs) e RNAs não-codificadores (ncRNAs)

Os RNAs não-codificantes podem ser divididos em duas categorias: infra estruturais e reguladores. Pertencentes a classe dos reguladores, os miRNAs são os mais estudados dentre as pequenas espécies dos

ncRNAs, por serem melhor caracterizados e também pela sua influência no envelhecimento e na expectativa de vida. Além disso, dentre as categorias apontadas, os miRNAs atuam na regulação de processos fisiológicos do silenciamento gênico, por meio de mecanismos pós-transcricionais²².

De fato, o controle da regulação do miRNA tem um impacto importante nos processos de degeneração molecular, presentes nos estágios finais do envelhecimento²¹. Os números referentes ao estudo dos miRNAs vêm aumentando significativamente e, há a previsão da existência de pelo menos 1200 miRNA diferentes, sendo que mais de 800 deles já foram mapeados e identificados²³. Os miRNAs, presentes em mamíferos, são fundamentais para regulação de linhagens celulares, sendo os miRNA dominantes o caminho para vias específicas de diferenciação da célula²³.

O perfil da regulação do miRNA no tecido envelhecido é evidenciado em inúmeros estudos e demonstram, de maneira global, que a regulação positiva é maior que a negativa²⁴. Outros estudos também apontam que marcadores epigenéticos entre diferentes células do mesmo tecido aumentam com o avanço da idade²⁵. Há indícios que os genes controlados pelos miRNA atuantes neste cenário são associados a função mitocondrial, estresse oxidativo e proliferação celular²⁶.

Uma pesquisa evidenciou que miRNAs relacionados ao mecanismo de envelhecimento cutâneo analisados em fragmentos de peles jovens (<10 anos) e idosos (>60 anos) são significativamente regulados de forma positiva no tecido dérmico dos idosos, quando comparado ao dos jovens²⁷. Além disto, os miRNAs supra-regulados influenciam em mRNAs importantes para integração da estrutura dérmica da pele, em que um dos miRNAs estudados apresentou, via estudo funcional, impacto nos fibroblastos tendo como resposta a indução à apoptose celular e alteração na expressão gênica de marcadores relativos ao envelhecimento da pele²⁷.

Por este motivo e, buscando explorar mecanismos epigenéticos possíveis de serem regulados e relacionados ao envelhecimento, a Chemyunion desenvolveu o **Agen** um novo ingrediente ativo bioestimulador de colágeno I, III e IV que proporciona firmeza e elasticidade para a pele por meio da regulação epigenética de miRNA (miRNAs).

Agen foi inspirado em componentes nutricionais que são amplamente reconhecidos por afetar a saúde e o envelhecimento. Há um velho ditado que diz "uma maçã por dia mantém o médico longe". De fato, há muitos componentes na maçã que podem contribuir para isso e alguns deles podem estar relacionados ao controle epigenético. Esse é o mesmo caso do gengibre, pois é um dos principais componentes da dieta de uma população famosa pela grande concentração de centenários. A epigenética parece ser um dos mecanismos pelos quais os componentes nutricionais apresentam seu efeito, a Chemyunion então procurou estudar as bases científicas relacionadas ao conhecimento milenar da maçã e do gengibre para a saúde e na redução de fenótipos relacionados à idade para criar o **Agen**.

Descrição dos componentes

Agen é constituído pela mistura sinérgica do extrato da maçã (*Malus domestica*) e do extrato supercrítico do gengibre (*Zingiber officinale*) (Figura 3).



Figura 3: *Malus domestica* e *Zingiber officinale*

Malus domestica é uma árvore pequena, conhecida pelo mundo inteiro por seus frutos deliciosos e nutritivos, a maçã, que são cultivados em regiões temperadas do mundo. Floresce na primavera e tem flores brancas com uma tonalidade rosa²⁸. A *Malus domestica* exibe propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. A fruta da macieira é considerada nutritiva, pois tem constituintes benéficos para a saúde, como fibra alimentar, açúcares, proteínas, vitaminas (C e B6, B1, B2, B9), minerais (cálcio, potássio, magnésio e fósforo), ácidos orgânicos (ácido málico predominante) e compostos fenólicos (ácido cafeoilquínico, catequinas, procianidinas, quercetina etc.)²⁸⁻³⁰. Estudos indicam também a presença de diversos flavonóides em maçãs, e destacam alguns deles como exclusivos do fruto, como phloretin e seu glicosídeo phloridzin (phloretin-2'-glucose)³¹.

As aplicações farmacológicas da phloretin são inúmeras e já documentadas por inúmeros autores, sendo elas: antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e sua potente eficácia como agente antioxidante e hidratante³²⁻³⁴. As propriedades da phloretin, em estudos voltados para a pele, ressaltam a inibição da atividade da tirosinase em melanócitos, sendo assim utilizado como clareador cosmético³³. Além disto este flavonóide pode atuar como potencializador da permeação em aplicações tópicas na pele³³.

Devido a sua composição química, a *Malus domestica* apresenta ação contra o envelhecimento da pele. É bem conhecido que a vitamina C tem ação antienvhecimento já que age contra a perda de elasticidade da pele através do aumento de fibras colágenas e elásticas³⁵. Além disto, a quercitrina, um glicosídeo formado a partir do flavonóide quercetina, aumenta os níveis de decorina em fibroblastos³⁶. Analisando a atuação da *Malus domestica* em cosméticos, estudos demonstram que produtos contendo extrato da fruta podem reduzir a perda de água transepidermal e melhorar as propriedades mecânicas da pele, isto é, reduzir a profundidade das rugas³⁷.

Já o gengibre (*Zingiber officinale*) é amplamente utilizado no mundo em comidas como especiaria. Por séculos tem sido um importante ingrediente nas medicinas tradicionais Chinesa, Ayurvedica e Unani-Tibb (Sul da Asia), possivelmente devido sua composição³⁸.

Os constituintes do gengibre são numerosos e variam dependendo do lugar de plantio. Mais de 50 componentes do óleo foram caracterizados e estes são principalmente monoterpenóides (b-phellandrene, (+)-camphene, cineole, geraniol, curcumeno, citral, terpineol, borneol) e sesquiterpenóides (a-Zingibereno, b-sesquiphellandrene, b-bisabolene, (E-E)-a-farneseno, arcurcumeno, zingiberol). É rico em gingerols, que são uma série de fenóis. O mais abundante é [6]-Gingerol, embora as quantidades menores de outros gingerols com diferentes tamanhos de cadeias estejam também presentes. Um total de 115 compostos foi identificado, dos quais 88 foram relatados, que incluíram metil [8]-paradol, metil [6]-isogingerol e [6]-isoshogaol. [6]-(14), [8]-, [10]-e [12]-gingerdiones³⁸.

