

**RAFAEL LUCAS DE ASSIS FERREIRA**

**O efeito da  $\beta$ -ciclodextrina na expressão de metaloproteinases de matriz, colágeno e no sistema antioxidante de fibroblastos dérmicos humanos *in vitro***

**BRASÍLIA, 2018**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**RAFAEL LUCAS DE ASSIS FERREIRA**

**O efeito da  $\beta$ -ciclodextrina na expressão de metaloproteínas de matriz, colágeno e no sistema antioxidante de fibroblastos dérmicos humanos *in vitro***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin**

**BRASÍLIA**  
**2018**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**RAFAEL LUCAS DE ASSIS FERREIRA**

**O efeito da  $\beta$ -ciclodextrina na expressão de metaloproteinases de matriz, colágeno e no sistema antioxidante de fibroblastos dérmicos humanos *in vitro***

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Maria de Fátima Borin (Presidente)**  
**Universidade de Brasília**

---

**Profa. Dra. Angélica Amorin Amato**  
**Universidade de Brasília**

---

**Profa. Dra. Caroline Lourenço de Lima**  
**Universidade de Brasília**

---

**Dra. Mariella Guimarães Lacerda (Suplente)**  
**Universidade de Brasília**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde, sabedoria e por me guiar até aqui.

Aos meus pais Geraldo e Célia, e à minha irmã Larissa, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças para correr atrás dos meus sonhos.

A toda minha família e amigos que sempre me deram suporte e me apoiaram em todas as etapas da vida.

À minha orientadora, Dra. Maria de Fátima Borin, que desde a graduação eu tenho o privilégio de conviver e aprender a cada dia mais. Obrigado pelo carinho, paciência, e dedicação. Obrigado por sempre acreditar em mim.

Aos professores e técnicos do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL) pelos ensinamentos e pelo apoio e ajuda na realização da pesquisa.

Aos amigos e colegas de laboratório Adria, Michelly, Dani, Laíza, Manuel, Carolina, Cíntia, Simone, Palloma, Paloma, Hanna, Henrique, e todos do FARMOL que me ofereceram uma ajuda preciosa durante toda a realização do projeto, e que me deram forças nos momentos de dificuldade. Por toda dedicação, companheirismo e cumplicidade.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro a este projeto.

À FAPDF pelo apoio financeiro na apresentação de uma parte deste trabalho no congresso mundial de Farmácia em Glasgow, Reino Unido.

À empresa Rochette – France pela doação das ciclodextrinas utilizadas neste estudo, e ao Hospital Universitário de Brasília pela doação de reagentes.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Ferreira, Rafael Lucas de Assis. O efeito da  $\beta$ -ciclodextrina na expressão de metaloproteinases de matriz, colágeno e no sistema antioxidante de fibroblastos dérmicos humanos *in vitro*. Brasília, 2018. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília.

O envelhecimento da pele é determinado por fatores genéticos e ambientais, sendo estes últimos principalmente associados à alta exposição à luz UV e também a outros xenobióticos. No processo de envelhecimento da pele, encontramos elevada expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) associada à baixa produção biossintética de proteínas estruturais da pele, como o colágeno. As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, frequentemente usados como carreadores de fármacos e ativos cosméticos, e que são bem conhecidas como depletoras de colesterol da membrana plasmática das células. Estudos anteriores demonstraram a capacidade do colesterol em agir como segundo mensageiro intracelular, diminuindo a expressão de MMP. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e da 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (2-HP- $\beta$ -CD) na expressão de genes relacionados ao processo de envelhecimento da pele e no estado redox de fibroblastos dérmicos humanos *in vitro*. As células (CCD1059Sk e HFF-1) foram cultivadas e tratadas com diferentes concentrações de  $\beta$ -CD ou 2-HP- $\beta$ -CD e a expressão gênica foi avaliada por RT-qPCR. Os resultados demonstraram a capacidade da  $\beta$ -CD, de reduzir a expressão gênica de *COL1A1* e *TIMP-1*. Uma expressão aumentada de *MMP-14* pôde ser observada nas células tratadas com  $\beta$ -CD ou 2-HP- $\beta$ -CD, sendo que a  $\beta$ -CD também provocou um aumento na expressão dos genes da *MMP-2*, *MMP-3* e *MMP-9*. O ensaio de zimografia foi realizado para verificar o efeito das CDs na atividade de MMP-2, entretanto nenhum resultado significativo foi encontrado. Apesar das CDs não provocarem um aumento do estresse oxidativo intracelular, o tratamento das células com  $\beta$ -CD ou 2-HP- $\beta$ -CD, em todas as concentrações testadas, causou uma redução da atividade da catalase, uma importante enzima antioxidante. Os resultados do ensaio para avaliar a liberação de lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular mostraram uma perda significativa da integridade da membrana celular. Em conclusão, os resultados deste trabalho sugerem que as CDs não são adjuvantes farmacêuticos completamente inertes e que estas podem influenciar as bases moleculares do processo de envelhecimento da pele.

**Palavras-chave:** ciclodextrinas, envelhecimento da pele, MMP, colágeno, fibroblastos, catalase.

## ABSTRACT

Ferreira, Rafael Lucas de Assis. The effect of  $\beta$ -cyclodextrin on matrix metalloproteinases expression, collagen and on the antioxidant system of human dermal fibroblasts *in vitro*. Brasília, 2018. Dissertation. Pharmaceutical Science – Faculty of Health Sciences – University of Brasilia.

Skin aging is determined by genetics and environmental factors, which is mainly associated to high UV and other xenobiotic exposures. On the skin aging process, we can find high matrix metalloproteinases (MMP) expression associated to lower biosynthetic production of skin structural proteins such as collagen. Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides, often used as drug or cosmetic ingredients carriers, and that are known as cell cholesterol depletors. Previous studies have demonstrated the ability of cholesterol to act as intracellular second messenger decreasing MMP expression. In this context, the goals of this study was to evaluate the effect of  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (2-HP- $\beta$ -CD) on the expressions of genes related to skin aging process as well as on the redox status in human dermal fibroblasts *in vitro*. Cells (CCD1059Sk and HFF-1) were cultured and treated with different concentrations of  $\beta$ -CD or 2-HP- $\beta$ -CD and gene expression was assessed by RT-qPCR. Our results demonstrated the ability of  $\beta$ -CD, at different concentrations, to decrease *COL1A1* and *TIMP-1* gene expression. An increased *MMP-14* expression was observed in cells treated with  $\beta$ -CD and 2-HP- $\beta$ -CD and  $\beta$ -CD also caused a rise on *MMP-2*, *MMP-3* and *MMP-9* gene expression. The zymography test was performed to verify the effect of CDs on MMP-2 activity, however no significant result was found. Although CDs did not cause an increase in intracellular oxidative stress, treatment of  $\beta$ -CD or 2-HP- $\beta$ -CD cells at any the tested concentrations caused a reduction in the activity of catalase, an important antioxidant enzyme. Evaluation of lactate dehydrogenase (LDH) release suggested a significant loss of cell membrane integrity. In conclusion, the results of this work suggest that CDs are not completely inert pharmaceutical adjuvants, and, they may have an influence on the molecular basis of skin aging process.

**Keywords:** cyclodextrins, skin aging, MMP, collagen, fibroblasts, catalase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele humana.....	1
Figura 2. Ativação da via de sinalização intracelular de MAPK provocada por EROs.....	4
Figura 3. Estrutura química das moléculas de $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD).....	8
Figura 4. Análise da citotoxicidade e viabilidade celular das soluções de $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em fibroblastos humanos CCD1059Sk e HFF-1.....	21
Figura 5. Avaliação da integridade do RNA extraído dos fibroblastos CCD1059Sk e HFF-1 tratados ou não com as soluções de $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	23
Figura 6. Curva padrão do gene COL1A1.....	23
Figura 7. Análise da expressão relativa do RNAm do COL1A1 em fibroblastos humanos CCD1059Sk e HFF-1 tratados com soluções de $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações.....	25
Figura 8. Análise da expressão relativa do RNAm do TIMP-1 em fibroblastos humanos CCD1059Sk e HFF-1, tratados com soluções de $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações.....	26
Figura 9. Análise da expressão relativa do RNAm da MMP-14 em fibroblastos humanos CCD1059Sk e HFF-1, tratados com soluções de $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações.....	27
Figura 10. Análise da expressão relativa do RNAm de A) MMP-1, B) MMP-2, C)MMP-3 e D) MMP-9 em fibroblastos humanos CCD1059Sk, tratados com soluções de $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações.....	28
Figura 11. Avaliação da atividade de metaloproteinase 2 por zimografia.....	29
Figura 12. Porcentagem de atividade de MMP-2.....	30
Figura 13. Efeito das soluções de $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em fibroblastos humanos CCD1059Sk.....	31
Figura 14. Efeito das soluções de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em fibroblastos humanos CCD1059Sk na atividade de catalase.....	32



Figura 15. Efeito das soluções de $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em fibroblastos humanos CCD1059Sk na liberação da enzima LDH.....	33
---	----

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Sequência dos primers de COL1A1, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-14, TIMP-1 e GAPDH usados nos ensaios de RT-qPCR.....	16
Tabela 2. Pureza e concentração final do RNA total extraído das células CCD1059Sk tratadas ou não com as soluções de $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	22
Tabela 3. Pureza e concentração final do RNA total extraído das células HFF-1 tratadas ou não com as soluções de $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
AP-1	Proteína Ativadora 1
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina
CAT	Catalase
CCD1059Sk	Linhagem de fibroblastos da pele de humanos
CDs	Ciclodextrinas
CGTase	Amilase ciclodextrina glicosiltransferase
COL1A1	Colágeno tipo I alfa-1
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CTRL	Grupo controle
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DCFoxi	2',7'-diclorofluoresceína oxidada
DEPC	Solução de dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E	Eficiência
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
F	<i>Primer forward</i> (sense)
FARMOL	Laboratório de Farmacologia Molecular
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HaCaT	Queratinócitos Humanos Imortalizados
HFF-1	Fibroblastos humanos (Human Foreskin Fibroblast) imortalizados
2-HP- $\beta$ -CD	2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
HT1080	Linhagem celular de fibrosarcoma
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
JNK	Jun quinase
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno

MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	RNA mensageiro
MT-MMP	Metaloproteinase de matriz do tipo membrana
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
M $\beta$ CD	Metil- $\beta$ -ciclodextrina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singleto
$\text{O}_2^-$	Ânion radical superóxido
OH $\cdot$	Radical hidroxila
PBS	Tampão fostato de sódio e potássio, 1M, pH 7,4, com 0,8% de NaCl e 0,02% de KCl
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomas
R	<i>Primer reverso</i> (antisense)
RNA <sub>t</sub>	RNA total
RT	Transcriptase Reversa
RT-qPCR	PCR em tempo real quantitativa
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio – Gel de Poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutase
TA	Temperatura Ambiente
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento $\beta$
TIMP-1	Inibidores fisiológicos de MMP
T <sub>m</sub>	Temperatura de <i>melting</i>
UV	Radiação Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>ii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. A pele e o envelhecimento cutâneo .....	1
1.2. Metaloproteinases de matriz .....	5
1.3. Ciclodextrinas.....	7
1.3.1. A membrana plasmática e a importância das cavéolas para sua estrutura e funcionalidade .....	9
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1. Objetivo geral .....	12
2.2. Objetivos específicos .....	12
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
3.1. Cultura de células.....	13
3.2. Preparo das soluções de $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina .....	13
3.3. Avaliação da citotoxicidade das soluções de $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina em cultura de fibroblastos.....	13
3.4. Extração de RNA e validação dos primers para quantificação da expressão gênica de <i>MMP-1</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-9</i> , <i>MMP-3</i> , <i>MMP-14</i> , <i>TIMP-1</i> e colágeno tipo 1 ( <i>COL1A1</i> ) por RT-qPCR.....	14
3.5. Avaliação da atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9 por zimografia .....	18
3.6. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por fluorescência.....	19
3.7. Avaliação da atividade da catalase.....	19
3.8. Avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase .....	20
3.9. Análise estatística.....	20
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Avaliação da citotoxicidade de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em fibroblastos dérmicos humanos (CCD1059Sk e HFF-1).....	21
4.2 Extração de RNA e validação dos primers de <i>MMP-1</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-9</i> , <i>MMP-3</i> , <i>MMP-14</i> , <i>TIMP-1</i> e colágeno tipo 1 ( <i>COL1A1</i> ) para quantificação da expressão gênica por RT-qPCR.....	21
4.2.1. Pureza e integridade do RNA extraído dos fibroblastos dérmicos humanos.....	21
4.2.2. Validação dos primers de <i>COL1A1</i> , <i>MMP-1</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-9</i> , <i>MMP-3</i> , <i>MMP-14</i> e <i>TIMP-1</i> .....	23
4.3 Análise da expressão gênica do <i>COL1A1</i> , <i>TIMP-1</i> e <i>MMP-14</i> nas células tratadas com soluções de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	24
4.4 Análise da expressão gênica de <i>MMP-1</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-3</i> e <i>MMP-9</i> em fibroblastos HFF-1 tratados com soluções de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	27
4.5 Avaliação da atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9 em células com soluções de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em diferentes concentrações.....	29
4.6 Efeito das soluções de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina na geração de espécies reativas de oxigênio por fluorescência.....	30
4.7 Avaliação da atividade de catalase.....	31

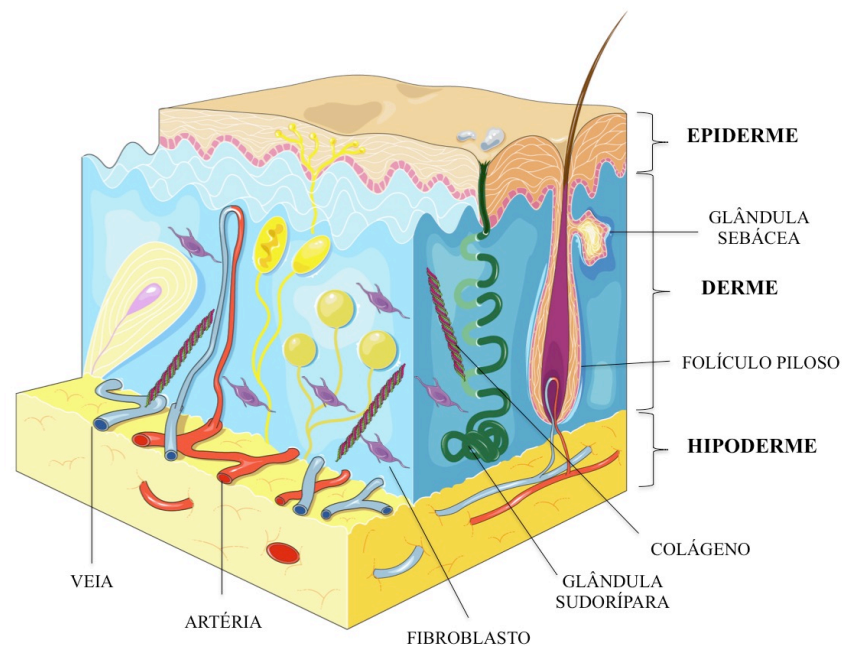
4.8	Análise da liberação de LDH pelos fibroblastos dérmicos humanos CCD1059Sk tratados com $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. ....	32
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.</b> ....	<b>34</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>43</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A pele e o envelhecimento cutâneo

A pele, considerada o maior órgão visível do corpo humano, atua como a primeira barreira efetiva contra os agentes xenobióticos presentes no meio ambiente e que possivelmente causam danos ao nosso organismo. Além de atuar contra a invasão de agentes patogênicos, que podem ser físicos, químicos ou microbiológicos, a pele saudável ajuda a manter o equilíbrio dos líquidos do corpo e também a sua temperatura (Zaidi e Lanigan, 2010; Lai-Cheong e McGrath, 2013). Ela é composta basicamente por três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme, além de estruturas especializadas como os folículos pilosos, as glândulas sudoríparas, apócrinas e écrinas, e as glândulas sebáceas (Haake et al., 2001; Pérez-Sánchez et al., 2018). A estrutura da pele está representada na figura 1.



**Figura 1. Estrutura da pele humana.** Esta imagem foi criada utilizando o website da *Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com>) com licença autorizada por *Creative Commons Attribution 3.0* ([www.creativecommons.org/licenses/by/3.0/](http://www.creativecommons.org/licenses/by/3.0/)).

A epiderme é a camada mais superficial da pele, que pode ser dividida principalmente entre estrato córneo e epiderme viável. O estrato córneo, mais externo, é composto por corneócitos, células sem núcleo e por organelas citoplasmáticas. Além disto, ele é rico em lipídeos e colesterol, o que confere a primeira barreira ao ambiente externo. Já a epiderme viável, ainda não-vascularizada, e cuja nutrição é totalmente dependente da derme, é



constituída por epitélio estratificado pavimentoso, no qual podemos encontrar queratinócitos, em grande quantidade, e também outros tipos celulares como melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans (Haake et al., 2001; Al-Nuaimi et al., 2014; Tobin, 2017). A derme é composta por tecido conjuntivo vascularizado, cuja rede de vasos é importante para a nutrição e termorregulação da pele. A matriz extracelular deste tecido conjuntivo é rica em fibras de colágeno, que representam cerca de 75% do peso seco da derme, fibras elásticas, e substância fundamental, composta principalmente por proteoglicanos e glicoproteínas. O colágeno, complexo proteico que apresenta configuração de tripla-hélice, e as fibras elásticas são componentes essenciais para dar estrutura à pele, conferindo-a força e suporte. Em relação aos seus componentes celulares, a derme contém fibroblastos, mastócitos, linfócitos, células dendríticas e histiócitos, sendo a principal função dos fibroblastos a produção e renovação da matriz extracelular (Haake et al., 2001; Hwang et al., 2011; Kolarsick et al., 2011). Logo abaixo da derme encontra-se a hipoderme, também chamada de tecido subcutâneo, composta por tecido adiposo e cuja espessura pode variar de indivíduo para indivíduo de acordo com seu estado nutricional (Venus et al., 2011; Lai-Cheong e McGrath, 2013).

O processo de envelhecimento da pele pode ser determinado tanto por fatores intrínsecos, também chamados de fatores genéticos ou cronológicos, quanto por fatores extrínsecos, que são aqueles influenciados por fatores externos, como exposição ambiental e comportamento social e nutricional do indivíduo. Em ambos os processos ocorre uma significativa alteração dos componentes da matriz extracelular da derme que contribuem para mudanças em sua estrutura e, conseqüentemente, para o aparecimento dos sinais clínicos do envelhecimento cutâneo, como o surgimento de rugas, linhas de expressão e flacidez (Yaar e Gilchrist, 1998; Tigges et al., 2014; Tobin, 2017).

O envelhecimento intrínseco está relacionado à genética, senescência celular, capacidade reduzida de proliferação dos fibroblastos na pele e também da produção biossintética das proteínas estruturais da pele, como o colágeno. Com o passar do tempo, as células vão envelhecendo e fenômenos como a redução da capacidade de reparo ao DNA, perda dos telômeros, mutações do DNA celular e mitocondrial, e aumento da frequência de anormalidades cromossômicas vão acontecendo naturalmente. Apesar de todos estes fenômenos contribuírem para a senescência, a teoria mais discutida para o mecanismo de envelhecimento intrínseco da pele é a teoria do envelhecimento dos radicais livres, a qual prediz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes do metabolismo aeróbico mitocondrial. (Liochev, 2013; Kammeyer e Luiten, 2015). A maioria das EROs produzidas intracelularmente são originadas na cadeia respiratória mitocondrial em

consequência da fosforilação oxidativa de NADH ou FADH. Neste processo, ocorre a geração de uma energia potencial na membrana interna da mitocôndria, a qual é utilizada para fosforilar o ADP através da enzima F1-F0 ATPase. Desta forma, os elétrons originados na fosforilação de NADH e ADP podem reagir diretamente com o oxigênio, ou outros aceptores de elétrons, gerando as EROs ou radicais livres (Balaban et al., 2005).

