

AVALIAÇÃO DA HISTOARQUITETURA DO COLÁGENO NO TECIDO CUTÂNEO APÓS A UTILIZAÇÃO TÓPICA DA ARGILA EM RATOS

EFFECT OF CLAY APPLICATION ON THE HISTOARCHITECTURE OF RATS COLLAGEN SKIN

Dinalva M. Zanesco Valenti, Juliana A. Silva, Walcy R. Teodoro, Paula A. Velosa e Suzana B.V. Mello

RESUMO

Avaliar o efeito da aplicação tópica de argila sobre as fibras colágenas da pele de ratos. Foram utilizados 18 ratos Wistar machos, que receberam diariamente, durante sete ($n = 6$) ou 15 dias ($n = 6$), compressas com água, argila e ácido retinoico (AR, 0,025%) por 40 minutos sob vaporização com água destilada a 37°C. Peles de animais não submetidos a vaporização diária ($n = 6$) foram utilizadas como controle. Amostras de pele de cada região foram submetidas a processamento histológico com H&E e Picrosirius. A quantificação de colágeno foi avaliada sob microscopia óptica com luz polarizada. As imagens foram digitalizadas e processadas com o auxílio do *software* Image ProPlus 6.0. Após sete dias, ocorreu um aumento significativo na área de fibras colágenas na pele tratada com argila quando comparada à pele não submetida a nenhum tratamento ($51,74 \pm 1,28\mu\text{m}^2$ vs. $43,39 \pm 1,79\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$, Anova seguido de Newman Keuls), enquanto o AR e a água ($45,66 \pm 1,10\mu\text{m}^2$ e $43,62 \pm 0,65\mu\text{m}^2$) não promoveram alteração significativa. Aos 14 dias, a pele tratada com argila não apresentou aumento adicional de fibras colágenas; entretanto, os tratamentos com AR e água aumentaram o número dessas fibras ($58,07 \pm 1,59\mu\text{m}^2$ e $52,20 \pm 1,22\mu\text{m}^2$). Todos os tratamentos promoveram aumento na quantidade de fibras colágenas da pele de ratos após 14 dias. A aplicação tópica de argila desencadeou aumento na quantidade de fibras colágenas da pele de ratos em um tempo menor que AR e água, sugerindo eficácia dessa terapia complementar.

Palavras-chave: colágeno, pele, argila, ácido retinoico.

ABSTRACT

To evaluate the effect of topical clay application on the histoarchitecture of skin collagen fibers in rats. Eighteen male Wistar rats were used. They received during 7 ($n = 6$) or 15 days ($n = 6$), daily application of water, clay and retinoic acid (RA 0.025%), under vaporization at (37°C / 40 minutes). Animals not exposed to spray ($n=6$) were used as control. Skin samples from each treated region were excised and stained by HE and picro-Sirius red for cellular and collagen fibers evaluation, respectively. The tissues were analyzed under polarization microscopy and quantified by software Image ProPlus 6.0. Seven days after clay treatment it was observed an increase of collagen fibers in the skin when compared to control (untreated) ($51.74 \pm 1.28\mu\text{m}^2$ vs $43.39 \pm 1.79\mu\text{m}^2$, respectively, $p < 0.05$, Anova followed by Newman Keuls). Retinoic acid and water ($45.66 \pm 1.10\mu\text{m}^2$ and $43.62 \pm 0.65\mu\text{m}^2$) treatment did not alter the collagen amount skin after 7 days by comparison to control. The Increase of clay treatment to 14 days did not promote a further increase of skin collagen amount, however treatments with retinoic acid and water ($58.07 \pm 1.59\mu\text{m}^2$ and $52.20 \pm 1.22\mu\text{m}^2$) did. All treatments increased the amount of collagen fibers in rat skin. However topical application of clay as early as 7 days promoted an increase in collagen fibers of the rat's skin that remained with the extension of the treatment suggesting beneficial effects for its complementary therapy.

Keywords: collagen, skin, clay, retinoic acid.

I. INTRODUÇÃO

O uso de argila em tratamentos estéticos vem sendo mais e mais divulgada, em função de observações empíricas da comunidade médica, dermatologistas, dermaticistas e pacientes frequentadores de estâncias hidrominerais e *spas*. Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desses produtos além de existirem poucos estudos sistemáticos embasando seus efeitos terapêuticos.