O gingerol é capaz de inibir a AP-1, cuja indução suprime a ativação de SMADs, que por sua vez participam das vias de regulação de colágeno já que são co-fatores de transcrição e regulam a transcrição de genes dependentes de TGF- β (fator de crescimento de tecido beta)³⁹.

Outra substância ativa encontrada no *Zingiber officinale* é o 6-Dehydrogingerdione. Esta substância atua aumentando o colágeno, reduzindo a expressão da proteína metaloproteinase-1 (MMP-1) e como inibidor tecidual recuperado da secreção do inibidor da metaloproteinase-1 (TIMP-1)⁴⁰. Outros estudos corroboram seu potencial antienvhecimento já que a aplicação tópica de um extrato de *Zingiber officinale* inibiu significativamente a formação de rugas induzida pela irradiação UV-B crônica, além de prevenir significativamente a diminuição da elasticidade da pele⁴¹. No entanto, muitos destes fitocomponentes constituintes de *Zingiber officinale* são extraídos em concentração pequena utilizando-se métodos convencionais de extração, tais como percolação e destilação, com ou sem ajuda de solventes orgânicos e inorgânicos. Estes compostos ativos podem ser extraídos por métodos de extração convencionais com o uso de solventes orgânicos com alto grau de perigo. Portanto, a busca por métodos de extração mais seguros e mais efetivos, para esta e outras plantas, se torna essencial.

O uso de técnicas mais sofisticadas tais como extração supercrítica por dióxido de carbono (CO₂ Supercrítico ou Fluido Supercrítico) favorece o isolamento de fontes vegetais, na sua forma mais pura e concentrada, eliminando, até certo nível, o uso de solventes assim como reduzindo o acúmulo de resíduo no produto final. Em vista destas vantagens, Chemyunion definiu esta técnica de extração como crucial para o desenvolvimento do extrato de *Zingiber officinale* usado na combinação sinérgica de **Agen**.

Benefícios

Agen

- estimula a produção de colágeno III (*baby collagen*) em 1223%, colágeno I em 136% e colágeno tipo IV em 45%, principais fibras da MEC que proporcionam resistência, firmeza e elasticidade à pele;
- promove a melhora da firmeza e da elasticidade da pele após 14 dias;
- redensifica a derme em 28,6% e melhora a espessura da epiderme em 40%;
- reduz rugas em até 31%;
- melhora a resistência, integridade e regeneração da pele;
- estimula a renovação e diferenciação celular garantindo uma pele mais jovem e saudável;
- melhora a uniformidade do tom da pele significativamente;
- regula vias epigenéticas por meio da redução da expressão gênica de 5 miRNA essenciais para reduzir e desacelerar o aparecimento de sinais do envelhecimento.

Testes

1. Eficácia *Ex Vivo*

1.1. Perfil de *miRNA*

Para detectar a influência do tratamento na produção de miRNA, fragmentos de pele humana de bleforopatia de 6 pacientes saudáveis com idade entre 45-60 anos foram incubados com uma formulação com 1%

de **Agen** por 24 horas. O tecido foi então submetido ao processo de maceração com o auxílio do aparelho Tissue Ruptor® (Qiagen), em seguida o miRNA foi extraído usando mini kit miRNAse (217004 Qiagen).

Para identificar os miRNAs que poderiam ser induzidos pelo tratamento com **Agen**, analisou-se o perfil de expressão do miRNA comparativo. Para esta análise, foram utilizados painéis de miRNAs TaqMan OpenArray Human. O software de análise qPCR em tempo real do OpenArray (Applied Biosystems) foi usado para analisar e revisar os valores obtidos de amplificação e ciclo de limiar (Ct). Valores médios de expressão foram calculados para cada miRNA usando o grupo placebo como referência para identificar miRNAs diferencialmente regulados. Para a predição de alvos de miRNA diferencialmente expressos, foi utilizado o software Diana Tools MR-microT.

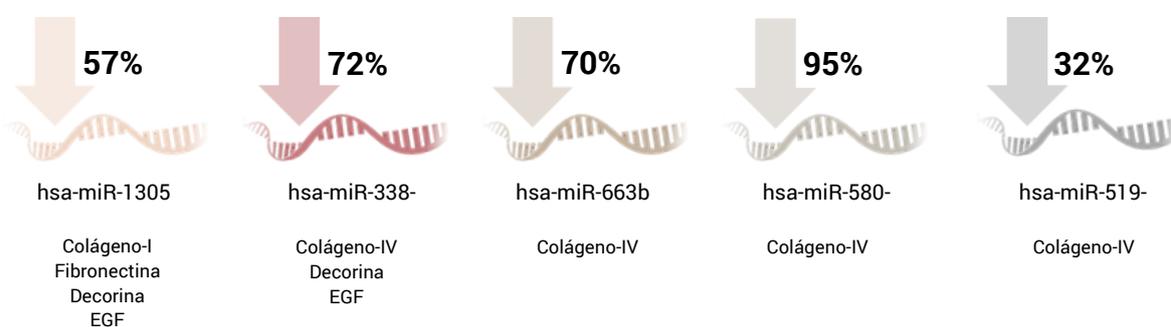


Figura 4: Expressão de miRNA. (EGF: Fator de Crescimento Epidermal, COL1A2: Colágeno Tipo 1 cadeia Alfa 2, COL4A3: Colágeno Tipo 4 cadeia Alpha 3, COL4A4: Colágeno Tipo 4 cadeia Alpha 4, COL4A6: Colágeno Tipo 4 cadeia Alpha 6, DCN: Decorina, FN1: Fibronectina1).

Agen demonstrou regular negativamente 5 miRNAs relacionados ao silenciamento de EGF, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, decorina e fibronectina (Figura 4).

O controle do crescimento e proliferação de células epidérmicas é mediado pela expressão do gene EGF (fator de crescimento epidermal). Quando o EGF se conecta ao seu receptor (EGFR), desencadeia uma cascata de reações que culminarão no aumento da proliferação e diferenciação. Estudos indicam que a redução da atividade de sinalização do EGF está associada a alterações relacionadas ao envelhecimento, como a xerose cutânea e o tecido atrofiado⁴².

O colágeno tipo I (COL1) é o principal responsável pelas propriedades mecânicas da pele e sua redução na síntese é uma característica do envelhecimento endógeno da pele, através de dois mecanismos distintos: a senescência dos fibroblastos e a diminuição do nível de estimulação mecânica⁴³. Além disso, fibrilas de COL1 não se formam ou se estabilizam sem a fibronectina, uma glicoproteína da matriz extracelular que se liga a proteínas receptoras de membrana chamadas integrinas⁴⁴. As fibronectinas desempenham um papel importante na adesão, crescimento, migração e diferenciação celular e são importantes para processos como a cicatrização de feridas⁴⁴.