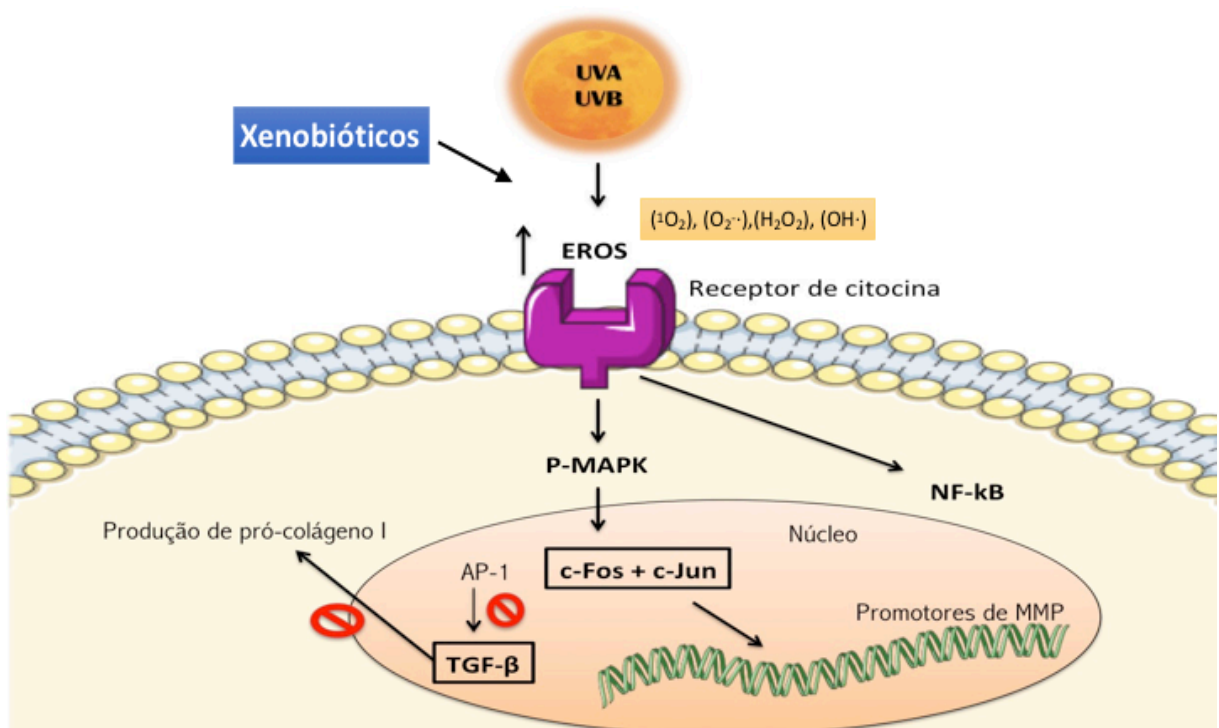
As EROs são capazes de provocar mutações no DNA, modificando assim a estrutura e função de proteínas, danos aos carboidratos e também em moléculas de lipídeos, causando nestas a peroxidação lipídica (Calleja-Agius et al., 2013; Liochev, 2013). Desta forma, a pele, neste tipo de envelhecimento, acaba perdendo algumas de suas funções, como a alta capacidade de se proliferar, a habilidade de produzir novas fibras de colágeno e, portanto, de renovar sua matriz extracelular. Concomitantemente, acontece o aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) na pele, que são enzimas que degradam colágeno e fibras elásticas importantes para manter a estrutura de uma pele saudável (Jenkins, 2002; Zouboulis e Makrantonaki, 2011; Mine et al., 2008; Pittayapruek et al., 2016).

Os fatores extrínsecos, ou ambientais, que causam o envelhecimento da pele, podem ser representados pela exposição frequente à radiação ultravioleta (UV) proveniente da luz solar, pela poluição ambiental, pelo tabagismo, alcoolismo e também por uma má nutrição do indivíduo (Clark et al., 2008; Pittayapruek et al., 2016). A exposição crônica ao sol, e à radiação UV, provoca o efeito conhecido como fotoenvelhecimento. Esta radiação é, dentre todos os fatores ambientais, a que mais contribui para o envelhecimento da pele devido aos seus efeitos potencialmente deletérios, como danos diretos ao DNA das células, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e estimulação de um processo inflamatório na pele. Além disso, os raios UV que atingem as camadas mais profundas da pele, como a derme, conseguem provocar a degradação do colágeno existente, principalmente o do tipo I e II (Pillai et al., 2005; Quan et al., 2009; Tobin, 2017).

A faixa A da radiação ultravioleta (UVA), que compreende os comprimentos de onda de 320 a 340 nm, e a faixa B da radiação ultravioleta (UVB), que compreende os comprimentos de onda de 290 a 320 nm, são capazes de produzir danos à pele, principalmente dano oxidativo. A indução do estresse oxidativo causado pela luz UV na pele pode levar a um comprometimento genético, o qual pode ser representado pela superregulação da atividade do fator de transcrição AP-1 e, conseqüentemente, aumento da expressão de MMP (Tewari et al., 2014; Parkinson et al., 2015).

Quando em contato com a pele, a radiação UV induz a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^-$

$\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) (Chiang et al., 2013). As EROs atuam intracelularmente como segundos mensageiros, aumentando a fosforilação, e por conseguinte a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). O aumento da atividade de MAPK, através da ativação das vias mediadas por ERK, p38 e JNK, estimulam a expressão das proteínas mensageiras c-Jun e c-Fos, que quando combinadas formam o fator de transcrição AP-1, o qual desempenha um importante papel na regulação transcricional de MMP (Figura 2) (Kim et al., 2011; Chiang et al., 2013; Park et al., 2014; Pittayaprupek et al., 2016).



**Figura 2.** Ativação da via de sinalização intracelular de MAPK provocada por EROs. Adaptado de Pittayaprupek et al., 2016.

Para se defender do aumento da produção de EROs, e evitar a instalação de um processo de estresse oxidativo, as células possuem um sistema antioxidante próprio, composto por moléculas antioxidantes, que interagem com as espécies reativas de oxigênio geradas e impedem os seus efeitos deletérios (Kohen e Gati, 2000). Estes antioxidantes podem ser classificados como não-enzimáticos, como o  $\alpha$ -tocoferol, a ubiquinona, o  $\beta$ -caroteno, o ascorbato e a glutathiona, e enzimáticos, representados pela ação das enzimas glutathiona peroxidase, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Finkel e Holbrook, 2000; Bickers e Athar, 2006). A SOD é responsável pela conversão do ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e a CAT atua convertendo o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e

oxigênio molecular ( $O_2$ ) (Alfonso-Prieto et al., 2009; Treiber et al., 2012). Com o envelhecimento, entretanto, esse sistema antioxidante natural começa a falhar e os danos causados pelas EROs se tornam maiores que sua prevenção e reparo (Goodsell, 2004; Treiber et al., 2012; Kammeyer e Luiten, 2015; Rinnerthaler et al., 2015).

Todos estes eventos bioquímicos, que ocorrem em ambos os tipos de envelhecimento da pele, acabam se traduzindo em alguns sinais clínicos como a despigmentação, o aparecimento de linhas de expressão, rugas profundas, e de pequenos vasos capilares (telangiectasia), além de queratoses, afinamento da pele, perda da elasticidade e até mesmo neoplasias benignas ou malignas (Yaar e Gilchrest, 1998; Wulf et al., 2004; Zouboulis e Makrantonaki, 2011; Tobin, 2017).

## **1.2. Metaloproteinases de matriz**

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas constitutivas que auxiliam no processo de renovação das fibras elásticas da pele jovem, promovendo a degradação de proteínas velhas de colágeno e outras fibras elásticas. Elas fazem parte de uma família de endopeptidases zinco-dependentes, produzidas pelos fibroblastos, e responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular (MEC) através da quebra de ligações peptídicas (CLARK et al., 2008). Na pele, dos 24 tipos diferentes de MMP descritos na literatura, quatro membros da família das MMP coordenam a degradação das proteínas da matriz extracelular, a colagenase (MMP-1), a gelatinase de 72 kDa (MMP-2), a gelatinase de 92 kDa (MMP-9) e a estromelisina (MMP-3), que provocam a quebra do colágeno e de outras fibras elásticas da pele. As colagenases são as únicas proteases capazes de hidrolisar o colágeno intacto. Logo após ele ser hidrolisado pela MMP-1, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 entram em ação e o degradam em aminoácidos ou oligopeptídeos (Lindner et al., 2012; Kammeyer e Luiten, 2015; Pittayapruek et al., 2016).

Além destas MMPs, a MMP-14, também conhecida como metaloproteinase de membrana (MT-MMP), possui um papel importante na ativação de outras MMPs, principalmente a MMP-2, além da degradação da matriz extracelular. A metaloproteinase de membrana possui um domínio C-terminal transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática (Kammeyer e Luiten, 2015; Pittayapruek et al., 2016). Em uma pele jovem e saudável, a expressão basal destas enzimas é necessária para manter a constante renovação proteica da derme. Entretanto, como o processo de envelhecimento e com a frequente exposição aos raios ultravioletas (UV) ou outros agentes exógenos, a expressão de MMP

torna-se elevada provocando um aumento na degradação das proteínas estruturais da pele, deixando-a flácida e com sinais de envelhecimento (Jenkins, 2002; Pittayapruek et al., 2016).

As MMPs são inicialmente sintetizadas pelas células em sua forma inativa, as pró-MMPs que são ligadas a um peptídeo, o qual precisa ser clivado por outras MMPs, por agentes caotrópicos ou por outras proteases presentes na matriz extracelular para tornar as enzimas ativas. Após a ativação das MMPs, elas tornam-se capazes de clivar o colágeno e as fibras elásticas em fragmentos menores, que são posteriormente degradados em aminoácidos ou oligopeptídeos por outras proteases. Entretanto, com o objetivo de reduzir a degradação exacerbada da matriz extracelular pelas MMPs em uma pele saudável, as células da pele são capazes de produzir inibidores fisiológicos das MMPs, os chamados inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs). No envelhecimento cronológico, observa-se um aumento nos níveis de expressão de MMP, e uma redução da expressão de TIMP e colágeno (Vu e Werb, 2000; CLARK et al., 2008; Murphy, 2011; Lindner et al., 2012; Peng et al., 2012).

Além de participarem do processo de envelhecimento cutâneo, as MMPs também possuem um papel importante no câncer, pois degradando os componentes da matriz extracelular elas permitem a migração celular (Pittayapruek et al., 2016). Na fotocarcinogênese, o aumento da expressão de MMP provocado pela exposição à radiação UV é um dos principais fatores que influenciam a invasão de células cancerígenas a outros tecidos, aumentando o poder de metástase, principalmente quando se trata do melanoma. O processo de invasão de células a outros tecidos é bastante complexo, mas sabe-se que ele começa com a degradação da matriz extracelular que circunda o tumor por proteases como as MMPs, e alterando as propriedades de aderência e motilidade das células (Chu et al., 2007; Nan et al., 2008; Ciurea et al., 2013). A MMP-14 está envolvida na degradação da matriz extracelular e, por se localizar na membrana das células, ela promove com maior facilidade a invasão dos tumores a outros tecidos. Além disto, a MMP-14 também é responsável pela degradação de moléculas de adesão celular como as E-caderinas (Oh et al., 2011; de Oliveira Poswar et al., 2015).

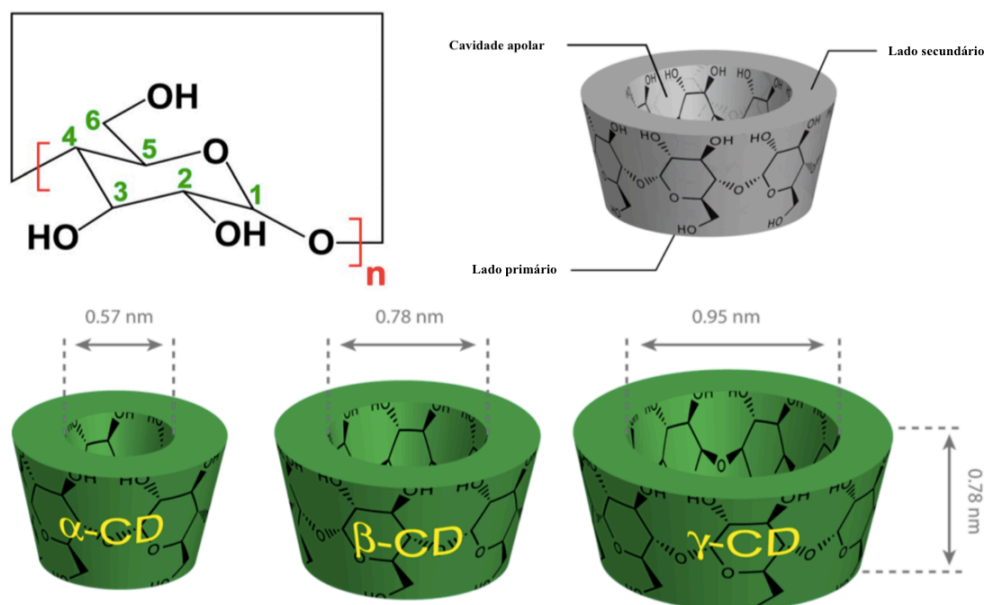
O melanoma é um tipo de câncer de pele que se origina das células que produzem melanina, os melanócitos. Ele é conhecido pelo seu alto poder de metástase e rápida progressão, levando a uma alta taxa de morbidade e mortalidade (Rotte et al., 2012; Leight et al., 2015). A alta atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9 neste tipo de câncer provoca um aumento da degradação de colágeno do tipo IV, o que aumenta a chance de progressão das células cancerígenas. A superexpressão de MMP-2 conjuntamente com o aumento de sua

ativação pela MMP-14 está intimamente associada à progressão atípica do tumor e invasão das células para o sistema circulatório. A alta expressão e atividade de MMP-9 também têm sido associadas com os estágios iniciais de metástase do melanoma (Hofmann et al., 2005; Väisänen et al., 2008).

### 1.3. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são moléculas de oligossacarídeos contendo um número mínimo de seis unidades de d-(+)-glicopiranosose ligadas, em formato cíclico, por ligações glicosídicas do tipo 1,4. Existem naturalmente três formas de ciclodextrinas, obtidas através da degradação do amido pela enzima bacteriana ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), secretada por espécies do gênero *Bacillus*. A  $\alpha$ -ciclodextrina, a  $\beta$ -ciclodextrina e  $\gamma$ -ciclodextrina, são constituídas por seis, sete e oito unidades de glicopiranosose, respectivamente (Figura 3) (Del Valle, 2004; Kurkov e Loftsson, 2013). Apesar de possuírem características físico-químicas e biológicas bastante parecidas com outras dextrinas lineares, as ciclodextrinas possuem uma maior resistência à hidrólise, justamente pelo fato de serem cíclicas. A  $\alpha$ -ciclodextrina é a mais estável dentre as três, e a  $\gamma$ -ciclodextrina a menos estável, mas devido ao baixo custo e a uma maior produção da  $\beta$ -ciclodextrina esta é a mais utilizada comercialmente (Kurkov e Loftsson, 2013).

As ciclodextrinas são muito utilizadas como moléculas carreadoras de fármacos em medicamentos e cosméticos pelas indústrias (Loftsson e Duchêne, 2007). Elas podem ser empregadas em diversos setores, como no campo farmacêutico, na produção de alimentos, na indústria química, na cromatografia, na biotecnologia, na agricultura, na indústria têxtil e também nas ciências ambientais (Crini, 2014). Isso se deve à sua estrutura no formato de cone truncado oco (Figura 3), que apresenta uma superfície exterior com características hidrofílicas e um interior hidrofóbico, o que permite o carregamento de substâncias predominantemente hidrofóbicas. Além disto, as ciclodextrinas são capazes de modificar as propriedades biológicas e físico-químicas das substâncias, formando complexos de inclusão com as mesmas (Loftsson e Duchêne, 2007; Tsai et al., 2010; de Miranda et al., 2011).



**Figura 3.** Estrutura química das moléculas de  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD). Extraído e adaptado de Crini, 2014., com autorização do autor.

De um modo geral, as ciclodextrinas são utilizadas em formulações farmacêuticas com os objetivos de aumentar a solubilidade de moléculas lipofílicas em água, promover estabilidade, evitando a oxidação e hidrólise das substâncias ativas, melhorar as suas características organolépticas, promover a liberação controlada dos princípios ativos, inibir incompatibilidade e possíveis reações químicas entre os componentes da formulação, e também prevenir a irritação cutânea promovendo a absorção controlada de substâncias na pele (Sharma e Baldi, 2014). Muitos produtos cosméticos contendo as ciclodextrinas estão presentes no mercado, sendo a maior parte deles elaborados com substâncias antienvhecimento. Como exemplo, podemos citar o Lipo CD-E contendo a substância ativa  $\alpha$ -tocoferol da empresa americana Lipo Chemicals (Del Valle, 2004; Numanoglu et al., 2007; Sharma e Baldi, 2014). Além disso, formulações parenterais são adicionadas de ciclodextrinas com a finalidade de formar um complexo de inclusão com princípios ativos insolúveis, aumentando a sua estabilidade (Kim et al., 2004; Scavone et al., 2016).

Alguns estudos também demonstraram que as CDs estão sendo extensamente usadas como carreadoras de fármacos antineoplásicos, como o metotrexato, imatinib, cisplatina, doxorubicina, etc., mostrando suas habilidades em aumentar a solubilidade e liberação do fármaco nas células alvo (Bellocq et al., 2003; Pun et al., 2004; Michel et al., 2012; Gidwani e Vyas, 2015; Rigon et al., 2015). No tratamento do câncer de pele, principalmente do melanoma, a terapia fotodinâmica tem sido utilizada como adjuvante à quimioterapia no

combate às células cancerígenas (Huang et al., 2014). A terapia fotodinâmica consiste na administração sistêmica, subcutânea ou tópica de agentes fotossensibilizadores e não tóxicos, seguida de irradiação da pele com luz visível no comprimento de onda próximo ao infravermelho e na presença de oxigênio, formando assim espécies reativas de oxigênio (EROs) citotóxicas (Henderson e Dougherty, 1992). Entretanto, muitos destes agentes fotossensibilizadores, como por exemplo os fulerenos, são moléculas instáveis, lipofílicas, e que são facilmente biodegradadas antes mesmo de chegar às células alvo. Desta forma, a fim de solucionar parte destes problemas, nanocarreadores como as ciclodextrinas são utilizados para encapsular os fármacos utilizados na terapia fotodinâmica (Filippone et al., 2002; Kato et al., 2010).

Com o passar dos anos e o aumento dos estudos sobre estas moléculas, descobriu-se as propriedades das  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD) como potentes depletoras de colesterol da membrana plasmática devido à sua forte afinidade pelo mesmo (Lopez et al., 2013). Duas moléculas de  $\beta$ -CD juntas são capazes de extrair colesterol de eritrócitos e membranas celulares (Zidovetzki e Levitan, 2007; López et al., 2011; Lopez et al., 2013).

Como as  $\beta$ -CD precisam ser modificadas a fim de melhorar sua solubilidade em água, a metilação e a 2-hidroxipropilação da molécula podem auxiliar neste processo. Assim, derivados da  $\beta$ -CD como a metil- $\beta$ -ciclodextrina (M- $\beta$ -CD) e a 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (2-HP- $\beta$ -CD) são utilizados em técnicas de biologia celular como agentes depletoras de colesterol (Challa et al., 2005; Zidovetzki e Levitan, 2007).

### **1.3.1. A membrana plasmática e a importância das cavéolas para sua estrutura e funcionalidade**

A membrana plasmática é formada por uma bicamada de fosfolípidos, na qual também estão inseridas outras moléculas importantes para a sua estrutura e funcionamento, como glicoproteínas, glicolípidos, proteínas integrais e colesterol (Caffrey, 2002). Ela possui diversas funções que são essenciais para o funcionamento das células, e dentre elas está a de formar um compartimento celular independente do meio externo para realizar as suas atividades especializadas (Lombard, 2014). Logo, é importante manter a sua estrutura intacta para que todos os processos bioquímicos intracelulares possam acontecer de maneira correta e não levar a célula à apoptose. Apesar de proteger o meio intracelular do meio extracelular, a membrana plasmática possui certa permeabilidade para que ocorra o transporte necessário de substâncias entre esses meios. Ela também responde aos estímulos dos sinais externos,



processo conhecido como transdução de sinal, no qual ligantes provenientes do ambiente são capazes de se ligar a receptores localizados nas membranas e ativar uma cascata de sinalização intracelular, sem nem mesmo adentrar o interior das células (Caffrey, 2002; Lombard, 2014; Zhao et al., 2014).