A pele é composta por duas camadas: a epiderme, formada por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, e a derme, constituída por fibras colágenas, elásticas e reticulares entrelaçadas com elementos celulares, fibras musculares lisas e substância fundamental amorfa (SILVA, SILVA & HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2008). O tecido cutâneo, além de proteger o organismo contra a perda de água e o atrito, é responsável por impedir a invasão de microorganismos, regular a pressão sanguínea e proteger contra raios ultravioleta – UV (DÁRIO, 2008). A epiderme é a camada mais superficial da pele, sendo sua morfologia caracterizada por um tecido estratificado queratinizado, cuja renovação celular constante é realizada por queratinócitos. Da região mais profunda da epiderme à superficial, encontram-se diferentes estratos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Dentre eles, o córneo é o mais externo e funciona como barreira contra a difusão da água, constituindo o principal obstáculo à penetração das moléculas que entram em contato com a superfície da pele. A sua hidratação tem um papel muito importante na manutenção do metabolismo, da atividade enzimática, das propriedades mecânicas e da aparência, sendo importante para a absorção em terapias estéticas (ROSADO, ROLIM RODRIGUES, 2005). A derme, localizada sob a epiderme, é um tecido conjuntivo que contém fibras proteicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de substância amorfa, que constitui uma rede de macromoléculas denominada matriz extracelular, na qual os elementos dérmicos estão imersos (DÁRIO, 2008). A substância fundamental é um complexo de macromoléculas aniônicas (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e glicoproteínas multiadesivas (laminina, fibronectina etc.), que se ancoram em proteínas receptoras (integrinas), presentes na superfície da célula, fornecendo força tênsil e rigidez ao tecido (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). As fibras da matriz podem ser divididas, de acordo com a sua natureza química, em fibras colágenas e fibras elásticas (UITTO, 2008).

O colágeno, o principal componente da derme, é responsável pela histoarquitetura do tecido cutâneo. A derme papilar compõe os 10% mais superficiais da derme, onde se observam as fibrilas e fibras mais finas, que contêm, aproximadamente, 15% de colágeno tipo III. A fração restante refere-se ao colágeno tipo I (85%), encontrado predominantemente na camada profunda, na qual se observam fibras mais espessas (GIBSON, 1990). Outro componente fibrilar da derme são as fibras elásticas, cuja função é retornar a rede de colágeno deformada por forças de tração à condição de relaxamento. Entremeados às fibras colágenas e elásticas, estão presentes os plexos sanguíneos, linfáticos e as fibras nervosas.

As mudanças nas propriedades físicas da pele variam entre diferentes indivíduos, regiões do corpo, em função da idade (GIBSON, 1990), e ainda sofrem influências de forças ambientais ou extrínsecas, como a radiação ultravioleta. Podem ser ainda afetadas por fatores intrínsecos, alguns deles relacionados a alterações no tecido conjuntivo da derme (ORÍÁ *et al.*, 2003). Alterações no tecido conjuntivo delinham a aparência externa da pele e são refletidas no estrato córneo. As modificações do aparelho colágeno-elástico ao longo da vida estabelecem uma base morfológica substancial para compreender as adaptações bioquímicas e biomecânicas da pele com a idade. A espessura e suas propriedades viscoelásticas não dependem apenas da quantidade de material presente na derme, mas também de sua organização estrutural (ORÍÁ *et al.*, 2003).

Dois mecanismos explicam o envelhecimento da pele, a degradação aumentada e a redução na síntese de fibras de colágeno. Sabe-se que o aumento da degradação é basicamente dependente de uma síntese aumentada de MMPs sintetizadas pelos fibroblastos. As metaloproteinasas (MMPs) são enzimas capazes de degradar os colágenos I, III e VII da pele; sua inativação resulta em melhora da quantidade de colágeno e, conseqüentemente, reduz a formação de rugas (LATEEF, SEVENS & VARANI, 2004; HORNEBECK, 2003). Uma pele saudável e jovem depende dessa síntese e degradação balanceada, ou do *turnover* da matriz extracelular. Os fibroblastos não somente organizam o crescimento da matriz extracelular, mas também produzem enzimas capazes de degradar os componentes da matriz, como as MMPs.