A principal função do colágeno tipo IV presente na membrana basal é a manutenção da integridade da junção dermoepidérmica, a fim de garantir sua funcionalidade e nutrição das células epidérmicas da camada basal. A redução do colágeno tipo IV (COL4) compromete a estabilidade mecânica do tecido cutâneo, além de interferir negativamente na regeneração tecidual, uma vez que a estabilidade mecânica é necessária para a síntese de novas moléculas⁴⁵. À medida que a pele envelhece, o COL4 também é reduzido⁴⁶.

A decorina (DCN) é um membro da pequena família de proteoglicanos ricos em leucina (SLRP) e é um fator chave no processo de fibrilogênese do colágeno⁴⁷. Além da fibrilogênese do colágeno, as SLRPs desempenham papéis importantes na modulação do fator de crescimento e na regulação direta do crescimento celular. Os efeitos da ausência de decorina na pele incluem uma pele incomumente frouxa e frágil com afinamento dérmico visível no exame microscópico⁴⁸.

Assim, ao diminuir a expressão dos miRNAs que silenciam a expressão gênica dessas proteínas importantes, **Agen** pode apresentar um resultado relevante como agente antienvhecimento.

1.2. Proteínas da Matriz Extracelular

Fragmentos de pele humana de blefaropatia de pacientes saudáveis com idade entre 45-60 anos foram tratados por 72 horas com 10mg / cm² de uma fórmula contendo 2% de **Agen** ou seu placebo. Secções de 10µm foram coletadas, incubadas com anticorpos primários para Anti-Colágeno 1 (Abcam; ab90395) ou Anti-Colágeno3 (Santa Cruz Biotechnology; sc 271249) ou Anti-Colágeno 4 (Sigma; SAB4500382) ou Anti-Decorina (Abcam; ab151988) ou Anti-Fibronectina (Santa Cruz Biotech; sc 69681) ou Anti-Fibrilina-1 (Santa Cruz Biotech; sc20084) ou Anti-Fibulina-5 (Santa Cruz Biotech; sc23062), seguido de incubação com anticorpo secundário (Invitrogen A11001) e contra-coloração por DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindole, marcador de DNA).

A intensidade de fluorescência emitida pelos anticorpos específicos utilizados no tratamento das secções foi analisada com o Microscópio de Fluorescência (Leica-DM1000 / LAS-Leica Application Suite). As imagens obtidas foram tratadas com o software ImageJ® para quantificação dos pixels gerados pela proteína alvo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA e teste de Dunnett. Os grupos estudados são considerados estatisticamente significativos quando o valor de p é menor ou igual a 0,05.

Em comparação ao placebo, **Agen** aumentou a produção de colágeno tipo I, tipo III e tipo IV em 136%, 1223% e 45%, respectivamente. **Agen** também elevou a produção de decorina em 138% e de fibronectina em 102% em comparação com o placebo (Figura 5).

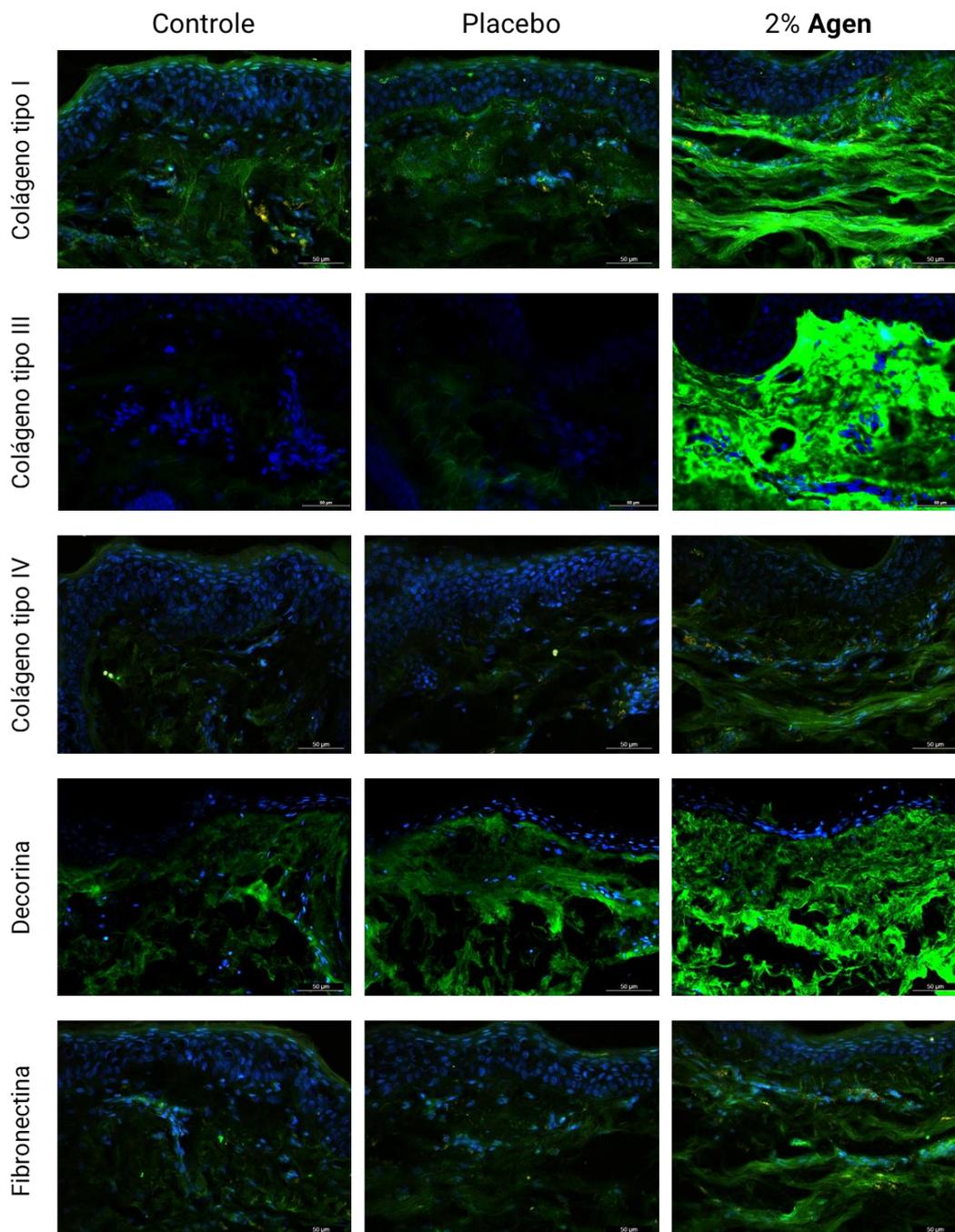


Figura 5: Avaliação por imunofluorescência de colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, decorina e fibronectina (verde) e contra-coloração por DAPI (azul, marcador de núcleos celulares). Imagens de microscópio com ampliação de 40x.