Durante toda a extensão da membrana plasmática, existem inúmeras invaginações da mesma chamadas de cavéolas ou *lipid rafts*. Estas estruturas são ricas em lipídeos, como o colesterol e esfingolipídeos, além de algumas proteínas. Elas possuem papel fundamental na manutenção do balanço de colesterol intracelular e, além disso, as cavéolas conferem à membrana permeabilidade e funcionalidade para que ocorra proliferação e migração celular, homeostase do colesterol, sinalização celular e endocitose (Yamada, 1957; Fielding e Fielding, 2001; Li et al., 2005). Uma das principais proteínas presente nas cavéolas é a caveolina-1, uma proteína sinalizadora cujas funções estão relacionadas com a formação de novas estruturas caveolares invaginadas e também com a interação direta com moléculas de colesterol da membrana. Alguns estudos já demonstraram que a ligação da caveolina-1 ao colesterol é importante para manter a estrutura e o bom funcionamento das cavéolas (Rothberg et al., 1990; Fra et al., 1995; Murata et al., 1995).

A depleção do colesterol, localizado nas cavéolas da membrana celular de todos os tipos celulares, aumenta a permeabilidade da membrana e pode provocar modificações na transdução de sinais e, conseqüentemente, ativar vias de sinalização como a ligação de receptores tirosina quinase às MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) (Furuchi e Anderson, 1998; Qin et al., 2016). A ativação da cascata de quinases intracelular, como a ERK, JNK, p38, provoca a conseqüente formação de fatores de transcrição complexos, como a proteína ativadora AP-1, formada por fatores de transcrição c-Jun e c-Fos, além de outros fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B (fator de transcrição nuclear kappa B), que regulam a transcrição de metaloproteinases de matriz, enzimas responsáveis pela degradação de proteínas estruturais como o colágeno (Kammeyer e Luiten, 2015).

Os mecanismos pelos quais as ciclodextrinas causam depleção de colesterol das membranas são demonstrados por alguns modelos experimentais e computacionais, os quais apresentam algumas hipóteses de como acontece este fenômeno (Ohvo e Slotte, 1996; Grauby-Heywang e Turlet, 2008; Flasiński et al., 2010; López et al., 2011). Dentre os três tipos naturais de ciclodextrinas, sabe-se que a  $\beta$ -CD é a mais eficiente na extração de colesterol da membrana devido ao diâmetro de sua cavidade hidrofóbica, na qual a molécula de colesterol consegue se encaixar perfeitamente (Ravichandran e Divakar, 1998; López et al., 2011; Lopez et al., 2013). Além disso, confirmando as hipóteses anteriormente levantadas de

que duas moléculas de  $\beta$ -CD são necessárias para extrair uma molécula de colesterol (2:1), alguns estudos utilizando técnica de dinâmica molecular conseguiram demonstrar que as  $\beta$ -ciclodextrinas, em solução, tendem a formar dímeros, e que estes, quando dispostos de forma perpendicular à membrana, extraem espontaneamente o colesterol (Ravichandran e Divakar, 1998; Williams et al., 1998; Tsamaloukas et al., 2005; López et al., 2011).

Diferentes estudos realizados anteriormente demonstram a capacidade das  $\beta$ -CD em aumentar a ativação e a expressão de MMP provocada pela depleção de colesterol. Em 2004, um estudo envolvendo o tratamento de células HT1080 (fibrossarcoma) com diferentes concentrações de M $\beta$ CD provocou, de forma dose dependente, um aumento na ativação de MMP-2 (Atkinson et al., 2004). Um outro estudo, realizado em 2010, demonstrou uma redução na expressão do mRNA do gene da *MMP-1* em fibroblastos dérmicos quando estes eram tratados com colesterol. Já a adição de M $\beta$ CD às células cultivadas aumentou a expressão de mRNA do gene *MMP-1* e da proteína através da fosforilação de ERK e JNK e pelo aumento da atividade de ligação do fator de transcrição AP-1 ao DNA (Kim et al., 2010a).

O uso de CD em formulações farmacêuticas de administração subcutânea, intramuscular, intravenosa, e também em formulações cosméticas antienvhecimento é bastante comum (Scavone et al., 2016). Diversas substâncias ativas antioxidantes, como a vitamina A e vitamina E, são encapsuladas nas ciclodextrinas e adicionadas em diversos produtos existentes no mercado. Entretanto, a ação destes ativos poderia ser comprometida pelo aumento da atividade e expressão de MMP provocado indiretamente pelas ciclodextrinas. Além disso, o uso de ciclodextrinas como potenciais carreadoras de fármacos antineoplásicos vem crescendo. Entretanto, os seus efeitos relacionados à depleção de colesterol das membranas, como aumento de expressão e atividade de MMP, precisam ser avaliados e discutidos. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a expressão e ativação de *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9* e *MMP-14* em cultura de células tratadas com diferentes concentrações de dois diferentes tipos de  $\beta$ -ciclodextrinas, além de avaliar outros parâmetros relacionados ao envelhecimento da pele.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito da  $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina na expressão de genes relacionados ao envelhecimento da pele, na atividade de MMP-2 e MMP-9, e também no estado redox de fibroblastos dérmicos humanos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliação da citotoxicidade de  $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina em cultura de fibroblastos dérmicos humanos;
- Avaliação do efeito de  $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina na expressão gênica de metaloproteinases tipo 1, 2, 3, 9 e 14, do inibidor tecidual de metaloproteinases tipo 1 (TIMP-1) e de colágeno tipo 1 (COL1A1) em cultura de fibroblastos dérmicos humanos;
- Avaliação do efeito da  $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina na atividade de metaloproteinases tipo 2 e 9 em cultura de fibroblastos dérmicos humanos;
- Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas culturas de fibroblastos dérmicos humanos tratados com os dois tipos de ciclodextrinas;
- Avaliação do efeito de  $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina na atividade enzimática da catalase em cultura de fibroblastos dérmicos humanos;
- Avaliação da integridade da membrana de fibroblastos tratados com  $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Cultura de células**

Os fibroblastos dérmicos humanos, CCD1059Sk e HFF-1, utilizados nos ensaios foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem celular CCD1059Sk provém de cultura primária de fibroblastos extraídos da pele da região da mama. Já a linhagem HFF-1 é proveniente de cultura imortalizada de fibroblastos da pele do prepúcio. As células foram cultivadas em placas de 35 x 10 mm (K13-0035, KASVI) em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose*, Sigma-Aldrich), suplementado com soro fetal bovino 10% (Gibco), penicilina G 60 µg/mL (Sigma-Aldrich), estreptomicina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich), e incubadas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C.

#### **3.2. Preparo das soluções de β-ciclodextrina e 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina.**

As soluções de β-ciclodextrina (Kleptose/Batch: E1048, Rochette - França), βC, e hidroxiopropil-β-ciclodextrina (Kleptose HPB parenteral grade/E0237, Rochette - França), HPβC, foram diluídas em capela de fluxo laminar com meio DMEM nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM e 2 mM. Essas concentrações foram baseadas nas concentrações de metil-β-ciclodextrina que aumentaram a expressão de colágeno e diminuíram a expressão de caveolina-1 nos estudos realizados por Lee e colaboradores (Lee et al., 2015).

#### **3.3. Avaliação da citotoxicidade das soluções de β-ciclodextrina e 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina em cultura de fibroblastos.**

A citotoxicidade das soluções de β-ciclodextrina e 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina foi determinada segundo o método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich). A viabilidade celular é medida através da atividade das desidrogenases mitocondriais, as quais são capazes de clivar o anel tetrazólio do sal MTT, de cor amarela, e formar os cristais de formazana, de cor azul a violeta. Após esta reação, foi feita uma leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Assim, a quantidade de células viáveis foi proporcional à quantidade de cristais de formazana produzida (Mosmann, 1983).

Em uma placa de 96 poços foram incubadas cerca de cinco mil células, em cada poço, com 50 µL de meio DMEM e 50 µL das diferentes soluções de ciclodextrinas nas variadas concentrações (0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM e 2 mM), exceto nos poços utilizados como

controle, nos quais foram adicionado 50 µL de DMEM. Após 48 horas de tratamento a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL em tampão fosfato de sódio e potássio, 1M, pH 7,4, com 0,8% de NaCl e 0,02% de KCl – PBS) em todos os poços e a placa incubada novamente a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Após o período de incubação foram adicionados 100 µL de solução de HCl 0,04 M em isopropanol em cada poço, para a dissolução do sal de formazan. A placa foi então deixada em agitação por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, a absorbância foi medida a 570 nm. A comparação foi feita entre os valores de absorbância obtidos nos poços do controle e nos poços que receberam o tratamento com ciclodextrinas.

### **3.4. Extração de RNA e validação dos primers para quantificação da expressão gênica de *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-3*, *MMP14*, *TIMP-1* e colágeno tipo 1 (*COL1A1*) por RT-qPCR.**

#### **3.4.1. Extração de RNA.**

Após o tratamento dos fibroblastos com as diferentes concentrações de ciclodextrinas por 48 h, em placas de 35 x 10 mm (K13-0035, KASVI) e com 90% de confluência, o meio de cultura foi removido das placas, e estas foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e transferidas para o gelo. Foram adicionados 2 mL do reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) em cada placa, e estas foram raspadas com auxílio de um raspador de células e o conteúdo recolhido em microtubos de 1,5 mL livre de RNase (KASVI). Em cada tubo contendo as amostras foram acrescentados 200 µL de clorofórmio, a mistura foi agitada em vórtex e mantida por 3 minutos em temperatura ambiente (TA). Após este processo, as amostras foram centrifugadas a 16903 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante formado contendo o RNA total (RNAt) foi transferido para outro micro tubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol para promover a precipitação do RNA. As amostras foram então agitadas em vórtex e mantidas por 10 minutos em TA. Após este período, foi realizada a centrifugação das amostras a 16903 x g por 10 minutos a 4°C. O isopropanol foi então descartado e adicionado 1 mL de álcool etílico 75% gelado para lavagem do *pellet* contendo o RNA total extraído, e as amostras foram centrifugadas a 6985 x g por 5 minutos. O álcool etílico 75% foi descartado e os *pellets* mantidos em TA por 3 minutos.

O *pellet* contendo o RNA total (RNAt) extraído foi dissolvido em água tratada com um inibidor de RNase, o dietilpirocarbonato (DEPC), a 0,1%. A determinação da concentração do RNAt das amostras se deu pela medida da absorbância das amostras nos comprimentos de

onda de 260 nm, específica para ácidos nucleicos, e 280 nm, específico para proteínas. A pureza das amostras foi determinada pela quantidade de contaminantes de proteínas nas amostras através da razão das densidades ópticas obtidas nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). As amostras foram consideradas puras quando a razão  $A_{260}/A_{280}$  estava entre 1,7 e 2,2. A pureza e concentração foram medidas com auxílio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare Life Sciences). A integridade do RNA extraído também foi avaliada através do ensaio de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio para visualização das bandas 18S e 28S do RNA ribossômico. O gel contendo as amostras foi submetido a uma corrida de aproximadamente 20 min em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,1 M, pH 8, a uma tensão de 90 V. Após este período, as bandas do gel foram visualizadas em fotodocumentador (Amersham imager 600 GE, Inglaterra) sob luz UV.

#### **3.4.2. Tratamento do RNA extraído com a enzima desoxirribonuclease (DNase) I.**

Com o objetivo de remover das amostras de RNA a contaminação com DNA genômico, as mesmas foram tratadas com a enzima DNase I (Sigma-Aldrich). Foram adicionados 1  $\mu$ L de tampão de reação (Tris/HCl 200 mM, pH 8,3, contendo 20 mM de  $MgCl_2$ ) e 1  $\mu$ L de DNase I nas alíquotas de 8  $\mu$ L de RNA e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este processo, 1  $\mu$ L de solução 50 mM de ácido etilenodiaminotetracético foi adicionado às amostras e as mesmas foram submetidas a aquecimento a 70°C por 10 minutos para inativação da DNase I.

#### **3.4.3. Desenho e validação dos primers.**

De acordo com critérios pré-estabelecidos a sequência dos primers, *forward* (F) e *reverse* (R), dos genes do colágeno tipo I alfa-1 (*COL1A1*), metaloproteinase de matriz do tipo 1 (*MMP-1*), metaloproteinase de matriz do tipo 2 (*MMP-2*), metaloproteinase de matriz do tipo 9 (*MMP-9*), metaloproteinase de matriz do tipo 3 (*MMP-3*), metaloproteinase de matriz do tipo 14 (*MMP-14*) e do inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz do tipo 1 (*TIMP-1*) foram obtidas a partir do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através do programa BLAST (Tabela 1). A especificidade das sequências foram checadas no site do *UCSC Genome Browser Home* ([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)) através do programa *In-Silico* PCR. Após o seu desenho, os primers foram fabricados pela *Integrated DNA Technologies* (IDT, USA).

**Tabela 1. Sequência dos *primers* de *COL1A1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-3*, *MMP-14*, *TIMP-1* e *GAPDH* usados nos ensaios de RT-qPCR.**

<i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Produto de amplificação (Pb)
<i>COL1A1_F</i>	CCCCGAGGCTCTGAAGGTC	197
<i>COL1A1_R</i>	GGAGCACCATTGGCACCTTT	
<i>MMP-1_F</i>	AGAAAGAAGACAAAGGCAAGTTGA	147
<i>MMP-1_R</i>	CTGAGCCACATCAGGCACTC	
<i>MMP-2_F</i>	ATAACCTGGATGCCGTCGT	189
<i>MMP-2_R</i>	AGGCACCCTTGAAGAAGTAGC	
<i>MMP-9_F</i>	GAACCAATCTCACCGACAGG	159
<i>MMP-9_R</i>	GCCACCCGAGTGTAACCATA	
<i>MMP-3_F</i>	TTCAGCTATTTGCTTGGGAA	109
<i>MMP-3_R</i>	CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA	
<i>MMP-14_F</i>	TACCAGTGGATGGACACGGA	84
<i>MMP-14_R</i>	CCCTGACTCACCCCATAAA	
<i>TIMP-1_F</i>	GAATGCACAGTGTTCCTGT	129
<i>TIMP-1_R</i>	GTCCGTCCACAAGCAATGAG	
<i>GAPDH_F</i>	AATCCCATCACCATCTTCCA	82
<i>GAPDH_R</i>	TGGACTCCACGACGTACTCA	

Legenda: Temperatura de *melting* (Tm); *primer forward* (F); *primer reverse* (R).

A eficiência de cada par de *primers* para a reação de RT-qPCR (*Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*) foi dada pela construção de uma curva de eficiência relativa, com o objetivo de validar os mesmos e definir uma concentração de RNAt ideal para as reações de amplificação. Uma quantidade inicial de 30 ng de RNAt foi utilizada para a validação do *primer* do gene da MMP-14. A partir desta concentração, uma diluição seriada com fator de diluição igual a 5 foi feita para a construção da curva do *primer* do gene da MMP-14; 4,2 µL das diluições foram usadas nas reações, correspondendo a quantidades de RNAt de 30 ng; 6 ng; 1,2 ng; 0,24 ng; e 0,048 ng. As amostras foram então submetidas ao ensaio de transcrição reversa e amplificação por RT-qPCR no equipamento *Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR Systems*, realizado em um único passo com a utilização do kit *Power SYBR-Green RNA-to-CT™ 1-Step (Applied Biosystems)*, e utilizando um volume reacional de 10 µL. Os *primers* dos genes de *COL1A1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-3*, *TIMP-1* e *GAPDH* (gene constitutivo) foram previamente validados por outros estudantes de pós-graduação do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL) seguindo o mesmo padrão feito para o gene da MMP-14. A especificidade dos *primers* também foi avaliada através da curva de dissociação dos produtos de amplificação para cada par de *primers*.

O gene constitutivo do GAPDH foi utilizado como gene padrão para comparação das eficiências dos *primers* de todos os genes testados até o momento. A eficiência (E) dos *primers* foi verificada a partir da inclinação angular da reta (*slope*), obtida pela equação de regressão linear da curva de eficiência relativa dos *primers* construída, utilizando a seguinte equação:

$$E = [10^{(-1/slope)} - 1] \times 100$$

#### 3.4.4. Quantificação relativa de COL1A1, TIMP-1, MMP-14, MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9.

O ensaio de transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativa foi realizado em um único passo com a utilização do kit *Power SYBR-Green RNA-to-CT<sup>TM</sup>1-Step (Applied Biosystems)*, com o objetivo de quantificar a expressão dos genes *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-3*, *TIMP-1* e *COL1A1* e *GAPDH* nas amostras tratadas ou não com ciclodextrinas.

As reações foram feitas utilizando um volume reacional final de 10  $\mu\text{L}$  em uma placa de 96 poços contendo em cada poço 5,5  $\mu\text{L}$  de uma mistura de Power SYBR-Green, enzima transcriptase reversa (RT), e *primers forward* e *reverse* (5 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$ ), e 4,5  $\mu\text{L}$  da amostra de RNA contendo 5 ng de ácido nucleico. Utilizando o equipamento *Applied Biosystems StepOne Plus<sup>TM</sup> Real-Time PCR Systems* foram estabelecidas as seguintes condições reacionais para a amplificação dos genes: 30 minutos a 48°C para realização da reação de transcrição reversa; 10 minutos a 95°C para ativação da enzima DNA polimerase; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento do *primer* e extensão. Foi construída uma curva de dissociação através de ciclos de dissociação, 15 segundos a 95°C; anelamento, 15 segundos a 60°C; e dissociação, 15 segundos a 95°C.

A metodologia utilizada para a quantificação relativa da expressão gênica foi o método do  $\Delta\Delta\text{Ct}$  que utiliza os valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos na amplificação dos genes de interesse. Os valores de Ct indicam o ciclo no qual o sinal de fluorescência ultrapassa a linha de base, e os mesmos foram utilizados no cálculo da quantificação relativa da expressão gênica, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{QR} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Onde:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{amostra}} - \Delta\text{Ct}_{\text{controle}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{amostra}} = \text{Ct}_{\text{gene alvo}}^a - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}^a$$



$$\Delta Ct_{\text{controle}} = Ct_{\text{gene alvo}}^c - Ct_{\text{GAPDH}}^c$$

$Ct^c$  = Ct da amostra de RNA extraída das células do grupo controle

$Ct^a$  = Ct da amostra de RNA extraída dos fibroblastos humanos tratadas com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

### 3.5. Avaliação da atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9 por zimografia.

A avaliação da atividade proteolítica das metaloproteinases 2 e 9 produzidas pelas células tratadas ou não com ciclodextrinas foi realizada através do ensaio de zimografia, como descrito por Rocca e colaboradores (La Rocca et al., 2004).

Os fibroblastos dérmicos humanos foram incubados em uma placa de 6 poços e tratados com as diferentes concentrações de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina pré-determinadas. Após o período de 48 horas de tratamento, o meio de cultivo das células tratadas ou não tratadas foi recolhido em microtubos de 1,5 mL e centrifugado por 10 minutos a 345 x g para a remoção dos restos celulares.

A quantificação de proteínas de cada amostra foi feita por metodologia pré-estabelecida (LOWRY et al., 1951) e o equivalente de 8  $\mu$ g de proteína de cada amostra foi diluída na razão de 1:1 em tampão Tris/HCl 0,1M, pH 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, e 0,001% de azul de bromofenol. As amostras foram então aplicadas no gel de poliacrilamida composto por 5 cm de gel de separação a 10%, adicionado de 1% de gelatina, e um gel de concentração a 5% de poliacrilamida.

No processo de eletroforese, o gel de poliacrilamida foi submetido, previamente à aplicação das amostras, a uma pré-corrída de 15 minutos com tensão de 100 V em tampão de corrida Tris/Glicina 25 mM, pH 8,3, contendo 0,1% de SDS. Após a aplicação das amostras no gel, a eletroforese foi realizada com tensão de 100 V até as amostras ultrapassarem o gel de concentração, e, posteriormente, a tensão foi alterada para 150 V. Toda a eletroforese foi realizada em câmara fria para evitar a perda de atividade enzimática.

Ao termino da corrida, o gel foi lavado com água destilada e incubado com solução de Triton X100 a 2% por 1 hora a 4°C. Após a remoção do Triton X100, o gel foi lavado com água destilada e incubado por 24 horas a 37°C em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, acrescido de CaCl<sub>2</sub> 10 mM, processo este essencial à atividade enzimática. Após o período de incubação, o gel foi corado com o corante Comassie Blue R350 0,2% (GE Healthcare) diluído em ácido acético 20% na proporção de 1:1 (0,1%). O excesso de corante foi removido por lavagem do gel com solução de ácido acético a 20%. O marcador de proteínas de massa molecular conhecidas SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard (Life Technologies) foi

utilizado no ensaio como padrão. A análise densitométrica das bandas foi realizada utilizando o programa ImageJ, e os resultados foram expressos graficamente em porcentagem de atividade enzimática.