Existem substâncias capazes de contrabalançar a produção de MMPs. Trata-se de um complexo de enzimas chamadas TIMPs (*tecidual inhibitory* MPs). Durante o envelhecimento, o que ocorre é um desequilíbrio

entre MMPs e seus inibidores teciduais TIMPs. Agentes externos, como a irradiação UV, são agentes que podem acelerar o processo de envelhecimento por um aumento da expressão de MMPs. As principais ações das MMPs estão relacionadas ao remodelamento dos componentes da matriz extracelular, por meio da degradação do colágeno, da elastina e da fibronectina.

Vários são os recursos terapêuticos que se propõem a atuar na revitalização do tecido cutâneo, agindo na reparação e na prevenção do envelhecimento. Dentre eles, há o ácido retinoico (AR), um metabólito da vitamina A, que é amplamente conhecido e utilizado nos tratamentos de revitalização cutânea. Os retinoides atuam por ligação a receptores específicos citoplasmáticos e nucleares, e influenciam vários processos celulares, tais como: reparo do DNA, expressão de genes, estímulo ao crescimento e diferenciação de queratinócitos, melanócitos e fibroblastos, assim como a produção da matriz extracelular pelos fibroblastos (WANG *et al.*, 2009). O AR pode ainda atuar como transmissor intracelular engajado na expressão gênica e modular o metabolismo celular, garantindo uma perfeita homeostasia da pele (WANG *et al.*, 2009; JURZAK *et al.*, 2008). Os retinoides são ainda capazes de inibir as alterações do ácido araquidônico, ou seja, possuem também propriedades anti-inflamatórias (NEVOSTRUEV *et al.*, 2004).

Os retinoides regulam a melanogênese e estão envolvidos na distribuição dos grânulos de melanina nos queratinócitos. Em função de os retinoides normalizarem o processo de esfoliação da glândula sebácea, eles têm, ainda, propriedade anticomedogênica. Estudos com o AR em cultura mostraram que sua ação se baseia também na degradação de metaloproteinases (MMPs) (LATEEF, SEVENS & VARANI, 2004; VARANI, FAY & PERONE, 2007), sendo, portanto, importantes para o tratamento do fotoenvelhecimento (YAAR & GILCHREST, 2007; GRIFFITHS, 2001).

Estruturalmente, a vitamina A e seus derivados possuem ação no espessamento epidérmico, aumentando as mitoses; diferenciação dos queratinócitos, modulando a secreção das glândulas sebáceas; e, ainda, há evidências de que também alterem a fibrillogênese e a angiogênese (KEDE & SABATOVICH, 2004). Estudos experimentais mostram que o AR influencia na modulação do colágeno (KLIIGMAN, SAPADIN & SCHWARTZ, 1996). Adicionalmente, promove um aumento da densidade do colágeno tipo IV, que é uma fibra de ancoragem presente na membrana basal e de grande importância

na junção dermoepidérmica (RUIZ *et al.*, 2006; SCHILTZ *et al.*, 1986; SCHWARTZ *et al.*, 1994).

Além dos esteticistas e dermatologistas, mais pessoas têm aderido à utilização da medicina complementar. Algumas das terapias mais empregadas em centros termais e balneários utilizam a lama para fins terapêuticos e estéticos – a fangoterapia, geoterapia, crenoterapia ou argiloterapia (DÁRIO, 2008; BELLOMETTI *et al.*, 2005). Os estudos com fangos mostram também respostas importantes nos tratamentos da dor, de doenças osteoarticulares, artrite (BRITSCHKA *et al.*, 2007; BELLOMETTI *et al.*, 1997; SUKENIK *et al.*, 1990), gota, neuralgias, mialgias, espasmos musculares, vasculopatias e psoríase (SMIRNOV, 1997; COSTANTINO & LAMPA, 2005). Nos tratamentos dermatológicos, essas argilas têm sido indicadas em vários procedimentos, desde a limpeza e hidratação da pele, *peeling* revitalizante, clareamento, cicatrização, tratamento anti-inflamatório e antisséptico, até para discromias na acne seborreica, flacidez e celulite (GARCIA, MONTEIRO & NATIVIDADE, 2008; CLIJSEN *et al.*, 2008; ARGENZIANO, DELFINO & RUSSO, 2004; BAGNATO *et al.*, 2004; DICHEVA *et al.*, 1998; COSTA, TORINO & RAK, 1999).