Além desses biomarcadores **Agen**, em comparação ao seu placebo, foi capaz de aumentar a produção de fibrilina-1 (FB1) e fibulina-5 em 39% e 33%, respectivamente (Figura 6). A fibrilina (FB) também é uma glicoproteína essencial para a formação de microfibrilas, que por sua vez formam fibras que conferem a aparência elástica da pele e servem de suporte para tecidos mais rígidos. Além disso, o FB1 desempenha um papel importante na manutenção da arquitetura da derme papilar⁴⁹. Por outro lado, a fibulina-5 também é uma glicoproteína essencial para a elasticidade do tecido cutâneo, capaz de regular a deposição de elastina. Localizada na matriz extracelular,

a fibulina-5 age sinergicamente com a LOXL1 (importante enzima na renovação das fibras elásticas) e a tropoelastina (precursora da elastina) para a formação eficiente de ligações cruzadas e, como consequência, culminando na formação de estabilização das fibras elásticas⁵⁰.

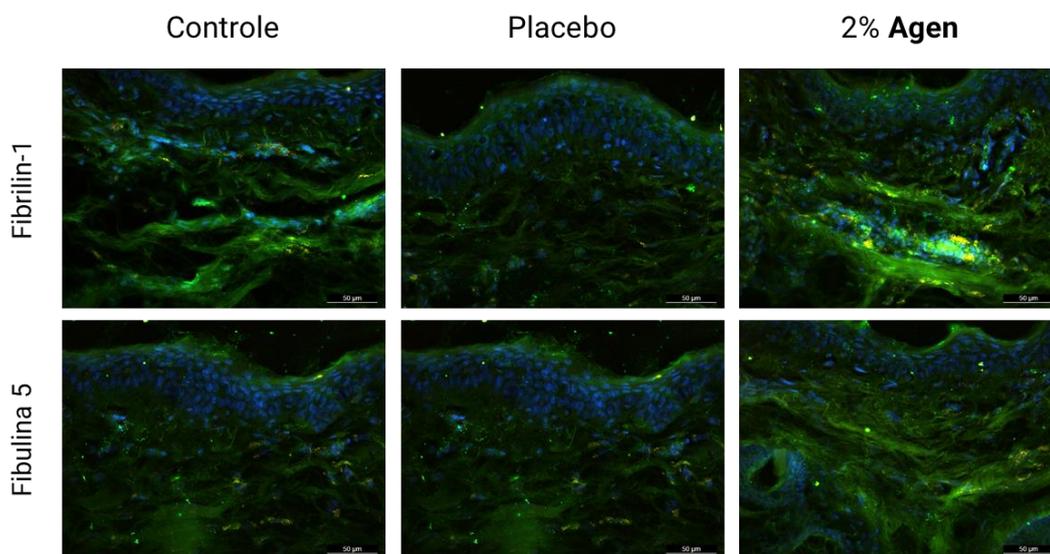


Figura 6: Avaliação por imunofluorescência de fibrilina-1 e fibulina-5 (verde) e contra-coloração por DAPI (azul, marcador de núcleos celulares). Imagens de microscópio com ampliação de 40x.

1.3. Fator de Crescimento Epidermal

Seguindo o mesmo protocolo usado para a avaliação da matriz extracelular, fragmentos de pele humana de blefaropatia de pacientes saudáveis com idade entre 45 e 60 anos foram tratados por 72 horas com 10mg / cm² de fórmula contendo 2% de **Agen** ou seu placebo. Secções de 10µm foram coletadas, incubadas com anticorpos primários para Anti-EGF (Santa Cruz Biotech; sc1341), seguidas de incubação com anticorpo secundário (Invitrogen A11001) e contra-coloração com DAPI (4'-6-Diamidino-2 -Fenilindole, marcador de DNA).

A intensidade de fluorescência emitida pelos anticorpos específicos utilizados no tratamento das secções foi analisada com o Microscópio de Fluorescência (Leica-DM1000 / LAS-Leica Application Suite). As imagens obtidas foram tratadas com o software ImageJ® para quantificação dos pixels gerados pela proteína alvo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA e teste de Dunnett. Os grupos estudados são considerados estatisticamente significativos quando o valor de p é menor ou igual a 0,05.

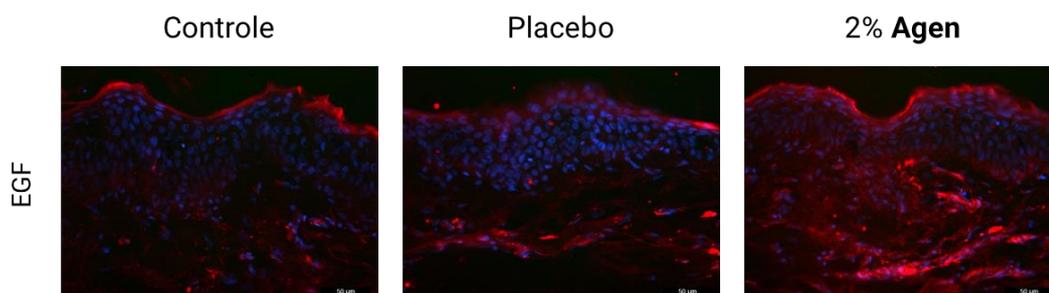


Figura 7: Avaliação por imunofluorescência de EGF (vermelho) e contra-coloração por DAPI (azul, marcador de núcleos celulares). Imagens de microscópio com ampliação de 40x.

Os resultados obtidos por **Agen** mostraram que o tratamento foi capaz de aumentar a produção de EGF em 232% em comparação com o placebo (Figura 7). Como o EGF, um importante regulador do crescimento e diferenciação celular, diminui com a idade, esses dados não apenas corroboram os achados do miRNA, mas também sugerem que **Agen** pode regular positivamente a proliferação e diferenciação celular e, portanto, apresenta uma importante eficácia antienvhecimento.

1.4. Produção de Colágeno-I comparado a ativos cosméticos clássicos

Fragmentos de pele humana de blefaroplastia de cinco pacientes saudáveis com idade entre 45-60 anos foram tratados por 72 horas com 10 mg/cm² com fórmulas contendo 2% de **Agen**, 10% ácido ascórbico, 5% de ácido glicólico, 5% coenzima Q10, 4% de niacinamida ou 0,1% de retinol. Secções de 10µm foram coletadas, incubadas com anticorpos primários para Anti-Colágeno 1 (Abcam; ab90395) seguido de incubação com anticorpo secundário (Invitrogen A11001) e contra-coloração por DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindole, marcador de DNA).

A intensidade de fluorescência emitida pelos anticorpos específicos utilizados no tratamento das secções foi analisada com o Microscópio de Fluorescência (Leica-DM1000 / LAS-Leica Application Suite). As imagens obtidas foram tratadas com o software ImageJ® para quantificação dos pixels gerados pela proteína alvo.

A Figura 8 demonstra a síntese de colágeno-I nas diferentes amostras em comparação da formulação placebo.