### **3.6. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por fluorescência.**

A 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína DCFH-DA é uma sonda estável lipofílica não-fluorescente que atravessa a membrana das células. As espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante a respiração celular são capazes de oxidar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), obtida dentro da célula pela reação de desacetilação da DCFH-DA causada pelas esterases citosólicas, formando assim a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com emissão em 510-530 nm. A fluorescência gerada é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Assim, a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pela célula, em particular do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bass et al., 1983).

Os fibroblastos dérmicos humanos foram incubados em uma placa de 96 poços na concentração de 10.000 células por poço e tratados por 48 horas com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM. Posteriormente, o meio de cultura das células foi removido e os poços foram lavados cuidadosamente com solução de PBS. As células foram então incubadas por 30 minutos a 37°C com 100  $\mu$ L de uma solução de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) na concentração final de 20  $\mu$ M. Após este período, a solução de fluoresceína foi descartada e os poços foram lavados com solução de PBS. A fluorescência produzida foi quantificada em um leitor de placas a 485 nm de excitação e 530 nm de emissão. As células foram então recolhidas e foi feita uma quantificação de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). O resultado é obtido pela normalização da quantidade de espécies reativas de oxigênio gerada pela quantidade em  $\mu$ g de proteína de cada amostra (% EROs/ $\mu$ g proteína).

### **3.7. Avaliação da atividade da catalase.**

Os fibroblastos foram inoculados em uma placa de 6 poços na concentração de  $3 \times 10^5$  células em cada poço e tratados por 48 horas com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado e as células foram recolhidas em PBS com auxílio de um raspador de células. O conteúdo recolhido foi armazenado em microtubos de

1,5 mL e submetido a três ciclos de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongelamento a  $4^{\circ}\text{C}$  para obtenção do lisado celular, o qual foi utilizado para o ensaio de avaliação da atividade da enzima catalase.

Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do lisado celular foi então adicionada a uma solução de 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro, que foi realizada no modo cinético, por 2 minutos, no comprimento de onda de 240 nm. A conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular pela enzima catalase foi medida por acompanhamento da diminuição da absorbância do  $\text{H}_2\text{O}_2$  no comprimento de onda de 240 nm (Aebi, 1984; Weydert e Cullen, 2010).

### **3.8. Avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase.**

Para a realização deste ensaio, as células foram incubadas em uma placa de 6 poços e tratadas durante 48 horas com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 1,5 mM e 1,0 mM, respectivamente. Em seguida, o meio de cultura foi coletado para análise. A lactato desidrogenase (LDH) liberada das células foi quantificada por um ensaio realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit *Lactate Dehydrogenase* - LDHI2: ACN 8080 (Roche *Diagnostics*, EUA). Os resultados foram expressos como U/L de LDH. O ensaio de LDH foi realizado em colaboração com o Hospital Universitário de Brasília (HUB).

### **3.9. Análise estatística.**

O teste de variância *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Dunnett para múltiplas comparações foram utilizados quando apropriados. A análise estatística dos dados foi realizada através do software *PRISM GraphPad 6*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da citotoxicidade de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em fibroblastos dérmicos humanos (CCD1059Sk e HFF-1).

A viabilidade das células tratadas ou não com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina foi avaliada pelo ensaio de MTT. De acordo com os resultados deste ensaio, apresentados na Figura 4, as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM não se mostraram tóxicas para ambas as linhagens celulares utilizadas e não houve diferença significativa na viabilidade das células tratadas quando comparadas ao controle (Figura 4).

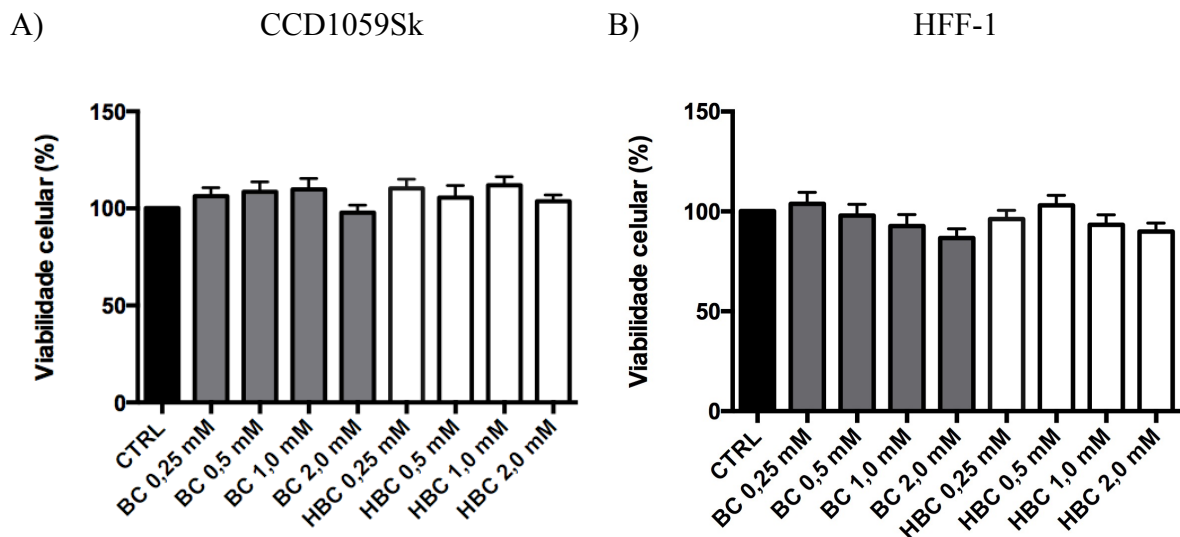


Figura 4. Avaliação da citotoxicidade de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em fibroblastos humanos A) CCD1059Sk e B) HFF-1. O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de três ensaios independentes. CTRL, fibroblastos cultivados somente em meio DMEM e com viabilidade celular considerada como 100%; BC, tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina; HBC, tratamento com soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Tratamento de 48 h. Teste estatístico: *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

### 4.2 Extração de RNA e validação dos *primers* de *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-3*, *MMP-14*, *TIMP-1* e colágeno tipo 1 (*COL1A1*) para quantificação da expressão gênica por RT-qPCR.

#### 4.2.1. Pureza e integridade do RNA extraído dos fibroblastos dérmicos humanos.

A análise espectrofotométrica do RNA extraído dos fibroblastos CCD1059Sk e HFF-1, tratados ou não com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações, permitiu avaliar a pureza do RNA. Os resultados da espectrofotometria apresentados nas Tabelas 2 e 3 confirmam a pureza do RNA extraído das

células. A razão  $A_{260}/A_{280}$  das amostras de RNA extraídas tanto das células cultivadas em meio sem tratamento, controle (CTRL), assim como das amostras das células tratadas com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) estavam dentro da faixa de 1,7 a 2,2 e foram consideradas puras. A concentração de RNA das amostras variou entre  $2,47 \pm 0,08 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $3,01 \pm 0,13 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para as células CCD1059Sk (Tabela 2), e entre  $0,93 \pm 0,16 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1,12 \pm 0,08 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para a linhagem de fibroblastos HFF-1 (Tabela 3).

**Tabela 2. Pureza e concentração final do RNA total extraído das células CCD1059Sk tratadas ou não com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.**

<b>Amostras</b>	<b>Pureza (Razão <math>A_{260}/A_{280}</math>)</b>	<b>Concentração de RNA das amostras (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>
<b>CTRL</b>	$1,95 \pm 0,07$	$2,69 \pm 0,10$
<b>BC 0,5 mM</b>	$1,92 \pm 0,09$	$2,88 \pm 0,09$
<b>BC 1,0 mM</b>	$1,91 \pm 0,11$	$2,85 \pm 0,11$
<b>BC 1,5 mM</b>	$1,90 \pm 0,08$	$2,47 \pm 0,08$
<b>HBC 0,5 mM</b>	$1,92 \pm 0,10$	$2,76 \pm 0,09$
<b>HBC 1,0 mM</b>	$1,94 \pm 0,07$	$2,98 \pm 0,10$
<b>HBC 1,5 mM</b>	$1,92 \pm 0,10$	$3,01 \pm 0,13$

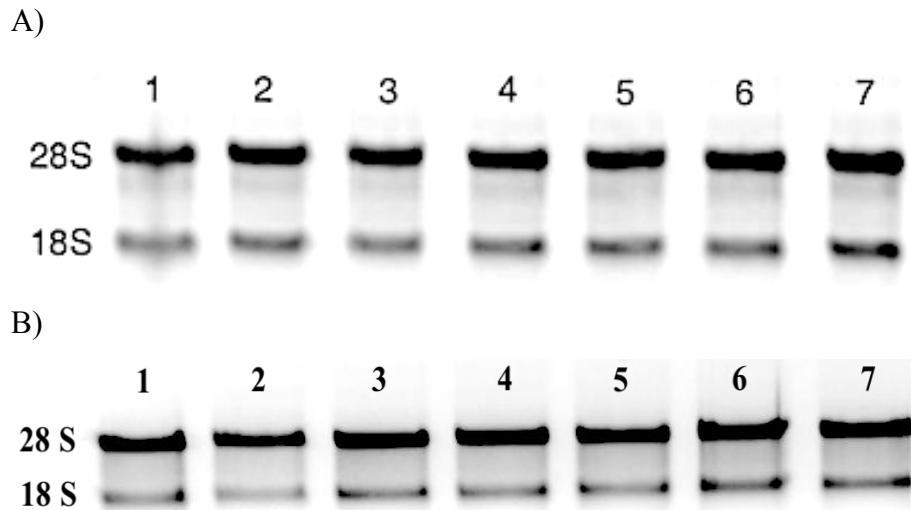
Legenda: BC,  $\beta$ -ciclodextrina; HBC, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

**Tabela 3. Pureza e concentração final do RNA total extraído das células HFF-1 tratadas ou não com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.**

<b>Amostras</b>	<b>Pureza (Razão <math>A_{260}/A_{280}</math>)</b>	<b>Concentração de RNA das amostras (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>
<b>CTRL</b>	$1,91 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,08$
<b>BC 0,5 mM</b>	$1,88 \pm 0,07$	$1,12 \pm 0,08$
<b>BC 1,0 mM</b>	$1,92 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,10$
<b>BC 1,5 mM</b>	$1,91 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,04$
<b>HBC 0,5 mM</b>	$1,91 \pm 0,01$	$0,96 \pm 0,22$
<b>HBC 1,0 mM</b>	$1,91 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,16$
<b>HBC 1,5 mM</b>	$1,92 \pm 0,01$	$1,01 \pm 0,16$

Legenda: BC,  $\beta$ -ciclodextrina; HBC, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

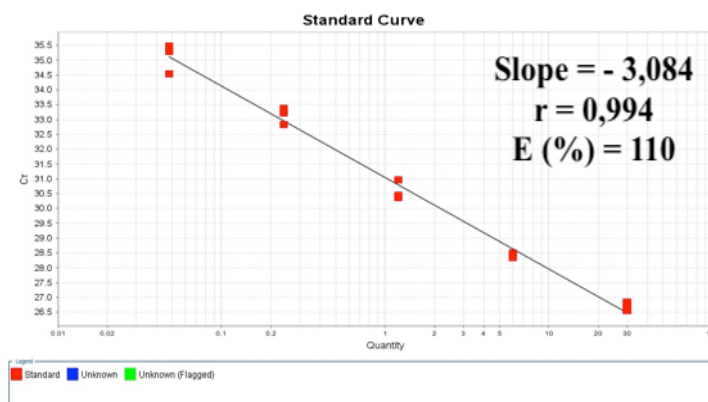
A integridade do material genético extraído também foi avaliada através da visualização das bandas ribossomais 18S e 28S por eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 5).



**Figura 5. Avaliação da integridade do RNA extraído dos fibroblastos tratados ou não com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. A) CCD1059Sk e B) HFF-1. A visualização das bandas 28S e 18S mostram a integridade do RNA extraído das células. 1 corresponde ao controle; 2, 3 e 4, células tratadas com  $\beta$ -ciclodextrina (BC) nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM, respectivamente; 5, 6 e 7, células tratadas com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM, respectivamente. Tratamento de 48 h, n = 3.**

#### 4.2.2. Validação dos *primers* de *COL1A1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-3*, *MMP-14* e *TIMP-1*.

A eficiência do *primer* de *MMP-14* foi testada pela construção de uma curva de diluição em série com fator de diluição igual a 5 do RNA total extraído da cultura de células. As concentrações de RNA utilizadas na curva foram 30 ng, 6 ng, 1,2 ng, 0,24 ng e 0,048 ng. A curva padrão obtida para o *primer* da *MMP-14* está representada na Figura 6.



**Figura 6. Curva padrão do gene *MMP-14*.** Curva padrão do gene *MMP-14* construída a partir da diluição em série de um *pool* de RNA total de fibroblastos dérmicos humanos. E = eficiência, r = coeficiente de correlação linear, slope = inclinação da reta.

Os *primers* dos genes de *COL1A1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-3*, *TIMP-1* e *GAPDH* (gene constitutivo) foram previamente validados por outros estudantes de pós-graduação do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL) e suas respectivas curvas de padronização estão representadas nos anexos 1 e 2.

A eficiência dos *primers* foi determinada a partir dos valores de inclinação angular da reta (*slope*), do coeficiente de correlação linear (*r*) e da eficiência das curvas de padronização (Anexos 1 e 2). Todos os *primers* apresentaram eficiência dentro dos critérios estabelecidos para uma reação de qualidade, na faixa de 90 a 110%. As eficiências dos *primers* de *COL1A1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-3*, *MMP-14* e *TIMP-1* foram comparadas com a do *primer* do *GAPDH*. O método escolhido para fazer a quantificação relativa destes genes foi o do cálculo do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , pois a variação obtida entre as eficiências dos *primers* dos genes alvo e do *GAPDH* foi menor que 10%.

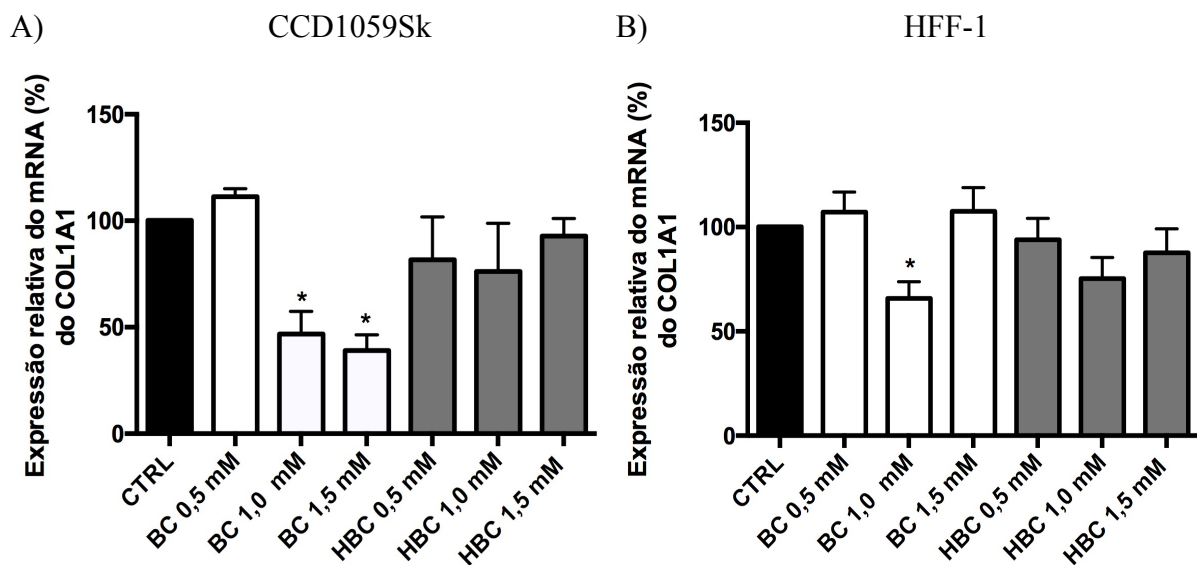
No processo de RT-qPCR a dupla fita de DNA se dissocia em temperaturas elevadas e o produto de amplificação de cada *primer* em específico gera uma curva de dissociação a uma determinada temperatura, esta chamada de temperatura de *melting* (*T<sub>m</sub>*). Nesta temperatura específica, 50% do produto de amplificação de cada gene encontra-se como fita dupla e 50% encontra-se como fita simples. A partir da curva de dissociação, ou curva de *melting*, consegue-se verificar a especificidade do produto de amplificação de cada *primer*. As curvas de dissociação e suas respectivas temperaturas de *melting* dos *primers* utilizados neste estudo encontram-se nos anexos 3 e 4.

### **4.3 Análise da expressão gênica do *COL1A1*, *TIMP-1* e *MMP-14* nas células tratadas com soluções de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.**

Após o tratamento dos fibroblastos dérmicos humanos por 48 horas com as diferentes concentrações de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a expressão gênica de colágeno do tipo 1 (*COL1A1*), do inibidor tecidual de metaloproteinases de matriz tipo 1 (*TIMP-1*) e da metaloproteinase de membrana (*MMP-14*) foi avaliada e os resultados foram comparados com a expressão destes genes no grupo controle (CTRL), tratado somente com DMEM.

O tratamento dos fibroblastos CCD1059Sk e HFF-1 com a solução de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) na concentração de 0,5 mM promoveu um leve aumento na expressão relativa do RNAm do colágeno tipo 1 (*COL1A1*) em relação ao controle (CTRL), entretanto este aumento não foi

estatisticamente significativo. Em contrapartida, os tratamentos das células CCD1059Sk com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) nas concentrações de 1,0 mM e 1,5 mM reduziram significativamente a expressão de *COL1A1*, quando comparados ao controle. Além disso, a solução de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) na concentração de 1,0 mM também foi capaz de reduzir significativamente a expressão de colágeno em fibroblastos da linhagem HFF-1. O tratamento com as soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações não causou uma redução significativa na expressão de *COL1A1* quando comparado ao controle (Figura 7).