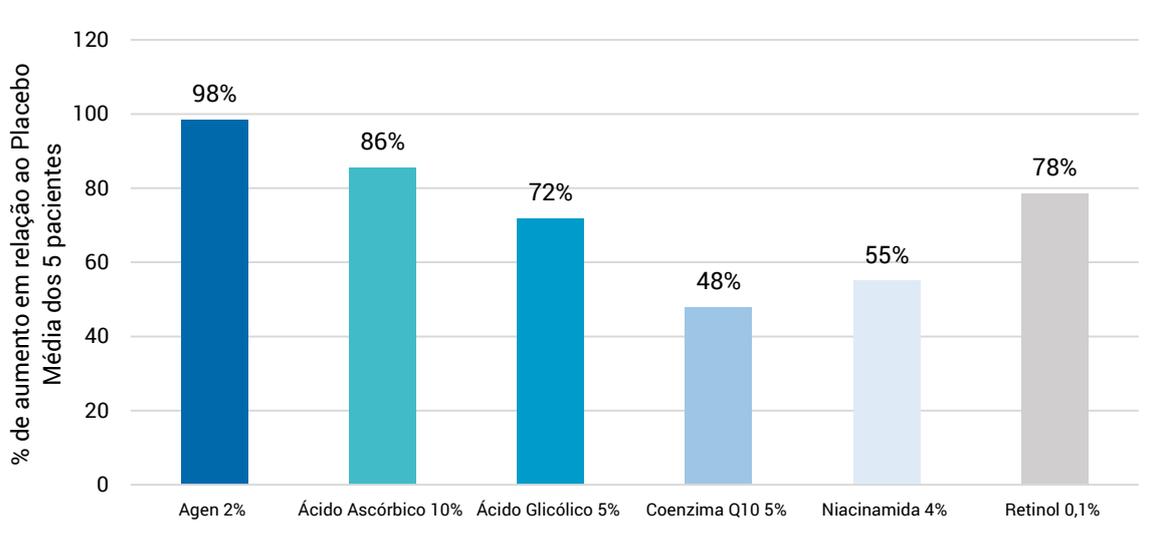


Figura 8: Comparativo da eficácia do Agen 2% na síntese de colágeno-1 com diferentes ativos anti-idade.

Agen apresentou eficácia superior no estímulo de colágeno-1 quando comparado a diferentes ativos comumente utilizados no mercado cosmético demonstrando seu potencial na melhora da firmeza, elasticidade e redensificação da pele.

2. Eficácia In Vivo

A avaliação clínica do **Agen** foi realizada em dois estudos de eficácia descritos abaixo:

- **Estudo 1:** 44 mulheres, com idades entre 40 e 60 anos, com sinais de envelhecimento facial (rugos profundas e linhas finas) avaliaram uma formulação contendo 2% de **Agen** ou placebo. Os produtos foram aplicados duas vezes ao dia no rosto e os voluntários foram analisados no dia 0, 14, 28 e 56. Para firmeza e elasticidade, utilizou-se um Cutometer® MPA 580 (Courage & Khazaka) na região periorbital, analisando o parâmetro R0 e R7, respectivamente. Para avaliação da espessura da pele, os voluntários foram submetidos à análise ultrassonográfica com o Voluson E®. Para avaliação do tom da pele, foram aplicados o Visia e a análise de imagens pelo software Image Pro Plus.
- **Estudo 2:** 23 mulheres, com idades entre 45 e 65 anos, com sinais de envelhecimento facial (rugos profundas e linhas finas) avaliaram uma formulação contendo 2% de **Agen** ou placebo (meia face). Os produtos foram aplicados duas vezes ao dia no rosto e os voluntários foram analisados nos dias 0, 30, 60 e 90. As rugas e a textura da pele foram avaliadas por Primos® e VisiaCR®.

2.1. Estudo 1

A formulação contendo **Agen** proporcionou um aumento satisfatório nos valores dos parâmetros R0 e R7, o que indica melhora na firmeza e elasticidade da pele, respectivamente (Figura 9). De fato, existem diferenças significativas entre o placebo e **Agen** desde o D14 ($p < 0,05$). Como essas características na pele são proporcionadas por uma matriz extracelular saudável e funcional, é possível correlacioná-la com os dados *ex vivo* obtidos para todos os biomarcadores da MEC (colágeno tipo I, colágeno tipo IV, decorina, fibronectina, fibrilina-1 e fibulina-5). **Agen** demonstrou eficácia estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em melhorar a firmeza e elasticidade da região periorbital após 14, 28 e 56 dias de uso, enquanto o placebo não apresentou resultados significativos ($p > 0,05$) para esses parâmetros nos tempos experimentais.

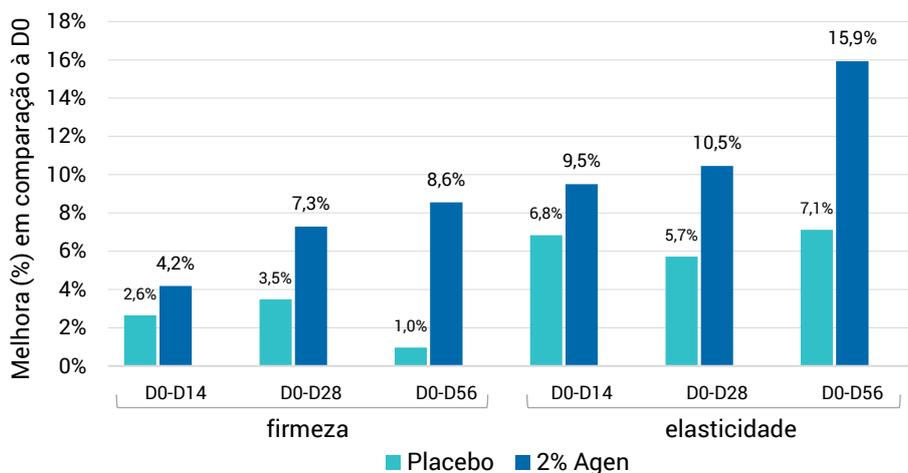


Figura 9: Efeito do **Agen** e do seu placebo na firmeza e elasticidade da pele facial.

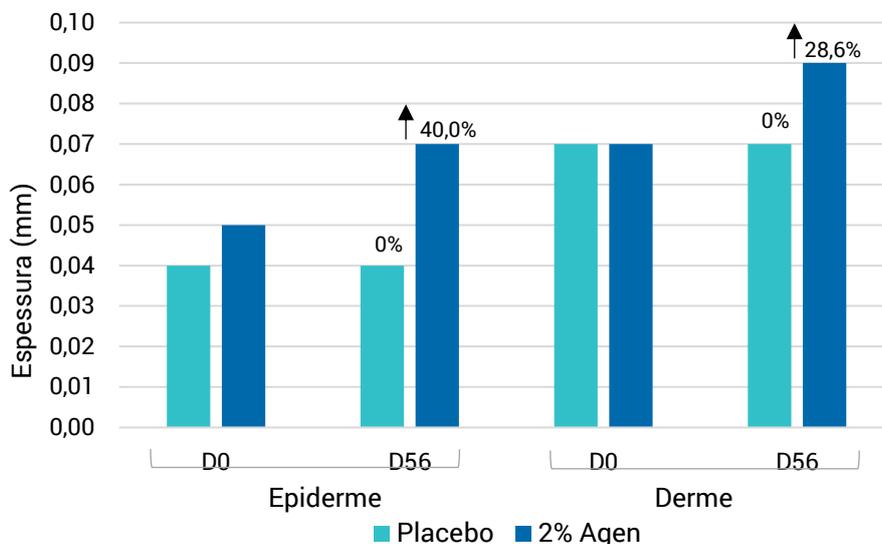


Figura 10: Efeito do **Agen** e do seu placebo na espessura da pele facial.

É importante notar também que **Agen** foi capaz de aumentar em 40% a espessura da epiderme (Figura 10), o que mostra que o EGF está, de fato, sendo ativado para estimular a proliferação celular de queratinócitos. Além disso, **Agen** aumentou a espessura da derme em cerca de 28% (Figura 10), o que também valida os resultados prévios da matriz extracelular obtidos pelos estudos *ex vivo*. Nesse caso, todos os resultados obtidos pelo **Agen** foram estatisticamente diferentes do D0 e do placebo ($p < 0,05$) que não mostraram diferença no D56.

Agen apresentou melhora de 4,58% até 22,4% (resultado máximo atingido) na uniformidade do tom da pele, após 56 dias de tratamento (Figuras 11 e 12), diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do placebo e D0 em todos os períodos avaliados. O placebo não foi estatisticamente diferente de D0 ($p < 0,05$) em todos os períodos avaliados.

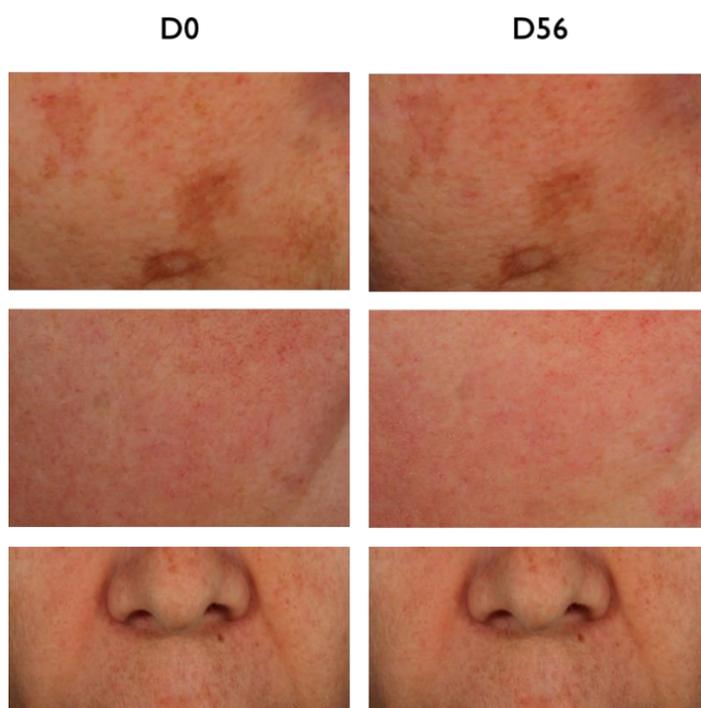


Figura 11: Efeito do **Agen** no tom da pele.

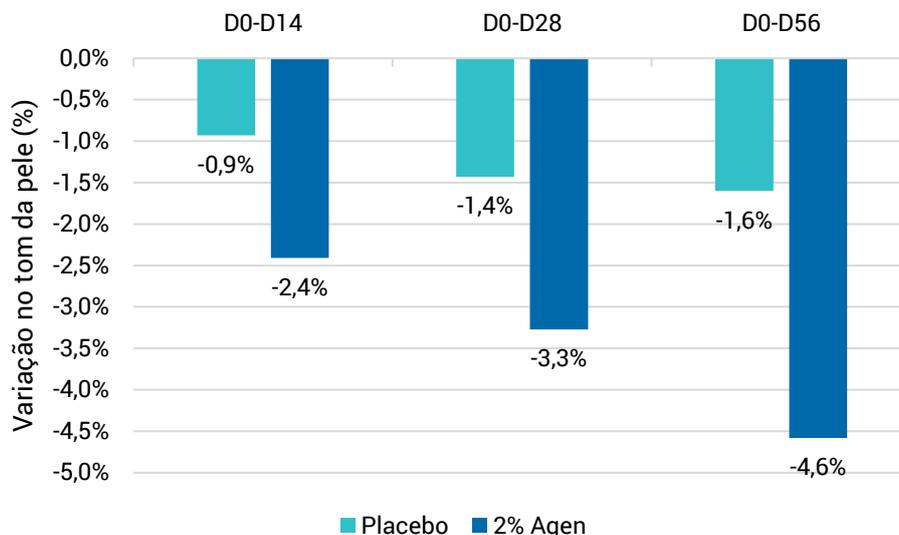


Figura 12: Efeito do **Agen** e seu placebo no tom da pele facial.

2.2. Estudo 2

É evidente o desempenho do **Agen** na redução de rugas na região periorbital dos voluntários que utilizaram fórmula contendo 2% por 60 dias observados pelo VisiaCR. Também é claro a sua eficácia na uniformização do tom da pele e manchas escuras, corroborando o estudo clínico anterior.

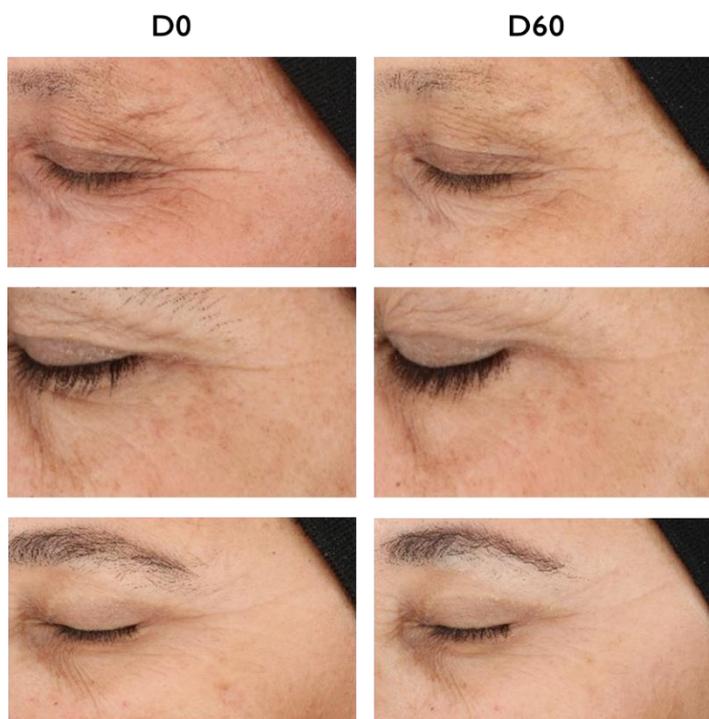


Figura 13: Efeito do **Agen** nas rugas periorbitais.