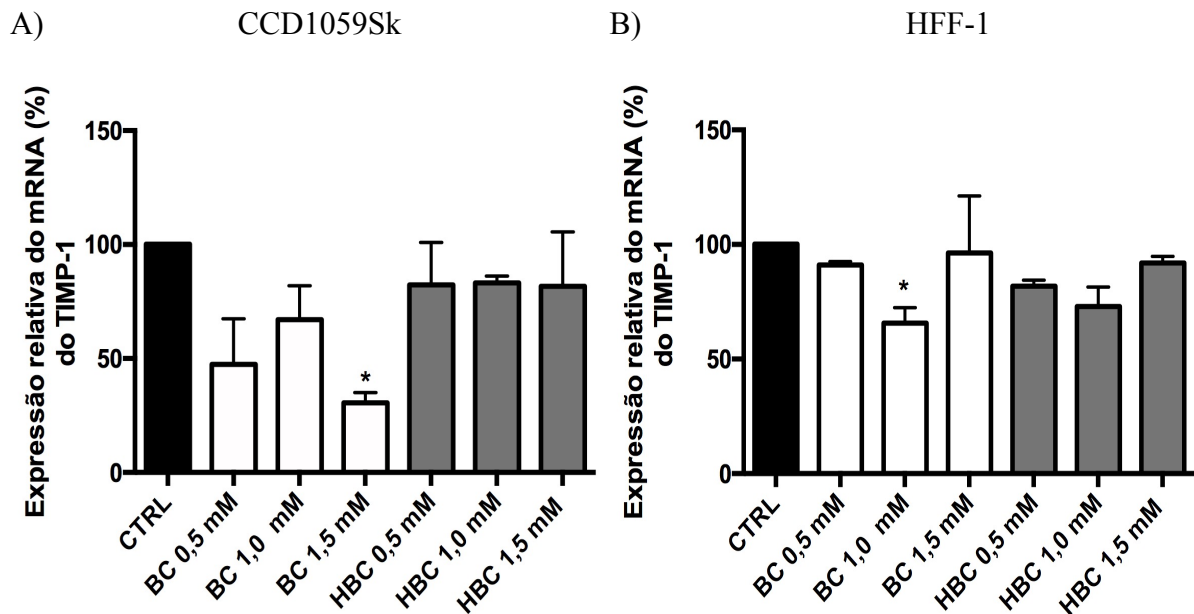


**Figura 7. Análise da expressão relativa do RNAm do *COL1A1* em fibroblastos humanos A) CCD1059Sk e B) HFF-1 tratados com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações.** O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, \*,  $p < 0,05$ . CTRL, fibroblastos cultivados somente em meio DMEM e com expressão relativa de *COL1A1* considerada como 100%; BC, tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM; HBC, tratamento com soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM. A expressão do RNAm do gene do *COL1A1* foi normalizada pela expressão do RNAm do gene *GAPDH*. Tratamento de 48 h. Teste estatístico: *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Em relação à expressão relativa do RNAm do gene do inibidor tecidual de metaloproteinases de matriz tipo 1 (*TIMP-1*), o tratamento com a solução de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) na concentração de 1,5 mM provocou uma redução significativa na expressão deste gene em células CCD1059Sk, quando comparado ao controle (CTRL), de células cultivadas somente com DMEM. Os tratamentos com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) nas concentrações de 0,5 mM e 1,0 mM e com as soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações não reduziram a expressão de *TIMP-1*. Em contrapartida, os fibroblastos HFF-1 apresentaram uma diminuição significativa na expressão de *TIMP-1*

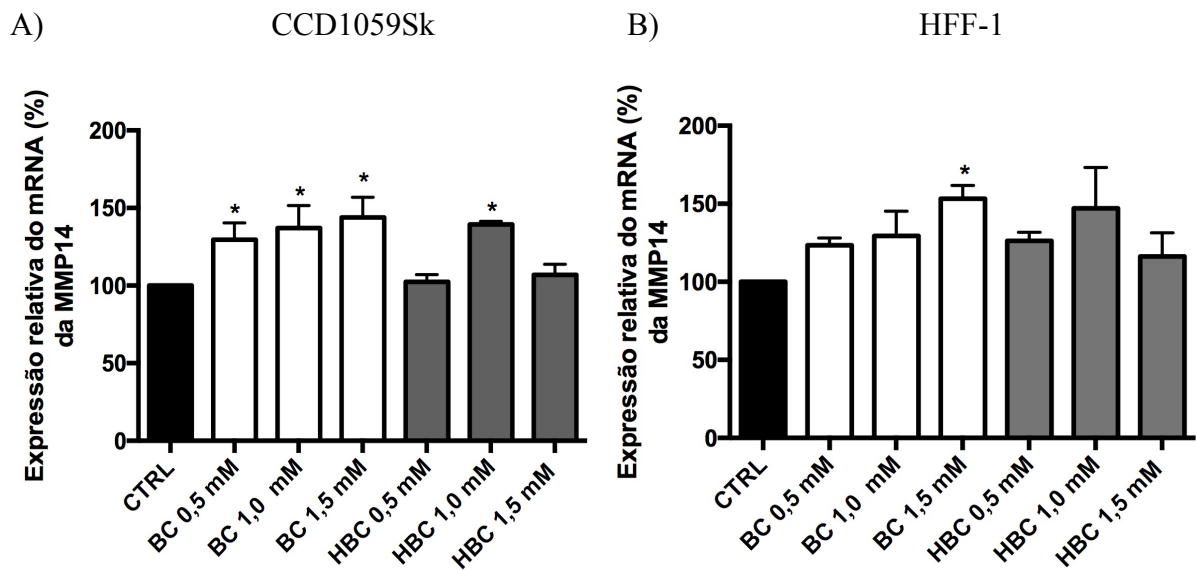


somente quando tratados com solução de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) na concentração de 1,0 mM (Figura 8).



**Figura 8.** Análise da expressão relativa do RNAm do gene do *TIMP-1* em fibroblastos humanos A) CCD1059Sk e B) HFF-1, tratados com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações. O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, \*,  $p < 0,05$ . CTRL, fibroblastos cultivados somente em meio DMEM e com expressão relativa de *TIMP-1* considerada como 100%; BC, tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM; HBC, tratamento com soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM. A expressão do RNAm do gene do *TIMP-1* foi normalizada pela expressão do RNAm do gene *GAPDH*. Tratamento de 48 h. Teste estatístico: *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

A expressão relativa do RNAm do gene da metaloproteinase de membrana (*MMP-14*) das células CCD1059Sk tratadas com as diferentes soluções de ciclodextrinas em diferentes concentrações também foi avaliada com relação à expressão desse gene no controle. Foi observado um aumento significativo, dose dependente, na expressão de *MMP-14* das células tratadas com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM, respectivamente, quando comparado ao controle, de células cultivadas somente com DMEM. O tratamento com a solução de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) na concentração de 1,0 mM também promoveu um aumento na expressão deste gene em relação ao controle. Ademais, a solução de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) na concentração de 1,5 mM também foi capaz de aumentar a expressão de *MMP-14*, quando comparada ao controle, em fibroblastos HFF-1. Estes resultados foram estatisticamente significativos para um valor de  $p < 0,05$  (Figura 9).



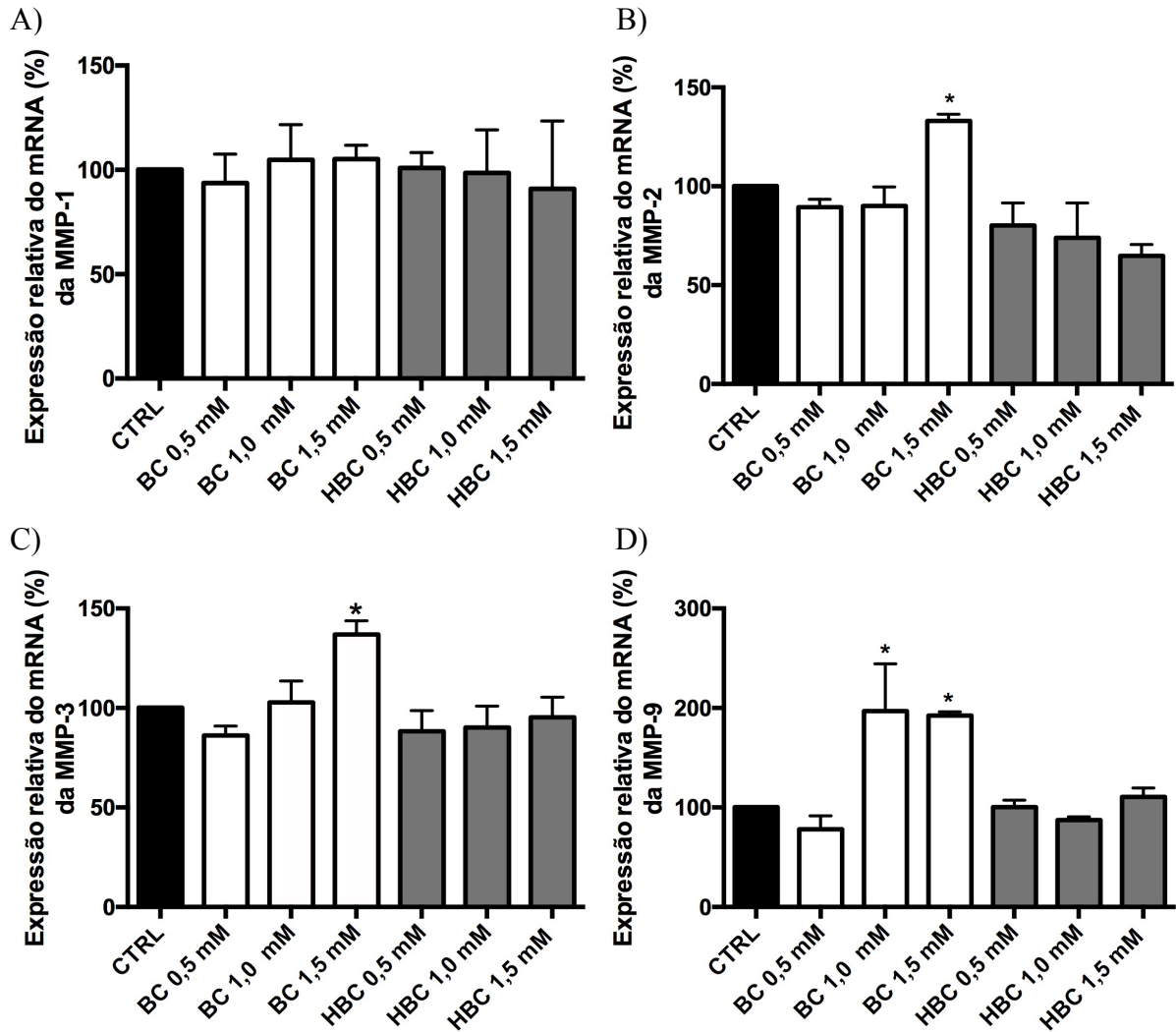
**Figura 9.** Análise da expressão relativa do RNAm do gene da *MMP-14* em fibroblastos humanos A) CCD1059Sk e B) HFF-1, tratados com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações. O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, \*,  $p < 0,05$ . CTRL, fibroblastos cultivados somente em meio DMEM e com expressão relativa de *MMP-14* considerada como 100%; BC, tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM; HBC, tratamento com soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM. A expressão do RNAm do gene da *MMP-14* foi normalizada pela expressão do RNAm do gene *GAPDH*. Tratamento de 48 h. Teste estatístico: *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.4 Análise da expressão gênica de *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3* e *MMP-9* em fibroblastos HFF-1 tratados com soluções de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

A avaliação da expressão gênica de importantes metaloproteínas de matriz, responsáveis pela degradação de colágeno e elastina na pele, como *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3* e *MMP-9*, foi realizada em fibroblastos dérmicos humanos (HFF-1). Neste estudo, os mesmos foram tratados com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em concentrações diversas, e seus resultados foram comparados com a expressão destes genes no controle (CTRL), cultivado somente com DMEM.

Os resultados deste ensaio mostram que, apesar da expressão relativa do RNAm do gene de *MMP-1* em células HFF-1 não ter sido alterada pelo tratamento com as ciclodextrinas (Figura 10A), a solução de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) na concentração de 1,5 mM conseguiu aumentar de forma significativa a expressão do RNAm do gene de *MMP-2* e *MMP-3*, quando

comparadas ao controle (Figuras 10B e 10C). Além disso, o tratamento dos fibroblastos com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) nas concentrações de 1,0 mM e 1,5 mM elevou significativamente a expressão relativa do RNAm da metaloproteinase de matriz do tipo 9 (*MMP-9*), quando comparadas ao controle (Figura 10D).

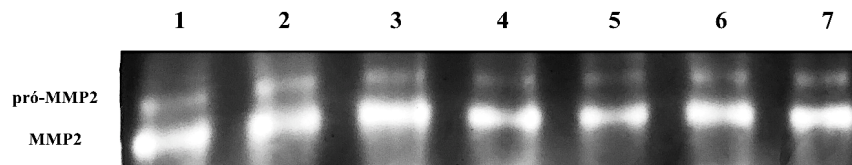


**Figura 10.** Análise da expressão relativa do RNAm dos genes de A) *MMP-1*, B) *MMP-2*, C) *MMP-3* e D) *MMP-9* em fibroblastos humanos da linhagem HFF-1, tratados com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações. O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de três ensaios independentes; \*,  $p < 0,05$ . CTRL, fibroblastos cultivados somente em meio DMEM e com expressão relativa considerada como 100%; BC, tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM; HBC, tratamento com soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM. As expressões dos RNAm dos genes de *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3* e *MMP-9* foram normalizadas pela expressão do RNAm do gene *GAPDH*. Tratamento de 48 h. Teste estatístico: *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

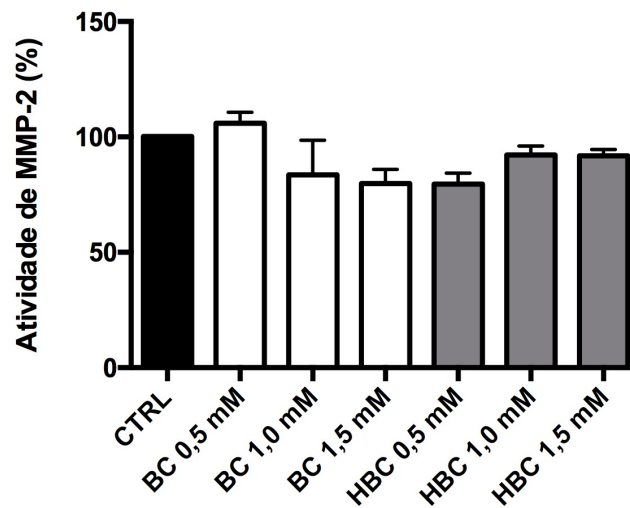
#### 4.5 Avaliação da atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9 em células com soluções de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em diferentes concentrações.

A fim de avaliar a atividade proteolítica das gelatinases MMP-2 e MMP-9 o meio de cultivo dos fibroblastos tratados por 48 horas com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em diferentes concentrações foi analisado por zimografia usando gelatina como substrato. A densidade das bandas correspondentes à massa molecular específica das metaloproteinases foi medida e o resultado apresentado graficamente como porcentagem da atividade de MMP-2, para as bandas correspondentes à massa molecular aproximada de 69 kDa. Os fibroblastos que receberam tratamento foram comparados ao controle, cultivado somente com DMEM, e que representou 100% da atividade enzimática.

Os resultados obtidos neste ensaio sugerem que o tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em diferentes concentrações não foi capaz de alterar a atividade enzimática de MMP-2, quando esta foi comparada ao controle (Figuras 11 e 12). As bandas referentes à atividade de MMP-9 não foram visualizadas.



**Figura 11. Avaliação da atividade de metaloproteinase 2 por zimografia.** Amostras dos meios de cultivo das células (CCD1059Sk) tratadas com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) em diferentes concentrações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com 1% de gelatina. 1 corresponde ao controle; 2, 3 e 4, tratamento com BC 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM, respectivamente; 5, 6 e 7, tratamento com HBC 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM, respectivamente. A banda de 72 kDa refere-se à MMP-2 inativa (pró-MMP-2) e a de 69 kDa corresponde à MMP-2 ativa. Tratamento 48h, n = 3.

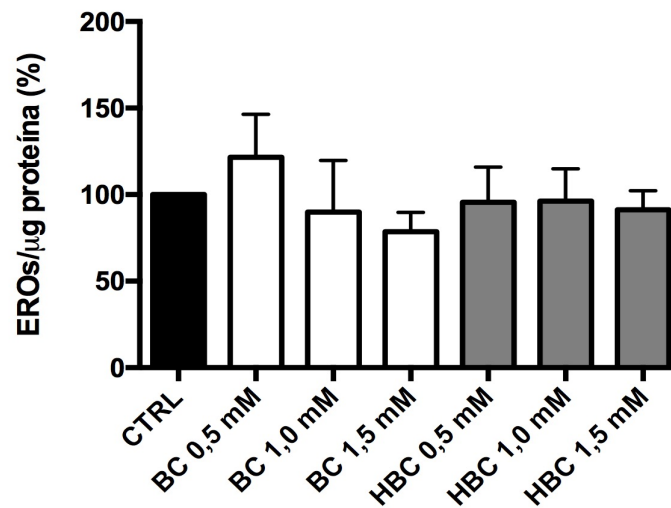


**Figura 12. Porcentagem de atividade de MMP-2.** O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de três replicatas independentes. CTRL, fibroblastos (CCD1059Sk) cultivados somente em meio DMEM e com atividade de MMP-2 considerada como 100%; BC, tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM; HBC, tratamento com soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM. A porcentagem de atividade foi calculada a partir da intensidade das bandas do gel de zimografia correspondentes à MMP-2 ativa (69 kDa), quantificadas pelo *software* ImageJ através da ferramenta *integrated density*. Tratamento de 48 h. Teste estatístico: *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.6 Efeito das soluções de $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina na geração de espécies reativas de oxigênio por fluorescência.

A geração de espécies reativas de oxigênio nas células foi avaliada após o tratamento dos fibroblastos dérmicos humanos com diferentes concentrações de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, utilizando o método da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) por EROs, formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde. Desta forma, a geração de espécies reativas de oxigênio foi diretamente proporcional à intensidade de fluorescência da DCFoxi. A intensidade da fluorescência gerada foi então normalizada pela quantidade de proteínas nas amostras.

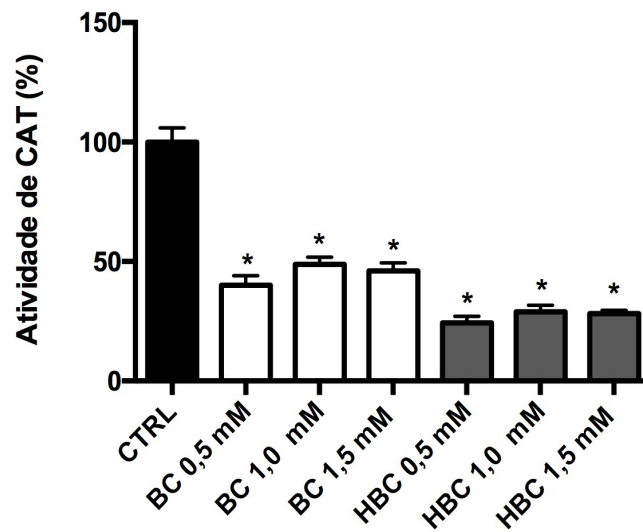
Não foi possível observar um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio após o tratamento dos fibroblastos com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 1,5 mM, sugerindo que as ciclodextrinas por si só não foram capazes de aumentar o estresse oxidativo intracelular (Figura 13).



**Figura 13. Efeito das soluções de  $\beta$ -ciclodextrina (BC) ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em fibroblastos humanos CCD1059Sk.** O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de três ensaios independentes. CTRL, controle, células cultivadas somente em meio DMEM, e com geração de EROs considerada como 100%; BC, tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina; HBC, tratamento com soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Após o tratamento de 48 h, as células foram tratadas com DCFH que é oxidada pelas EROs a DCFoxi. A fluorescência deste composto foi detectada no comprimento de onda de 485 nm e é proporcional ao estado oxidativo da célula. Teste estatístico: *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.7 Avaliação da atividade de catalase.

A atividade da enzima catalase, responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, foi medida nas células (Aebi, 1984; Weydert e Cullen, 2010). Os resultados deste estudo demonstram que o tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina em diferentes concentrações provocaram uma redução estatisticamente significativa de mais de 50% da atividade de catalase, enquanto as soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em diferentes concentrações reduziram significativamente a atividade desta enzima em mais de 70% quando comparados ao controle, de células cultivadas somente com DMEM e cuja atividade de catalase foi considerada como 100% (Figura 14).

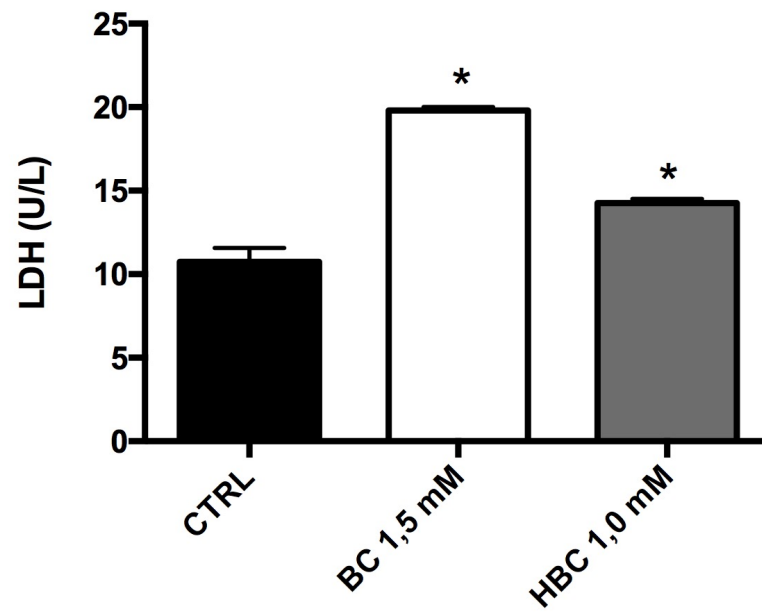


**Figura 14. Efeito das soluções de  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em fibroblastos humanos CCD1059Sk na atividade de catalase.** O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de três ensaios independentes; \*,  $p < 0,05$ . CTRL, controle, células tratadas somente em meio DMEM, e com atividade enzimática considerada como 100%; BC, tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina; HBC, tratamento com soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Após o tratamento, o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima catalase através do monitoramento do consumo de  $H_2O_2$  10 mM em espectrofotômetro a 240 nm. Teste estatístico: *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.

#### 4.8 Análise da liberação de LDH pelos fibroblastos dérmicos humanos CCD1059Sk tratados com $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

A lactato desidrogenase é uma enzima presente em inúmeros tecidos e é naturalmente encontrada no interior das células. Desta forma, quando a LDH extravasa para o meio extracelular isto se torna um sinal que ocorreu algum dano à membrana celular, e como a LDH é uma enzima estável, a liberação da mesma pode ser quantificada e utilizada como avaliação de citotoxicidade.

Os resultados deste ensaio demonstram que o tratamento das células com  $\beta$ -ciclodextrina (BC) na concentração de 1,5 mM foi capaz de aumentar a liberação de LDH em praticamente duas vezes quando comparado ao controle. Além disto, a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC) na concentração de 1,0 mM também provocou um aumento significativo no extravasamento de LDH das células (Figura 15). Os resultados estão expressos em unidades de LDH/L.



**Figura 15.** Avaliação do efeito das soluções de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina no extravasamento da enzima LDH em fibroblastos humanos CCD1059Sk. O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de três ensaios independentes; \*,  $p < 0,05$ . CTRL, controle, células cultivadas somente em meio DMEM, e com atividade enzimática considerada como 100%; BC, tratamento com soluções de  $\beta$ -ciclodextrina; HBC, tratamento com soluções de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Após o tratamento, o meio de cultura foi utilizado para quantificar a enzima LDH. Teste estatístico: *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.



## 5. DISCUSSÃO

Ter uma pele envelhecida precocemente pela ação do ambiente externo a que estamos expostos tem consequências bem mais relevantes e preocupantes que os efeitos estéticos. O envelhecimento extrínseco causa alterações morfológicas importantes na estrutura da pele, como destruição da matriz extracelular dérmica pela atividade exacerbada das MMP, redução da proliferação dos fibroblastos, perda da elasticidade, adelgaçamento da epiderme, ou até mesmo o aparecimento de neoplasias como o melanoma (Jenkins, 2002; Kammeyer e Luiten, 2015; Pittayapruek et al., 2016; Tobin, 2017). Com todas estas modificações, as funções da pele como proteção contra agente xenobióticos, e regulação térmica e hidroeletrolítica ficam comprometidas, podendo reduzir a homeostase corporal e originando processos patológicos (Lai-Cheong e McGrath, 2013; Pittayapruek et al., 2016). Apesar da radiação UV, a que estamos expostos diariamente, ser o principal fator causador do processo de envelhecimento extrínseco (Clark et al., 2008; Pittayapruek et al., 2016), não podemos deixar de lado outros agentes provenientes do ambiente externo que podem contribuir para este fenômeno.

As ciclodextrinas, de uma forma geral, não são consideradas tóxicas (Gould e Scott, 2005). Chen e colaboradores, avaliando os níveis de colesterol celular *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que a 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em altas concentrações (maiores que 6%) não reduziu significativamente a viabilidade celular (Chen et al., 2010). Além disto, Li e colaboradores mostraram em seus estudos que diferentes concentrações  $\beta$ -ciclodextrina não causaram diferença significativa na viabilidade de fibroblastos, mesmo em períodos de tratamento de 72 h (Li et al., 2014). Corroborando com esses achados, as concentrações de  $\beta$ -ciclodextrinas e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina avaliadas neste trabalho também não foram capazes de reduzir a viabilidade de fibroblastos, tanto da linhagem CCD1059Sk quanto da linhagem HFF-1. As concentrações de ciclodextrinas usadas neste trabalho são concentrações baixas quando comparadas com os outros estudos citados (Gould e Scott, 2005; Chen et al., 2010; Li et al., 2014).

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dérmica, representando cerca de 97,5% da mesma, e sintetizado primariamente como pró-colágeno (Patino et al., 2002; Calleja-Agius et al., 2013; Choi et al., 2013). A sua expressão gênica é modulada pela via de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e dependente da ativação do fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) (Pittayapruek et al., 2016). Como já é bem conhecido que o colesterol é capaz de modular a sinalização celular, e alguns estudos têm demonstrado os seus efeitos sobre a sinalização intracelular dependente das MAPK (Maxfield e Tabas, 2005; Haque et al., 2016;), neste estudo a expressão gênica de

colágeno do tipo I foi avaliada após tratamento das células com dois diferentes tipos de ciclodextrinas, e foi observado que o tratamento com  $\beta$ -ciclodextrina, em diferentes concentrações, foi capaz de reduzir a expressão de RNAm do gene do COL1A1 em fibroblastos dérmicos humanos. Kim e colaboradores mostraram em um de seus trabalhos que a depleção de colesterol em células HaCaT, causada pelo tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD), causou o aumento da fosforilação de ERK e JNK e, conseqüentemente, a ligação do fator de transcrição AP-1 ao DNA. Com o aumento da atividade do AP-1, a ativação e sinalização do TGF- $\beta$  podem ser inibidas e, conseqüentemente, levar à uma redução da síntese de colágeno (Maxfield e Tabas, 2005; Kim et al., 2007; Chen et al., 2015).

Após avaliar a expressão gênica de colágeno, a expressão relativa do RNAm do gene do inibidor tecidual de metaloproteinases de matriz I (*TIMP-1*) nos fibroblastos tratados com CDs foi quantificada. A  $\beta$ -ciclodextrina, em pelo menos uma das concentrações estudadas, foi capaz de reduzir a expressão relativa deste gene em ambas as linhagens de fibroblastos estudadas (CCD1059Sk e HFF-1). O TIMP-1 é uma proteína responsável por inibir a atividade catalítica de metaloproteinases de matriz ligando-se diretamente a elas e formando complexos não covalentes na proporção 1:1 (Fisher et al., 2009). De forma similar às MMPs, a expressão do RNAm do gene do *TIMP-1* também é regulada pela via de sinalização das MAPK, e a conseqüente fosforilação de ERK, JNK e p38, que levam à ativação do fator de transcrição AP-1, pode reduzir a expressão de *TIMP-1* (Kammeyer e Luiten, 2015; Murphy, 2011). O colesterol está associado à regulação negativa do AP-1 (Kim et al., 2007), e a sua depleção causada pelas CDs pode levar a uma diminuição na expressão de *TIMP-1*.

A MMP-14, também conhecida como MT1-MMP, é uma enzima localizada na membrana das células e possui um domínio C-terminal transmembrana adicional além de uma pequena cauda citoplasmática (Pittayapruek et al., 2016). A sua principal função é promover a ativação de outras MMPs localizadas na matriz extracelular (MEC), mas ela também é capaz de degradar por si só a MEC, tendo assim um importante papel tanto no envelhecimento da pele, como também no aumento da capacidade de metástase de algumas células cancerígenas (Oh et al., 2011; de Oliveira Poswar et al., 2015; Pittayapruek et al., 2016). Desta forma, um aumento na expressão de *MMP-14*, como observado neste trabalho pelo tratamento das células com as soluções de  $\beta$ -ciclodextrina, associado a uma redução de *TIMP-1*, pode levar à ativação de outras MMPs responsáveis pela degradação do colágeno e fibras elásticas da MEC, como a MMP-1, a MMP-2, a MMP-3 e a MMP-9.

A MT1-MMP (MMP-14) está localizada nas membranas celulares e alguns estudos já demonstraram sua localização nas cavéolas, principalmente em regiões onde se encontra a caveolina-1 (Annabi et al., 2001; Remacle, 2003; Yang et al., 2016). A internalização da MMP-14 localizada nas cavéolas é importante para sua reciclagem e este fenômeno provoca a sua perda de atividade. Uma redução da internalização da MMP-14 pode aumentar a sua atividade, aumentando diretamente a degradação da matriz extracelular e ativando outras MMP.

Ga e colaboradores observaram em seu trabalho (2004) que a depleção de colesterol das cavéolas de células endoteliais humanas, causada pelo tratamento com 1  $\mu$ M de metil- $\beta$ -ciclodextrina, bloqueou em quase 100% a internalização da metaloproteinase de membrana do tipo I (Ga et al., 2004).

A expressão gênica de outras MMPs importantes para a degradação da MEC dérmica também foram avaliadas. A MMP-1, principal colagenase expressa na pele, está envolvida na degradação do colágeno intacto da matriz extracelular dérmica (Kammeyer e Luiten, 2015; Pittayapruek et al., 2016). Kim e colaboradores (2010) verificaram que o tratamento de fibroblastos com colesterol reduziu a expressão de MMP-1 através da diminuição da fosforilação de ERK1/2 e JNK. Além disto, os autores também mostraram que a depleção de colesterol causada pelo tratamento com 10 mM de metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) provocou o aumento da expressão de *MMP-1* em fibroblastos dérmicos humanos provenientes de cultura primária (Kim et al., 2010a). Apesar dos resultados previamente publicados, que utilizaram uma alta concentração de ciclodextrina, terem demonstrado um aumento da expressão de *MMP-1*, os resultados deste trabalho não demonstram mudanças significativas no padrão de expressão de *MMP-1* dos fibroblastos tratados com  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas diferentes concentrações estudadas.

A MMP-3 faz parte das metaloproteinases de matriz expressas na pele e é classificada como estromelisina. Ela possui papel fundamental na degradação de colágeno do tipo I, e na ativação de MMP-1 e também de pró-MMPs, como a MMP-2. Sua expressão, assim como outras MMPs, também é controlada pela cascata de sinalização das MAPK (Park et al., 2004; Pittayapruek et al., 2016). Wang e colaboradores (2017) avaliaram a expressão de *MMP-3* em condrócitos humanos tratados com anemonina, um agente atenuador da osteoartrite, reconstituída em uma solução a 50% de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Os resultados deste trabalho mostraram que a expressão de *MMP-3* aumentou significativamente quando as células foram tratadas com o composto reconstituído em ciclodextrina (Wang et al., 2017). Os resultados obtidos na análise quantitativa de expressão relativa de *MMP-3* mostraram que

a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina não foi capaz de modificar a expressão deste gene em fibroblastos HFF-1. Entretanto, o tratamento com  $\beta$ -ciclodextrina na concentração de 1,5 mM aumentou a expressão do RNAm do gene da *MMP-3* quando comparada ao controle. Um aumento da expressão e atividade de *MMP-3* pode levar a uma maior degradação do colágeno da MEC, exacerbando assim os sinais do envelhecimento da pele.

A expressão relativa do RNAm do gene da gelatinase de 92 kDa (*MMP-9*) também foi avaliada e os resultados mostraram que o tratamento com  $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações de 1,0 mM e 1,5 mM provocou um aumento significativo da expressão deste gene quando comparado à expressão do RNAm do gene nas células não tratadas (CTRL). Na pele, a *MMP-9* é responsável pela degradação de colágeno do tipo IV, localizado principalmente na junção derme-epiderme e que possui função de auxiliar na ancoragem da epiderme à derme (Thompson e Maibach, 2010; Pittayapruek et al., 2016). Assim, o aumento da expressão de *MMP-9* pode provocar um achatamento da junção dermo-epidérmica provocado pela degradação do colágeno nesta região, uma das características morfológicas da pele envelhecida. Kim e colaboradores (2007) demonstraram em seus estudos que o tratamento de queratinócitos com 10 mM de M $\beta$ CD aumentou significativamente a expressão de *MMP-9*, e que a adição de colesterol posteriormente conseguiu reverter este efeito. Eles também conseguiram correlacionar a expressão de *MMP-9* com o aumento da fosforilação de MAPK, como ERK, JNK, c-Jun e c-Fos (Kim et al., 2007). Além do envelhecimento, o aumento da expressão e atividade de *MMP-9* pode influenciar na migração e invasão de células cancerígenas, pois, além de degradar a MEC e facilitar a migração celular, esta metaloproteinase está intimamente envolvida na regulação da atividade de inúmeros fatores de crescimento tumorais e citocinas, afetando a resposta imunológica e a angiogênese de tumores (Kuivanen et al., 2009; Hernández-Pérez et al., 2012; Xia et al., 2013).

Os efeitos que as CDs podem causar diretamente na expressão relativa do RNAm do gene da *MMP-2* em fibroblastos ainda não foram estudados. Os resultados deste estudo mostraram que o tratamento de fibroblastos da linhagem HFF-1 com  $\beta$ -ciclodextrina na concentração de 1,5 mM foi capaz de aumentar a expressão da *MMP-2* em relação ao grupo controle. Já a ativação enzimática da pró-MMP2 em MMP-2 ativa é um mecanismo complexo, que envolve a formação de um complexo desta com a MT1-MMP (*MMP-14*) e a MT2-MMP. Alguns estudos têm demonstrado que a depleção de colesterol aumenta a ativação de MMP-2 em diferentes tipos celulares. Zou e colaboradores, em 2014, observaram um aumento significativo da ativação de pró-MMP2 em MMP-2 quando células de neuroglioma foram tratadas com metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) nas concentrações de 0,8 mM

e 1,6 mM. Neste mesmo estudo, os autores avaliaram os efeitos da depleção de colesterol na ativação da via de sinalização das MAPK, mostrando que o tratamento com M $\beta$ CD, em diferentes concentrações, foi capaz de aumentar a fosforilação de ERK (Zou et al., 2014). No estudo de Souza (2016) foi observado o aumento da ativação de MMP-2 quando fibroblastos dérmicos humanos eram tratados com 2,0 mM de  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Souza, 2016). Apesar de Kim e colaboradores (2010) também terem demonstrado em seu trabalho que o tratamento com M $\beta$ CD nas concentrações de 0,5% e 1% provocaram um aumento na ativação de MMP-2 em fibroblastos (Ellerbroek e Stack, 1999; Kim et al., 2010b), os resultados deste estudo sugerem que o tratamento com  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, nas concentrações estudadas, não foi capaz de aumentar significativamente a ativação de MMP-2.

Diversos estudos têm relacionado a atividade de MMP com a invasão de células do câncer de pele, tanto melanoma como não-melanoma, pois estas enzimas são responsáveis pela degradação ativa das proteínas da MEC (Leight et al., 2015). Acredita-se que as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 possuem um papel crucial na progressão de células do melanoma (Rotte et al., 2012). Como mencionado anteriormente, a MMP-9 participa da quebra do colágeno tipo IV, localizado na junção dermo-epiderme da pele, local onde se encontra a maior parte dos melanócitos (Costin e Hearing, 2007; Lai-Cheong e McGrath, 2013; D’Mello et al., 2016). Assim, o aumento da expressão e atividade de MMP-9 auxilia na migração das células de melanoma para a derme.

Logo após a secreção da pró-MMP2 pelos fibroblastos na MEC, a MMP-14 ativa-a provocando o aumento da degradação das fibras de colágeno hidrolisadas presentes na MEC dérmica. Este processo deixa a MEC mais frouxa para a migração das células cancerígenas, as quais conseguem atingir os capilares sanguíneos presentes na derme, aumentando assim o poder de metástase do melanoma (Hofmann et al., 2005; Kondratiev et al., 2008; Väisänen et al., 2008). Uma das terapias adjuvantes que tem sido bastante utilizada no tratamento do melanoma é a terapia fotodinâmica. Entretanto, diversos fármacos utilizados neste tipo de procedimento estão sendo encapsulados com ciclodextrinas (Filippone et al., 2002; Kato et al., 2010; Rigon et al., 2015). Como as ciclodextrinas são conhecidas por causar depleção de colesterol nas células, e isto pode provocar o aumento da expressão e atividade de MMP, incluindo a MMP-2, a utilização deste adjuvante na formulação de antineoplásicos utilizados no tratamento do melanoma precisa ser avaliada com cautela.

Após avaliar o efeito da  $\beta$ -ciclodextrina e da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina na expressão das principais metaloproteinases de matriz da pele, um estudo sobre o efeito destes adjuvantes

farmacêuticos no estado redox das células foi realizado. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são radicais livres comumente produzidos durante o metabolismo aeróbio celular, mas muitos estudos têm demonstrado suas habilidades em causar danos às biomoléculas, incluindo modificações ao DNA e proteínas, provocando assim uma série de condições patológicas, além de acelerar o envelhecimento (Droge e Droge, 2002; Jenkins, 2002). Além disso, as EROs são um dos principais fatores que levam ao aumento da expressão de metaloproteinases de matriz. Elas funcionam como segundos mensageiros intracelulares ativando a via de sinalização das MAPK, aumentando a ligação do fator de transcrição AP-1 ao DNA e a expressão de MMP (Kim et al., 2011; Chiang et al., 2013). Nenhum estudo recente, que correlaciona diretamente o tratamento com  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina com a geração de EROS em fibroblastos, foi encontrado na literatura. O tratamento de fibroblastos com  $\beta$ -ciclodextrina ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina não causaram um aumento significativo na geração de EROs nas células. Portanto, esses resultados sugerem que o aumento intracelular de EROs não foi o principal mecanismo pelo qual a expressão de MMP-14 foi elevada e as expressões de COL1A1 e TIMP-1 foram reduzidas nos fibroblastos CCD1059Sk.

A catalase (CAT) é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Fita et al., 1986; Alfonso-Prieto et al., 2009), sendo assim, uma enzima antioxidante que previne o processo de envelhecimento, tanto intrínseco quanto extrínseco (Giacomoni et al., 2000; Hellemans et al., 2003). Logo, uma redução da atividade da CAT pode contribuir para o acúmulo de EROs dentro das células, culminando em todos os danos que elas podem causar, como aumento da expressão de MMP e diminuição da expressão de COL1A1 e TIMP-1 (Kawaguchi et al., 1996; Rhie et al., 2001). Alguns estudos têm demonstrado que a ativação de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) possui um papel fundamental no balanço redox das células na pele, principalmente no aumento da expressão e atividade da catalase (Berger e Moller, 2002; Girnun et al., 2002; Shin et al., 2016). A maioria dos ligantes endógenos de PPAR pertence à família dos ácidos graxos e dos produtos de seus metabolismos (Krey et al., 1997; Bishop-Bailey e Wray, 2003; Desvergne et al., 2004), e como as ciclodextrinas possuem uma alta afinidade por moléculas apolares (Kurkov e Loftsson, 2013) elas possivelmente são capazes de se ligar a estes ligantes, formando complexos de inclusão. Desta forma, a expressão e atividade da catalase podem ser reduzidas em consequência de uma menor ativação de receptores PPAR.

O colesterol é o principal componente das cavéolas, microdomínios especializados de membrana também conhecidas como *lipid rafts*, as quais são importantes para a estrutura da

membrana celular e também são responsáveis pela modulação da fluidez da membrana. Além disso, o colesterol presente nas cavéolas possui os papéis de aumentar a espessura da membrana e reduzir sua permeabilidade (Demel e De Kruffy, 1976; Brown e London, 2000; Simons e Toomre, 2000). Os resultados do aumento da liberação de LDH, após tratamento das células com ambas as ciclodextrinas estudadas, demonstram uma redução significativa da permeabilidade seletiva da membrana celular, a qual possivelmente pode ser explicada pela depleção de colesterol causada pelas CDs (Schönfelder et al., 2006). Ademais, alguns estudos têm utilizado ciclodextrinas como depletoras de colesterol das cavéolas com o objetivo de induzir a apoptose em células cancerígenas através da ativação de caspases (Motoyama et al., 2009; George et al., 2012; Onodera et al., 2013). Assim, dependendo do nível do dano à membrana causado pelas CDs elas podem ativar uma cascata de sinalização apoptótica intracelularmente.

Uma possível depleção do colesterol localizado nas cavéolas pode provocar também uma ruptura destas estruturas e, por conseguinte, alterar o perfil de sinalização intracelular. A caveolina-1, proteína sinalizadora nas cavéolas é capaz de modificar a cascata intracelular de MAPK. Alguns estudos já demonstraram que a caveolina-1 aumenta a fosforilação de p38 ao mesmo tempo que inibe a fosforilação de JNK, ERK1/2 e Akt (Qin et al., 2016). Nenhum trabalho que demonstra efeitos diretos das ciclodextrinas sobre as caveolinas foi encontrado. Entretanto, se elas forem capazes de retirar a caveolina-1 juntamente com o colesterol, já que a mesma encontra-se ligada a ele nas cavéolas, ou até mesmo de alguma forma provocar a perda da atividade desta proteína, a modificação da cascata de sinalização das MAPK que culmina na redução da expressão de MMP estaria comprometida. Por exemplo, a diminuição da fosforilação de p38 aumentaria a atividade do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), pois a atividade deste é suprimida pela p38 (Wang et al., 2006; Jagielska et al., 2012; Qin et al., 2016).