Já a análise por Primos® permitiu avaliar parâmetros como rugosidade (Sq), profundidade máxima de rugas (Smax) e profundidade média das rugas (Sz). Após 90 dias de uso, **Agen** reduziu significativamente a

rugosidade da pele em 13% até 32,4% (melhor resultado obtido). **Agen** também atuou reduzindo a profundidade máxima e média das rugas em 12,7% e 12,5%, chegando a apresentar reduções máximas de 31,6% e 31,1%, respectivamente.

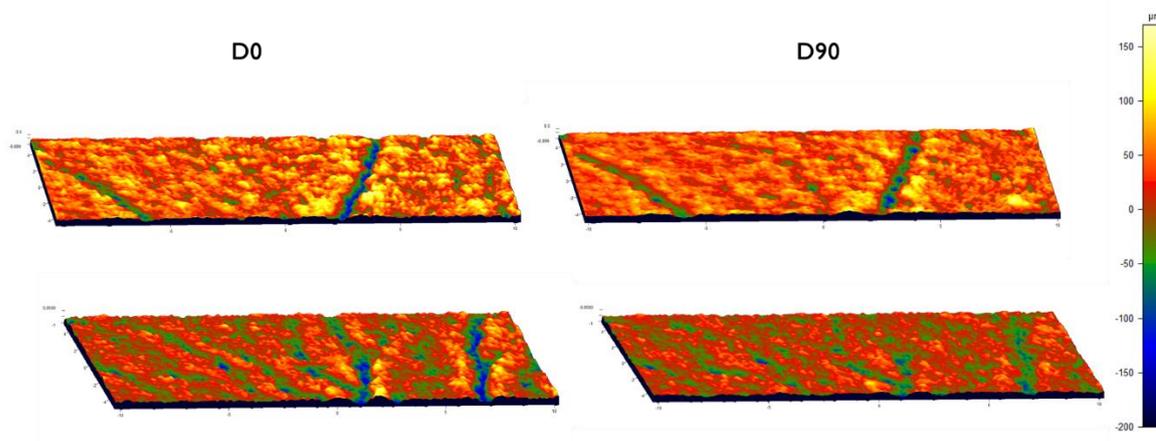


Figura 14: Imagens captadas pelo equipamento PRIMOS® para análise do relevo cutâneo (rugosidade, linhas de expressão e textura da pele), no início do estudo (D0) e após 90 (D90) dias de utilização de 2% de **Agen**. (Escala lateral em µm).

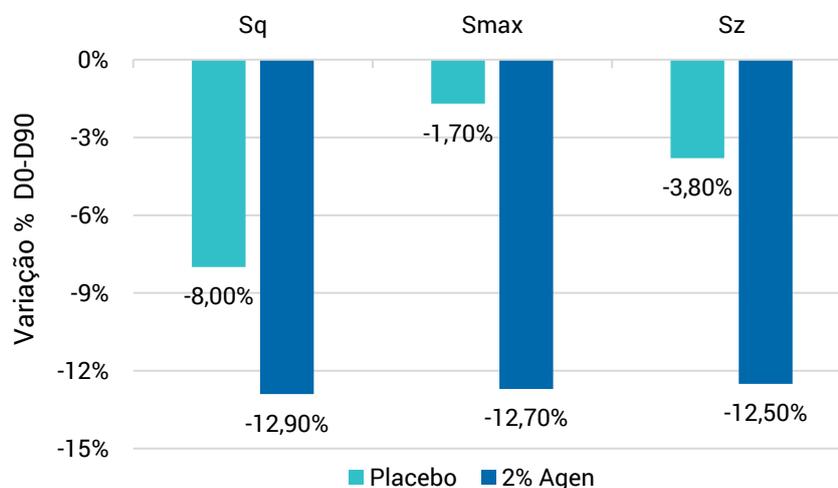


Figura 15: Variação percentual dos parâmetros Sq (rugosidade), Smax (profundidade máxima da ruga) e Sz (profundidade média da ruga) para **Agen** e Placebo no tempo experimentais D90 em relação a D0.

Aplicação

- Adicionar na fase oleosa entre 75-80°C
- pH: 3,0-7,0
- Emulsões e séruns com benefícios antienvhecimento

Estabilidade e Compatibilidade

- Pode ocorrer exsudação durante o prazo de validade. Homogeneizar o ingrediente sob agitação sem comprometimento da performance do produto.

Concentração de Uso

2% (p/p)

Referências Bibliográficas

1. Yaar, Mina. Clinical and histological features of intrinsic versus extrinsic skin aging. In: **Skin aging**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 9-21.
2. Makrantonaki, E; Zouboulis, C. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin. **Dermatology**, v. 214, n. 4, p. 352-360, 2007.
3. Hashizume, H. Skin aging and dry skin. **The Journal of dermatology**, v. 31, n. 8, p. 603-609, 2004.
4. Mccullough, JL.; Kelly, KM. Prevention and treatment of skin aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1067, n. 1, p. 323-331, 2006.
5. Ramos-e-Silva, M; Da Silva Carneiro, SC. Elderly skin and its rejuvenation: products and procedures for the aging skin. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 6, n. 1, p. 40-50, 2007.
6. Harris, MINC. Pele: do nascimento a maturidade. 1ª edição. São Paulo: SENAC, 2016.
7. Tobin DJ. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. **Chem Soc Rev**. 2006 Jan;35(1):52-67.
8. Ganceviciene, R *et al*. Skin anti-aging strategies. **Dermato-endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 308-319, 2012.
9. Dellambra, E; Dimri, GP. Cellular Senescence and Skin Aging. In: **Skin Aging Handbook**. 2008. p. 129-148.
10. Lasagni, C.; Seidenari, S. Echographic assessment of age-dependent variations of skin thickness: A study on 162 subjects. **Skin Research and Technology**, v. 1, n. 2, p. 81-85, 1995.
11. Ni, S *et al*. The correlation of healthy skin thickness and echogenicity with age, anatomic site and gender by high-frequency ultrasound. **Biomed Res**. 2016;special issue:S10–S15.
12. Reilly, DM; Lozano, J. Skin collagen through the lifestages: Importance for skin health and beauty. **Plastic and Aesthetic Research**, v. 8, 2021.
13. Cheng, W *et al*. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2524-2529, 2011.
14. Rong, YH *et al*. Quantification of type I and III collagen content in normal human skin in different age groups. **Zhonghua shao shang za zhi= Zhonghua shaoshang zazhi= Chinese journal of burns**, v. 24, n. 1, p. 51-53, 2008.
15. Liu, X *et al*. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 5, p. 1852-1856, 1997.
16. Ashapkin VV, Kutueva LI, Vanyushin BF. Aging as an Epigenetic Phenomenon. **Curr Genomics**. 2017 Oct;18(5):385-407.
17. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. **Sci Adv**. 2016 Jul 29; 2(7):e1600584.
18. Felsenfeld G. A brief history of epigenetics. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2014 Jan 1;6(1). pii: a018200.
19. Waddington, CH. The epigenotype. **Int Journal Epidem** 2011; 41(1): 10-13.
20. Saldanha, SN; Watanabe, LP. Epigenetics and Aging. In: **Epigenetics and Dermatology**. 2015. p. 379-406.
21. Tollefsbol TO (Ed.). Epigenetics of aging. **Springer Science & Business Media**, 2009.
22. Ranganathan K, Sivasankar V. MicroRNAs-Biology and clinical applications. **JOMFP** 2014; 18(2): 229.
23. Wang E. Noncoding RNA for presymptomatic diagnosis of age-dependent disease. In: Epigenetics of Aging. **Springer**, New York, NY, 2010. p. 177-188.
24. Gonzalo S. Epigenetic alterations in aging. **Journal of applied physiology** 2010; 109(2): 586-597.
25. Moskalev AA, Aliper AM, Smit-McBride Z, Buzdin A, Zhavoronkov A. Genetics and epigenetics of aging and longevity. **Cell Cycle**. 2014;13(7):1063-77.
26. Maes OC, An J, Sarojini H, Wu H, Wang E. Changes in MicroRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation. **J Cell Biochem**. 2008 Oct 15;105(3):824-34.