O mecanismo de depleção do colesterol das membranas pelas ciclodextrinas é bastante complexo e pode envolver diversos fatores (Grauby-Heywang e Turlet, 2008). Sabe-se que a  $\beta$ -ciclodextrina é a mais eficiente na extração de colesterol dentre os diferentes tipos de CDs naturais existentes (López et al., 2011). Entretanto, diferenças no nível de depleção podem ser encontradas quando são feitas modificações químicas, como a hidroxipropilação, em sua superfície externa (Tsamaloukas et al., 2005; López et al., 2011). Duas moléculas juntas de  $\beta$ -ciclodextrina são necessárias para extrair de forma eficaz o colesterol da membrana, e estudos já foram capazes de demonstrar que a dimerização de unidades de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina não acontece de forma tão espontânea quanto ocorre para a  $\beta$ -ciclodextrina não

modificada. Além disto, a eficiência de extração do colesterol pelas ciclodextrinas também depende da dose utilizada (López et al., 2011; López et al., 2013), podendo de certa forma explicar porque o tratamento das células com a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações utilizadas neste estudo não foram capazes de proporcionar resultados significativos em relação à expressão dos genes alvos estudados.

Desta forma, podemos concluir que o tratamento com  $\beta$ -ciclodextrina provocou um aumento significativo na expressão de importantes metaloproteinases de matriz presentes na pele, além de reduzir a expressão de genes do colágeno e do inibidor tecidual de metaloproteinase do tipo 1. Apesar de um aumento no estresse oxidativo não ter sido observado, as CDs estudadas reduziram a atividade de uma importante enzima antioxidante encontrada na pele, a catalase. Um desequilíbrio homeostático provocado pelo aumento da expressão e atividade de MMP, pela redução da produção de colágeno e por danos ao sistema antioxidante natural da pele podem culminar no envelhecimento precoce da pele.



## 6. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo sugerem que o tratamento dos fibroblastos (CCD1059Sk e HFF-1) com  $\beta$ -ciclodextrina é capaz de modificar o seu perfil de expressão gênica, aumentando a expressão de importantes metaloproteinases de matriz, como a MMP-14, a MMP-2, a MMP-3 e a MMP-9, e reduzindo a expressão de COL1A1 e TIMP-1. Além disso, a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, na concentração de 1,0 mM também produziu um aumento da expressão de MMP-14 nos fibroblastos HFF-1. Apesar das CDs nas concentrações testadas não terem provocado alterações no perfil de atividade da MMP-2, outros estudos utilizando concentrações superiores destes compostos demonstraram esse efeito. A análise da liberação de LDH sugere que uma perda da permeabilidade da membrana plasmática foi ocasionada pelo tratamento com ambas as ciclodextrinas estudadas. Como as CDs são bem conhecidas como depletoras de colesterol das membranas, estes resultados poderiam estar correlacionados com este fenômeno causado por elas, o que estaria ativando a cascata de sinalização das MAPK e também causando danos à estrutura das membranas. Apesar do fato das ciclodextrinas estudadas não terem sido capazes de induzir por si só um estresse oxidativo nos fibroblastos, ambas  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina diminuíram a atividade da catalase, uma enzima importante do sistema antioxidante das células. Sabe-se que as ciclodextrinas são extensamente utilizadas como carreadoras de fármacos, liberando-os de sua cavidade quando encontram as células alvo. Entretanto, não se sabe o que acontece com as CDs após a liberação dos fármacos e ativos cosméticos nos sítios alvo, antes de sua degradação. Ademais, nenhum estudo já publicado mostra uma comparação entre a afinidade das CDs pelo colesterol e pelos fármacos encapsulados. Concluindo, este trabalho sugere que as  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina não são adjuvantes farmacêuticos completamente inertes, que, principalmente a  $\beta$ -ciclodextrina, pode influenciar no processo de envelhecimento da pele, e que, de acordo com os resultados obtidos para as condições estudadas, poderia até mesmo promover uma situação benéfica para o desenvolvimento de metástase de células cancerígenas, uma vez que aumenta a degradação da MEC e a expressão de MMP-2.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.

Al-Nuaimi Y, Sherratt MJ, Griffiths CEM. Skin health in older age. *Maturitas* 2014. doi:10.1016/j.maturitas.2014.08.005.

Alfonso-Prieto M, Biarnés X, Vidossich P, Rovira C. The molecular mechanism of the catalase reaction. *J Am Chem Soc* 2009;131:11751–61. doi:10.1021/ja9018572.

Annabi B, Lachambre M, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Beliveau R. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J* 2001. doi:10.1042/0264-6021:3530547.

Atkinson SJ, English JL, Holway N, Murphy G. Cellular cholesterol regulates MT1 MMP dependent activation of MMP 2 via MEK-1 in HT1080 fibrosarcoma cells. *FEBS Lett* 2004;566:65–70. doi:10.1016/j.febslet.2004.04.040.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005. doi:10.1016/j.cell.2005.02.001.

Bass D, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983. doi:AT0015.

Belloq NC, Pun SH, Jensen GS, Davis ME. Transferrin-Containing, Cyclodextrin Polymer-Based Particles for Tumor-Targeted Gene Delivery. *Bioconjug Chem* 2003;14:1122–32. doi:10.1021/bc034125f.

Berger J, Moller DE. The Mechanisms of Action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409–35. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.104018.

Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 2006. doi:10.1038/sj.jid.5700340.

Bishop-Bailey D, Wray J. Peroxisome proliferator-activated receptors: A critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003;71:1–22. doi:10.1016/S0090-6980(03)00003-0.

Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000;275:17221–4. doi:10.1074/jbc.R000005200.

Caffrey M. Membranes: Membrane form and function in finer focus. *Curr Opin Struct Biol* 2002. doi:10.1016/S0959-440X(02)00349-4.

Calleja-Agius J, Brincat M, Borg M. Skin connective tissue and ageing. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2013. doi:10.1016/j.bpobgyn.2013.06.004.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech* 2005;6:E329–57. doi:10.1208/pt060243.

Chen BIN, Li RAN, Yan N, Chen G, Qian WEN, Jiang HUILI. Astragaloside IV controls collagen reduction in photoaging skin by improving transforming growth factor- $\beta$  / Smad signaling suppression and inhibiting matrix metalloproteinase-1 2015:3344–8. doi:10.3892/mmr.2015.3212.

Chen FW, Li C, Ioannou YA. Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One* 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0015054.

Chiang HM, Chen HC, Chiu HH, Chen CW, Wang SM, Wen KC. Neonauclea reticulata (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after uvb exposure via Ros scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2013;2013. doi:10.1155/2013/324864.

Choi JW, Kwon SH, Huh CH, Park KC, Youn SW. The influences of skin visco-elasticity, hydration level and aging on the formation of wrinkles: A comprehensive and objective approach. *Ski Res Technol* 2013. doi:10.1111/j.1600-0846.2012.00650.x.

Chu C-Y, Cha S-T, Chang C-C, Hsiao C-H, Tan C-T, Lu Y-C. Involvement of matrix metalloproteinase-13 in stromal-cell-derived factor 1 alpha-directed invasion of human basal cell carcinoma cells. *Oncogene* 2007. doi:10.1038/sj.onc.1210040.

Ciurea ME, Cernea D, Georgescu CC, Cotoi OS, Pătrașcu V, Pârvănescu H. Expression of CXCR4, MMP-13 and  $\beta$ -catenin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2013.

Clark I, Swingler T, Sampieri C, Edwards D. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1362–78. doi:10.1016/j.biocel.2007.12.006.

Costin G-E, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 2007. doi:10.1096/fj.06-6649rev.

Crini G. Review: A history of cyclodextrins. *Chem Rev* 2014. doi:10.1021/cr500081p.

D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci* 2016. doi:10.3390/ijms17071144.

Demel RA, De Kruyff B. The function of sterols in membranes. *BBA - Rev Biomembr* 1976;457:109–32. doi:10.1016/0304-4157(76)90008-3.

Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Be Fit or Be Sick: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Are Down the Road. *Mol Endocrinol* 2004;18:1321–32. doi:10.1210/me.2004-0088.

Droge W, Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.

Ellerbroek SM, Stack MS. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *BioEssays* 1999;21:940–9. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199911)21:11<940::AID-BIES6>3.0.CO;2-J.

Fielding CJ, Fielding PE. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev* 2001. doi:10.1016/S0169-409X(01)00140-5.

Filippone S, Heimann F, Rassat A. A highly water-soluble 2:1  $\beta$ -cyclodextrin-fullerene conjugate. *Chem Commun* 2002. doi:10.1039/b202410a.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000. doi:10.1038/35041687.

Fisher GJ, Quan T, Purohit T, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Collagen Fragmentation Promotes Oxidative Stress and Elevates Matrix Metalloproteinase-1 in Fibroblasts in Aged Human Skin 2009;174:101–14. doi:10.2353/ajpath.2009.080599.

Fita I, Silva AM, Murthy MRN, Rossmann MG. The refined structure of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr Sect B* 1986;42:497–515. doi:10.1107/S0108768186097835.

Flasinski M, Broniatowski M, Majewski J, Dynarowicz-Latka P. X-ray grazing incidence diffraction and Langmuir monolayer studies of the interaction of beta-cyclodextrin with model lipid membranes. *J Colloid Interface Sci* 2010. doi:DOI 10.1016/j.jcis.2010.04.086.

Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci* 1995. doi:10.1073/pnas.92.19.8655.

Furuchi T, Anderson RGW. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem* 1998;273:21099–104. doi:10.1074/jbc.273.33.21099.

Ga BG, Vicente-manzanares M, Sa F, Arroyo AG, Gálvez BG, Matías-Román S. Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2004. doi:10.1091/mbc.E03-07-0516rE03-07-0516 [pii].

George KS, Elyassaki W, Wu Q, Wu S. The role of cholesterol in UV light B-induced apoptosis. *Photochem. Photobiol.*, vol. 88, 2012, p. 1191–7. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.01038.x.

Giacomini PU, Declercq L, Hellemans L, Maes D. Aging of human skin: review of a mechanistic model and first experimental data. *IUBMB Life* 2000;49:259–63. doi:10.1080/15216540050033104.

Gidwani B, Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *Biomed Res Int* 2015. doi:10.1155/2015/198268.

Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins MEC. Identification of a Functional Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element in the Rat Catalase Promoter. *Mol Endocrinol* 2002;16:2793–801. doi:10.1210/me.2002-0020.

Goodsell D (RCSB PDB. Catalase. Rcsb Pdb-101 2004. doi:10.2210/rcsb.

Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. *Food Chem Toxicol* 2005;43:1451–9. doi:10.1016/j.fct.2005.03.007.

Grauby-Heywang C, Turlet J-M. Study of the interaction of beta-cyclodextrin with phospholipid monolayers by surface pressure measurements and fluorescence microscopy. *J Colloid Interface Sci* 2008. doi:10.1016/j.jcis.2008.03.025.

Haake A, Scot GA, Holbrook KA. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. *Biol. Ski.*, 2001.

Haque MZ, McIntosh VJ, Abou Samra AB, Mohammad RM, Lasley RD, Saka S. Cholesterol Depletion Alters Cardiomyocyte Subcellular Signaling and Increases Contractility. *PLoS One* 2016;11:e0154151. doi:10.1371/journal.pone.0154151.

Hellemans L, Corstjens H, Neven A, Declercq L, Maes D. Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery. *J Invest Dermatol* 2003;120:434–9. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12056.x.

Henderson BW, Dougherty TJ. HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK? *Photochem Photobiol* 1992. doi:10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x.

Hernández-Pérez M, El-Hajahmad M, Massaro J, Mahalingam M. Expression of gelatinases (MMP-2, MMP-9) and gelatinase activator (MMP-14) in actinic keratosis and in in situ and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2012. doi:10.1097/DAD.0b013e31824b1ddf.

Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005. doi:10.1016/j.biochi.2005.01.013.

Huang YY, Sharma SK, Yin R, Agrawal T, Chiang LY, Hamblin MR. Functionalized fullerenes in photodynamic therapy. *J Biomed Nanotechnol* 2014. doi:10.1166/jbn.2014.1963.

Hwang K, Yi B, Choi K. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations. *Lab Anim Res* 2011. doi:10.5625/lar.2011.27.1.1.

Jagielska J, Kapopara PR, Salguero G, Scherr M, Schütt H, Grote K. Interleukin-1 $\beta$  assembles a proangiogenic signaling module consisting of caveolin-1, Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK), and mapk-activated protein kinase 2 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012. doi:10.1161/ATVBAHA.111.243477.

Jenkins G. Molecular mechanisms of skin aging. *Adv Dermatol* 2002;10:63–75; discussion 76.

Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev* 2015;21:16–29. doi:10.1016/j.arr.2015.01.001.

Kato S, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N. Fullerene-C60/liposome complex: Defensive effects against UVA-induced damages in skin structure, nucleus and collagen type I/IV fibrils, and the permeability into human skin tissue. *J Photochem Photobiol B Biol* 2010. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.11.010.

Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H, Takahashi M, Ito M. The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 1996;288:39–44. doi:10.1007/BF02505041.

Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *J Ethnopharmacol* 2011;137:427–33. doi:10.1016/j.jep.2011.04.072.

Kim JH, Lee SK, Ki MH, Choi WK, Ahn SK, Shin HJ. Development of parenteral formulation for a novel angiogenesis inhibitor, CKD-732 through complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, vol. 272, 2004, p. 79–89. doi:10.1016/j.ijpharm.2003.11.034.

Kim S, Han J, Lee DH, Cho KH, Kim KH, Chung JH. Cholesterol, a major component of caveolae, down-regulates matrix metalloproteinase-1 expression through ERK/JNK pathway in cultured human dermal fibroblasts. *Ann Dermatol* 2010a;22:379–88. doi:10.5021/ad.2010.22.4.379.

Kim S, Kim Y, Lee Y, Cho KH, Kim KH, Chung JH. Cholesterol inhibits MMP-9 expression in human epidermal keratinocytes and HaCaT cells. *FEBS Lett* 2007;581:3869–74. doi:10.1016/j.febslet.2007.06.074.

Kim S, Oh JH, Lee Y, Lee J, Cho KH, Chung JH. Induction of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 by cholesterol depletion leads to the conversion of proMMP-2 into active MMP-2 in human dermal fibroblasts. *Exp Mol Med* 2010b;42:38–46. doi:10.3858/em.2010.42.1.004.

Kohen R, Gati I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology*, 2000. doi:10.1016/S0300-483X(00)00206-7.

Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *J Dermatol Nurses Assoc* 2011. doi:10.1097/JDN.0b013e3182274a98.

Kondratiev S, Gnepp DR, Yakirevich E, Sabo E, Annino DJ, Rebeiz E. Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. *Hum Pathol* 2008. doi:10.1016/j.humpath.2007.07.003.

Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG. Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Mol Endocrinol* 1997;11:779–91. doi:10.1210/mend.11.6.0007.

Kuivanen T, Jeskanen L, Kyllönen L, Isaka K, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinase-26 is present more frequently in squamous cell carcinomas of immunosuppressed compared with immunocompetent patients. *J Cutan Pathol* 2009. doi:10.1111/j.1600-0560.2009.01188.x.

Kurkov S V., Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm* 2013;453:167–80. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.055.

Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Med (United Kingdom)* 2013. doi:10.1016/j.mpmed.2013.04.017.

Lee J-A, Choi D-I, Choi J-Y, Kim S-O, Cho K-A, Lee J-B. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin up-regulates collagen I expression in chronologically-aged skin via its anti-caveolin-1 activity. *Oncotarget* 2015;6:1942–53. doi:10.18632/oncotarget.3039.

Leight JL, Tokuda EY, Jones CE, Lin AJ, Anseth KS. Multifunctional bioscaffolds for 3D culture of melanoma cells reveal increased MMP activity and migration with BRAF kinase inhibition. *Proc Natl Acad Sci* 2015. doi:10.1073/pnas.1505662112.

Li N, Luo HC, Yang C, Deng JJ, Ren M, Xie XY. Cationic star-shaped polymer as an siRNA carrier for reducing MMP-9 expression in skin fibroblast cells and promoting wound healing in diabetic rats. *Int J Nanomedicine* 2014;9:3377–87. doi:10.2147/IJN.S66368.

Li XA, Everson W V., Smart EJ. Caveolae, lipid rafts, and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2005. doi:10.1016/j.tcm.2005.04.001.

Lindner D, Zietsch C, Becher PM, Schulze K, Schultheiss HP, Tschöpe C. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. *Biochem Res Int* 2012. doi:10.1155/2012/875742.

Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol & Med* 2013. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011.

Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2007;329:1–11. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.044.

Lombard J. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biol Direct* 2014. doi:10.1186/s13062-014-0032-7.

Lopez CA, De Vries AH, Marrink SJ. Computational microscopy of cyclodextrin mediated cholesterol extraction from lipid model membranes. *Sci Rep* 2013;3. doi:10.1038/srep02071.

López CA, de Vries AH, Marrink SJ. Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. *PLoS Comput Biol* 2011;7. doi:10.1371/journal.pcbi.1002020.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.

Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 2005;438:612–21. doi:10.1038/nature04399.

Michel D, Chitanda JM, Balogh R, Yang P, Singh J, Das U. Design and evaluation of cyclodextrin-based delivery systems to incorporate poorly soluble curcumin analogs for the treatment of melanoma. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;81:548–56. doi:10.1016/j.ejpb.2012.03.016.

Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: A new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One* 2008. doi:10.1371/journal.pone.0004066.

de Miranda JC, Martins TEA, Veiga F, Ferraz HG. Cyclodextrins and ternary complexes: Technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian J Pharm Sci* 2011;47:665–81. doi:10.1590/S1984-82502011000400003.

Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Motoyama K, Kameyama K, Onodera R, Araki N, Hirayama F, Uekama K. Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-O-methyl- $\beta$ -cyclodextrin, not 2,6-di-O-methyl- $\alpha$ -cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells. *Eur J Pharm Sci* 2009;38:249–61. doi:10.1016/j.ejps.2009.07.010.

Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia T V., Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 1995. doi:10.1073/pnas.92.22.10339.

Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* 2011;12:233. doi:10.1186/gb-2011-12-11-233.

Nan H, Niu T, Hunter DJ, Han J. Missense polymorphisms in matrix metalloproteinase genes and skin cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0606.

Numanoğlu U, Sen T, Tarimci N, Kartal M, Koo OMY, Onyüksel H. Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: linalool and benzyl acetate. *AAPS PharmSciTech* 2007;8:E1-9. doi:10.1208/pt0804085.

Oh ST, Kim HS, Yoo NJ, Lee WS, Cho BK, Reichrath J. Increased immunoreactivity of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and  $\beta$ -catenin in high-risk basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2011;165:1197–204. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10506.x.

Ohvo H, Slotte JP. Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: Effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. *Biochemistry* 1996. doi:10.1021/bi9528816.

De Oliveira Poswar F, de Carvalho Fraga CA, Gomes ESB, Farias LC, Souza LWF, Santos SHS. Protein Expression of MMP-2 and MT1-MMP in Actinic Keratosis, Squamous Cell Carcinoma of the Skin, and Basal Cell Carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2015;23:20–5. doi:10.1177/1066896914540998.

Onodera R, Motoyama K, Okamatsu A, Higashi T, Kariya R, Okada S. Involvement of cholesterol depletion from lipid rafts in apoptosis induced by methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Int J Pharm* 2013;452:116–23. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.04.071.

Park CH, Min JL, Ahn J, Kim S, Hyeon HK, Kyu HK. Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through ERK and JNK activation and via an autocrine interleukin-6 loop. *J Invest Dermatol* 2004. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23487.x.



Park JE, Pyun HB, Woo SW, Jeong JH, Hwang JK. The protective effect of kaempferia parviflora extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2014. doi:10.1111/phpp.12097.

Parkinson LG, Toro A, Zhao H, Brown K, Tebbutt SJ, Granville DJ. Granzyme B mediates both direct and indirect cleavage of extracellular matrix in skin after chronic low-dose ultraviolet light irradiation. *Aging Cell* 2015. doi:10.1111/ace1.12298.

Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen: An Overview. *Implant Dent* 2002. doi:10.1097/00008505-200207000-00014.

Peng W, Yan J, Wan Y, Wang B, Tao J, Yang G. Matrix Metalloproteinases: A Review of Their Structure and Role in Systemic Sclerosis. *J Clin Immunol* 2012. doi:10.1007/s10875-012-9735-7.

Pérez-Sánchez A, Barrajón-Catalán E, Herranz-López M, Micol V. Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies. *Nutrients* 2018. doi:10.3390/nu10040403.

Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - A review. *Int J Cosmet Sci* 2005. doi:10.1111/j.1467-2494.2004.00241.x.

Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016;17. doi:10.3390/ijms17060868.

Pun SH, Tack F, Bellocq NC, Cheng J, Grubbs BH, Jensen GS. Targeted delivery of RNA-cleaving DNA enzyme (DNAzyme) to tumor tissue by transferrin-modified, cyclodextrin-based particles. *Cancer Biol Ther* 2004;3:641–50. doi:10.4161/cbt.3.7.918.

Qin L, Zhu N, Ao BX, Liu C, Shi YN, Du K. Caveolae and caveolin-1 integrate reverse cholesterol transport and inflammation in atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2016. doi:10.3390/ijms17030429.

Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.*, 2009. doi:10.1038/jidsymp.2009.8.

Ravichandran R, Divakar S. Inclusion of ring A of cholesterol inside the  $\beta$ -cyclodextrin cavity: Evidence from oxidation reactions and structural studies. *J Incl Phenom Mol Recognit Chem* 1998. doi:10.1023/A:1007912809965.

Remacle A. Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *J Cell Sci* 2003. doi:10.1242/jcs.00710.

Rhie GE, Mi HS, Jin YS, Won WC, Kwang HC, Kyu HK. Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2001;117:1212–7. doi:10.1046/j.0022-202X.2001.01469.x.

Rigon RB, Oyafuso MH, Fujimura AT, Gonçalez ML, Do Prado AH, Gremião MPD, et al. Nanotechnology-

based drug delivery systems for melanoma antitumoral therapy: A review. *Biomed Res Int* 2015. doi:10.1155/2015/841817.

Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* 2015. doi:10.3390/biom5020545.

La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer* 2004;90:1414–21. doi:10.1038/sj.bjc.6601725.

Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Anderson RGW. Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol* 1990. doi:10.1083/jcb.111.6.2931.

Rotte A, Martinka M, Li G. MMP2 expression is a prognostic marker for primary melanoma patients. *Cell Oncol* 2012. doi:10.1007/s13402-012-0080-x.

Scavone C, Colomba A, Sonia B, Cimmaruta D, Cenami R, Torella M. Efficacy and Safety Profile of Diclofenac / Cyclodextrin and Progesterone / Cyclodextrin Formulations : A Review of the Literature Data. *Drugs R D* 2016;16:129–40. doi:10.1007/s40268-016-0123-2.

Schönfelder U, Radestock A, Elsner P, Hipler UC. Cyclodextrin-induced apoptosis in human keratinocytes is caspase-8 dependent and accompanied by mitochondrial cytochrome c release. *Exp Dermatol* 2006;15:883–90. doi:10.1111/j.1600-0625.2006.00481.x.

Sharma N, Baldi A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Deliv* 2014;7544:1–19. doi:10.3109/10717544.2014.938839.

Shin MH, Lee SR, Kim MK, Shin CY, Lee DH, Chung JH. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha improves aged and UV-irradiated skin by catalase induction. *PLoS One* 2016;11. doi:10.1371/journal.pone.0162628.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:31–9. doi:10.1038/35036052.

Souza, Adria do Prado Barros de. Influência da L-arginina na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos dérmicos humanos. 2016. x, 89 f., il. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)—Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Tewari A, Grys K, Kollet J, Sarkany R, Young AR. Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: Potential implications for photoaging. *J Invest Dermatol* 2014. doi:10.1038/jid.2014.173.

Thompson Z, Maibach HI. Biological effects of estrogen on skin. *Textb. Aging Ski.*, 2010. doi:10.1007/978-3-540-89656-2\_35.

Tigges J, Krutmann J, Fritsche E, Haendeler J, Schaal H, Fischer JW. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech*

Ageing Dev 2014. doi:10.1016/j.mad.2014.03.004.

Tobin DJ. Introduction to skin aging. *J Tissue Viability* 2017. doi:10.1016/j.jtv.2016.03.002.

Treiber N, Maity P, Singh K, Ferchiu F, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. *Dermatoendocrinol* 2012. doi:10.4161/derm.21819.

Tsai Y, Tsai HH, Wu CP, Tsai FJ. Preparation, characterisation and activity of the inclusion complex of paeonol with  $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chem* 2010;120:837–41. doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.024.

Tsamaloukas A, Szadkowska H, Slotte PJ, Heerklotz H. Interactions of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. *Biophys J* 2005. doi:10.1529/biophysj.105.061846.

Väisänen AH, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. *Hum Pathol* 2008. doi:10.1016/j.humpath.2007.06.021.

Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem* 2004;39:1033–46. doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9.

Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery* 2011. doi:10.1016/j.mpsur.2011.06.010.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000. doi:10.1101/gad.815400.

Wang XM, Kim HP, Song R, Choi AMK. Caveolin-1 confers antiinflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006. doi:10.1165/rcmb.2005-0376OC.

Wang Z, Huang J, Zhou S, Luo F, Xu W, Wang Q. Anemonin attenuates osteoarthritis progression through inhibiting the activation of IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B pathway. *J Cell Mol Med* 2017. doi:10.1111/jcmm.13227.

Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 2010;5:51–66. doi:10.1038/nprot.2009.197.MEASUREMENT.

Williams RO, Mahaguna V, Sriwongjanya M. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 1998. doi:10.1016/S0939-6411(98)00033-2.

Wulf HC, Sandby-Møller J, Kobayasi T, Gniadecki R. Skin aging and natural photoprotection. *Micron* 2004. doi:10.1016/j.micron.2003.11.005.

Xia Y-H, Li M, Fu D-D, Xu S-L, Li Z-G, Liu D. Effects of PTTG Down-regulation on Proliferation and Metastasis of the SCL-1 Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Cell Line. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2013. doi:10.7314/APJCP.2013.14.11.6245.

Yaar M, Gilchrist BA. Aging versus photoaging: Postulated mechanisms and effectors. *J. Investig. Dermatology*

Symp. Proc., 1998. doi:10.1038/jidsymp.1998.12.

Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Cells Tissues Organs* 1957. doi:10.1159/000141169.

Yang H, Guan L, Li S, Jiang Y, Xiong N, Li L. Mechanosensitive caveolin-1 activation-induced PI3K/Akt/mTOR signaling pathway promotes breast cancer motility, invadopodia formation and metastasis *&lt;i>in vivo*; *Oncotarget* 2016. doi:10.18632/oncotarget.7583.

Zaidi Z, Lanigan S. Skin: structure and function. *Dermatology Clin Pract* 2010. doi:10.1097/IPC.0b013e3181660bf4.

Zhao W, Tian Y, Cai M, Wang F, Wu J, Gao J. Studying the nucleated mammalian cell membrane by single molecule approaches. *PLoS One* 2014. doi:10.1371/journal.pone.0091595.

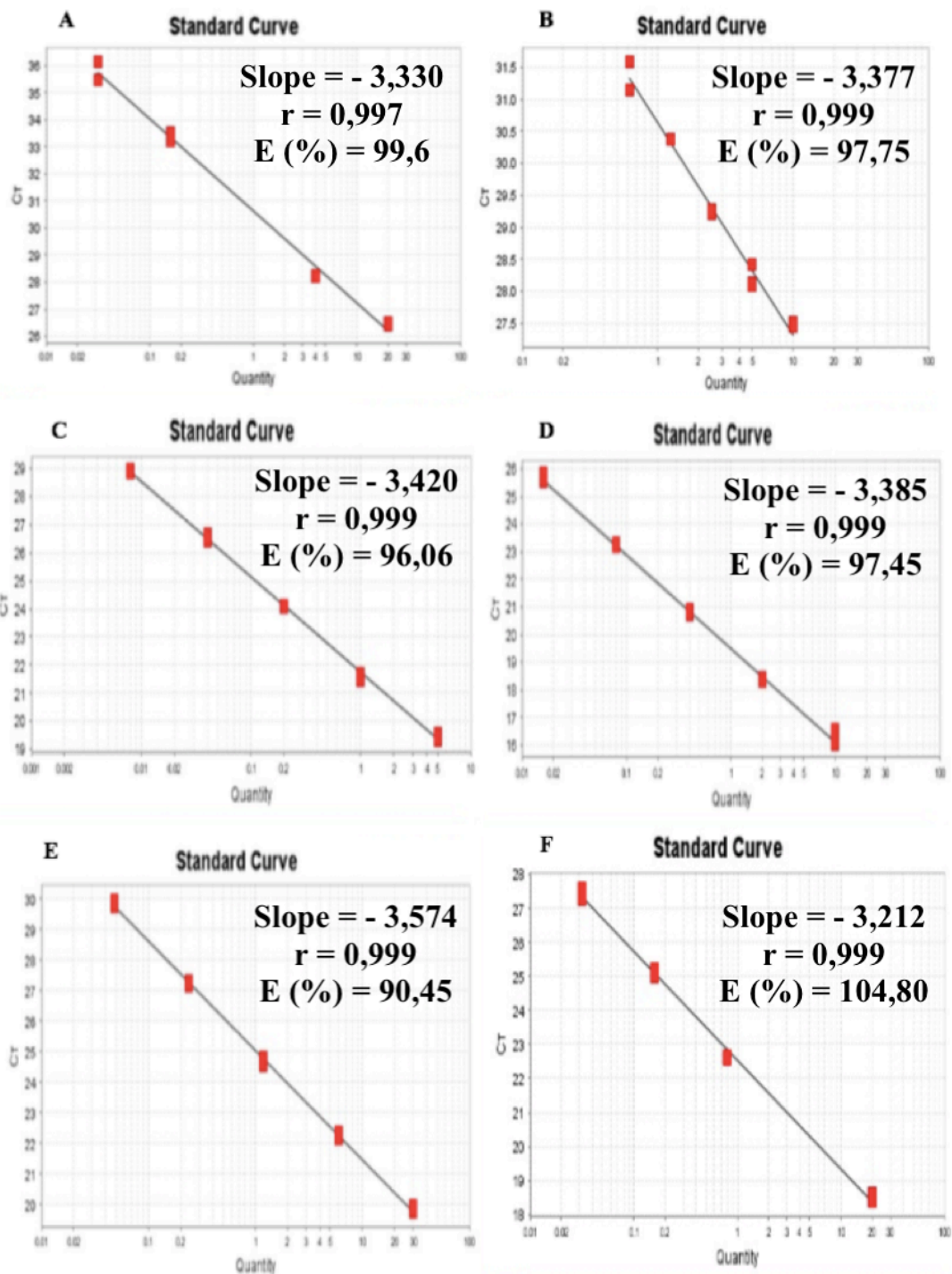
Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2007;1768:1311–24. doi:10.1016/j.bbamem.2007.03.026.

Zou J, Xu L, Ju Y, Zhang P, Wang Y, Zhang B. Cholesterol depletion induces ANTXR2-dependent activation of MMP-2 via ERK1/2 phosphorylation in neuroglioma U251 cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2014.06.001.

Zouboulis CC, Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clin Dermatol* 2011. doi:10.1016/j.clindermatol.2010.07.001.

## ANEXO 1

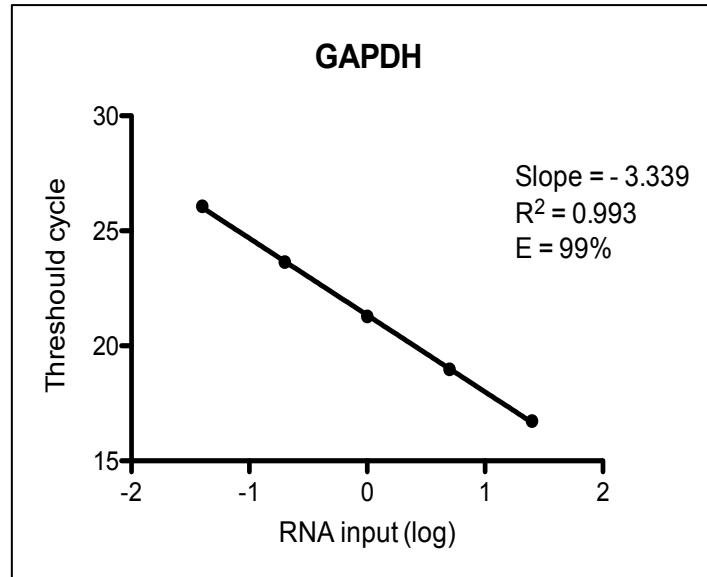
Curvas padrões dos genes de COL1A1, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-3 e TIMP-1.



**Legenda:** A) COL1A1; B) MMP-1; C) MMP-2; D) MMP-9; E) MMP-3; F) TIMP-1 construídos a partir da diluição em série de um *pool* de RNA total de fibroblastos dérmicos humanos. E = eficiência, r = coeficiente de correlação linear, slope = inclinação da reta.

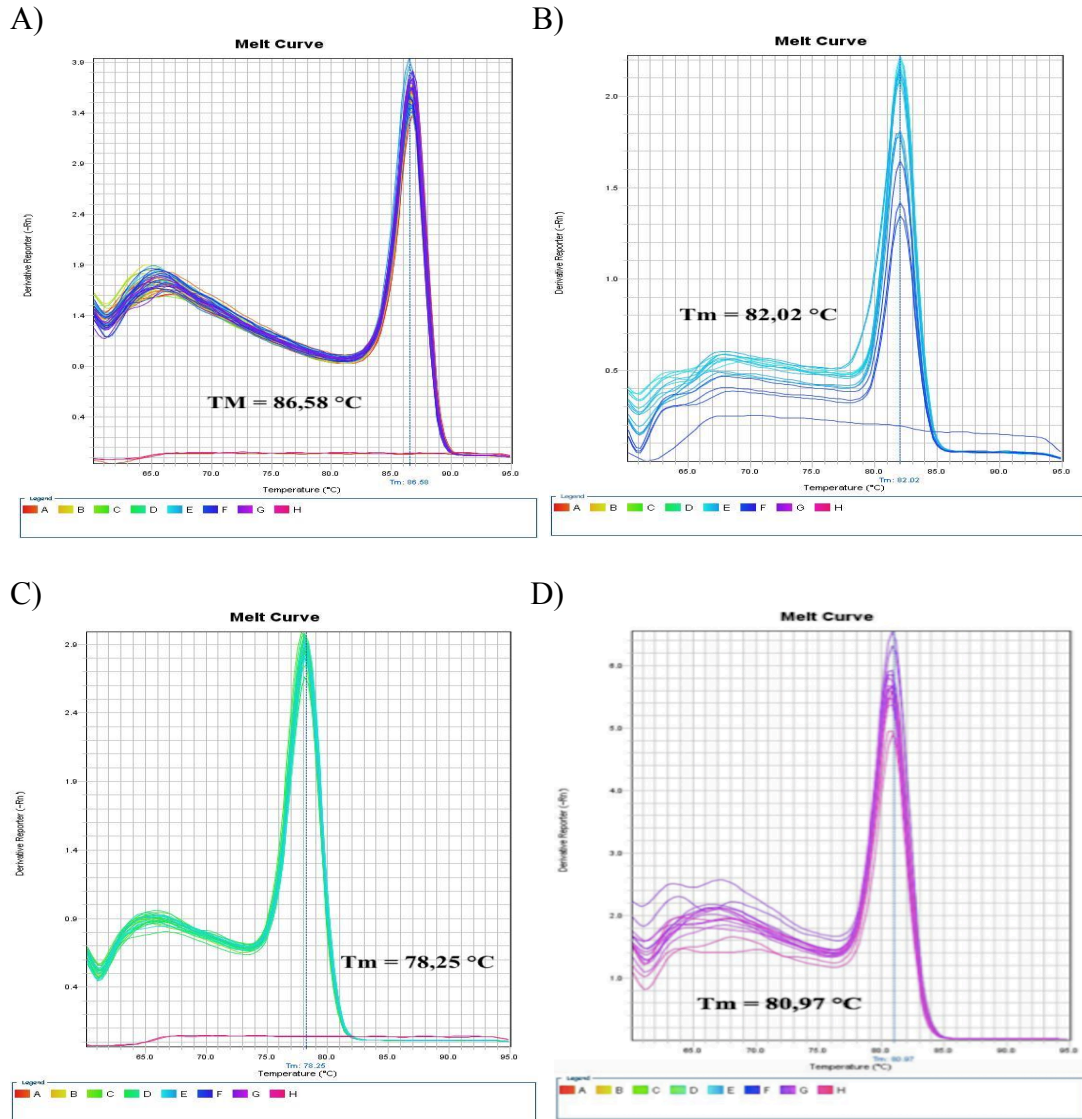
## ANEXO 2

Curva padrão do gene *GAPDH* construída a partir da diluição em série de um *pool* de RNA total de células HepG2.



### ANEXO 3

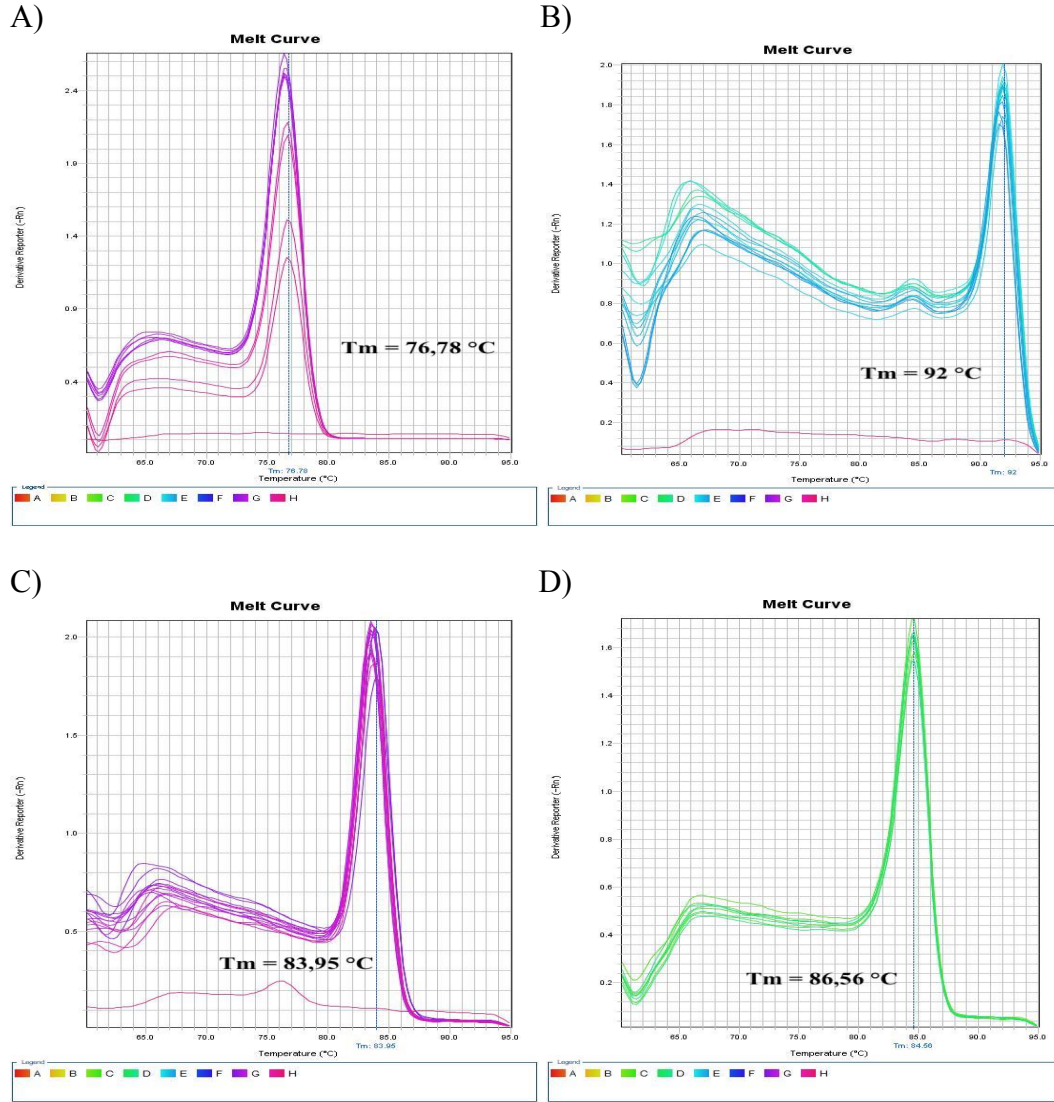
Curvas de dissociação e temperatura de *melting* dos produtos de amplificação dos pares de *primers* de *COL1A1*, *MMP-14*, *TIMP-1* e *GAPDH*.



**Legenda:** Pares de *primers* do A) *COL1A1*; B) *MMP-14*; C) *TIMP-1*; e D) *GAPDH*.  $T_m$  = Temperatura de *melting*.

## ANEXO 4

Curvas de dissociação e temperatura de *melting* dos produtos de amplificação dos pares de *primers* de *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9* e *MMP-3*.



**Legenda:** Pares de *primers* do A) *MMP-1*; B) *MMP-2*; C) *MMP-9*; e D) *MMP-3*. Tm = Temperatura de *melting*.