27. Li T, Yan X, Jiang M, Xiang L. The comparison of microRNA profile of the dermis between the young and elderly. **J Dermatol Sci.** 2016 May;82(2):75-83.
28. Walia M, Mann TS, Kumar D, Agnihotri VK, Singh B. Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic Activity of Essential Oil of Leaves of *Malus domestica* Growing in Western Himalaya (India). **Evid Based Complement Alternat Med.** 2012;2012:649727.
29. Guyot S, Marnet N, Sanoner P, Drilleau JF. Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. **J Agric Food Chem.** 2003 Oct 8;51(21):6240-7.
30. Ferretti G, Turco I, Bacchetti T. Apple as a source of dietary phytonutrients: bioavailability and evidence of protective effects against human cardiovascular disease. **Food and Nutrition Sciences** 2014; 5(13): 1234.
31. Crespy V, Aprikian O, Morand C, Besson C, Manach C, Demigné C, Rémésy C. Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. **J Nutr.** 2001 Dec;131(12):3227-30.
32. Li B, Li R, Yan W. Solubilities of phloretin in 12 solvents at different temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data** 2011; 56(4): 1459-1462.
33. Oresajo C, Stephens T, Hino PD, Law RM, Yatskayer M, Foltis P, Pillai S, Pinnell SR. Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. **J Cosmet Dermatol.** 2008 Dec;7(4):290-7.
34. Shin S, Kum H, Ryu D, Kim M, Jung E, Park D. Protective effects of a new phloretin derivative against UVB-induced damage in skin cell model and human volunteers. **Int J Mol Sci.** 2014 Oct 20;15(10):18919-40.
35. Jeong JH, Kim MB, Kim C, Hwang JK. Inhibitory effect of vitamin C on intrinsic aging in human dermal fibroblasts and hairless mice. **Food Sci Biotechnol.** 2017 Nov 22;27(2):555-564.
36. Gómez-Florit M, Monjo M, Ramis JM. Identification of quercitrin as a potential therapeutic agent for periodontal applications. **Journal of periodontology** 2014; 85(7): 966-974.
37. Jadoon S, Karim S, Bin Asad MH, Akram MR, Khan AK, Malik A, Chen C, Murtaza G. Anti-Aging Potential of Phytoextract Loaded-Pharmaceutical Creams for Human Skin Cell Longevity. **Oxid Med Cell Longev.** 2015;2015:709628.
38. Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. **Food Chem Toxicol.** 2008 Feb;46(2):409-20.
39. Bode AM, Ma WY, Surh YJ, Dong Z. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol. **Cancer Res.** 2001 Feb 1;61(3):850-3.
40. Chen CY, Chiu CC, Wu CP, Chou YT, Wang HM. Enhancements of skin cell proliferations and migrations via 6-dehydrogingerone. **J Agric Food Chem.** 2013 Feb 13;61(6):1349-56.
41. Imokawa G. Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of fibroblast-derived elastase. **Arch Dermatol Res.** 2008 Apr;300 Suppl 1:S7-20.
42. Gerber PA, Bühren BA, Schrupf H, Hevezi P, Bölke E, Sohn D, Jänicke RU, Belum VR, Robert C, Lacouture ME, Homey B. Mechanisms of skin aging induced by EGFR inhibitors. **Support Care Cancer.** 2016 Oct;24(10):4241-8.
43. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligel SE, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. **Am J Pathol.** 2006 Jun;168(6):1861-8.
44. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. **Curr Opin Cell Biol.** 2008 Oct;20(5):495-501.
45. Frede SC, Dionisio de Cabalier ME, Zaya A, Hliba E. Dermoepidermic junction: a selective, complex and vital barrier. **Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.** 2004;61(1):27-31.
46. Langton AK, Halai P, Griffiths CE, Sherratt MJ, Watson RE. The impact of intrinsic ageing on the protein composition of the dermal-epidermal junction. **Mech Ageing Dev.** 2016 Jun;156:14-6.
47. Kresse H, Schönherr E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **J Cell Physiol.** 2001 Dec;189(3):266-74.
48. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. **J Cell Biol.** 1997 Feb 10;136(3):729-43.
49. Gasser P, Arnold F, Peno-Mazzarino L, Bouzoud D, Luu MT, Lati E, Mercier M. Glycation induction and antiglycation activity of skin care ingredients on living human skin explants. **Int J Cosmet Sci.** 2011 Aug;33(4):366-70.
50. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross J Jr, Honjo T, Chien KR. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. **Nature.** 2002 Jan 10;415(6868):171-5.

51. Alcazar, o.; Cousins, s.w.; Marin-Castaño, m.e. MMP-14 and TIMP-2 overexpression protects against hydroquinone-induced oxidant injury in RPE: implications for extracellular matrix turnover. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.48, n.12, p.5662-5670, 2007.

As informações contidas nesta Literatura são fornecidas de boa fé. Recomendamos que nossos produtos sejam testados para se verificar a conveniência de seu uso antes de adotá-los a nível industrial. Estas informações não devem ser entendidas como concessão ou permissão para utilização de métodos ou composições cobertas por qualquer patente. É proibida a reprodução deste material sem autorização da **Chemyunion Ltda.**

SA: 14430/21