A argila é um material natural, terroso, composta por um complexo de minerais aluminossilicatados, de dimensões microscópicas e formatos laminares, alternando-se com moléculas de água e com outros elementos, como titânio, magnésio, cobre, zinco, alumínio, cálcio, potássio, níquel, manganês, lítio, sódio e ferro. Estas características explicam suas inigualáveis propriedades terapêuticas, relacionadas à ação facilitadora de trocas calóricas, líquidas e iônicas (DÁRIO, 2008; COSTA, TORINO & RAK, 1999). Em contato com a água, a argila torna-se uma solução iônica. Na pele, existe uma voltagem transcutânea que é conhecida como bateria da pele. Esta propriedade é importante no mecanismo de ação das argilas, considerando que o estrato córneo é negativo em relação à derme com uma diferença de potencial média de 23mV (LOW & REED, 2001). Sendo assim, uma corrente iônica gerada do polo negativo para o positivo, ou seja, da epiderme para a derme facilita o carregamento de compostos por difusão. Para aumentar esta absorção, a pele deve estar hidratada, a fim de que os íons atravessem a camada córnea mais facilmente em direção à derme. A camada córnea hidratada e em contato com os geominais torna-se uma reserva iônica, pronta para fornecer os íons necessários para o restabelecimento do equilíbrio hidroeletrólítico (MEDEIROS, 2007).

Geologicamente, as argilas são constituídas por uma estrutura de cristais de quartzo com menos de 2µm de diâmetro (COELHO, SANTOS & SANTOS, 2007), que tem grande capacidade de manter energia (MEDEIROS, 2007). A argila reage de acordo com as condições climáticas do meio externo, e sua carga elétrica é favorecida pelo calor, que gera um estímulo e uma resposta fisiológica (LOW & REED, 2001). O pó de argila misturado à água produz uma massa com características coloidais que favorecem as reações na pele (COSTA, TORINO & RAK, 1999).

Com relação à manutenção da estrutura da pele, um recente estudo mostrou que lama contendo sílica é capaz de induzir involucrina, loricrina, transglutaminase-I e filagrina em cultura de queratinócitos epidérmicos humanos. Essas proteínas são constituintes funcionais das camadas mais externas da pele e constituem uma barreira para retenção de água, evitando o ressecamento e impedindo a entrada de bactérias e vírus. Nesse estudo, observou-se que a lama afeta também os fibroblastos, inibindo a expressão de MMP-I induzida por UV-A¹. Estes efeitos também foram verificados *in vivo* em pele humana saudável, com uma significativa redução da perda de água transepidérmica. Em conjunto, estes resultados sugerem que essa argila tem a capacidade de melhorar a função de barreira da pele, prevenindo o envelhecimento (GREYHER-BECK *et al.*, 2008).

Considerando-se que as argilas podem – e devem – ter inúmeros efeitos sobre a nutrição e normalização das funções dermoepidérmicas, favorecendo a manutenção da homeostasia, e que estudos sistemáticos dessas ações são muito escassos, é importante verificar o efeito deste composto sobre a histoarquitetura da pele e de seus componentes. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar experimentalmente o efeito da aplicação tópica de argila, durante uma e duas semanas, sobre as fibras colágenas da pele de ratos e compará-lo ao efeito do ácido retinoico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Utilizaram-se 18 ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 250g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de

biotério (Biotério da Clínica Médica, Reumatologia) em caixas apropriadas e receberam água e alimentação *ad libitum*.

2.2. Aplicação tópica da argila e do ácido retinoico

Inicialmente, foi feita a tricotomia da região dorsal dos animais sob anestesia intraperitoneal de 0,1 ml/100g de xilazina e quetamina. Como mostrado na Figura 1, foram definidos e demarcados três quadrantes de 2x2cm para a aplicação diária de A (água), B (argila) e C (ácido retinoico). Os animais não anestesiados foram mantidos em suas caixas durante 40 minutos sob vapor de água para manutenção de umidade e temperatura média de 37°C, aferida com termômetro de mercúrio durante a aplicação de água e argila. Foi usado o aparelho vaporizador Steammer, da Bioset, mantido a uma distância de 10cm dos animais. A vaporização objetivou maior emoliência da pele e difusão dos ativos. Ao final de 40 minutos de vaporização, as compressas eram retiradas e a pele do animal, seca. Para evitar a diluição do ácido retinoico (manipulado pela Farmácia Buenos Ayres Ltda., na concentração de 0,025% em creme não iônico), a aplicação do mesmo foi feita em seguida, na pele seca, e constituiu o controle positivo de síntese de colágeno.

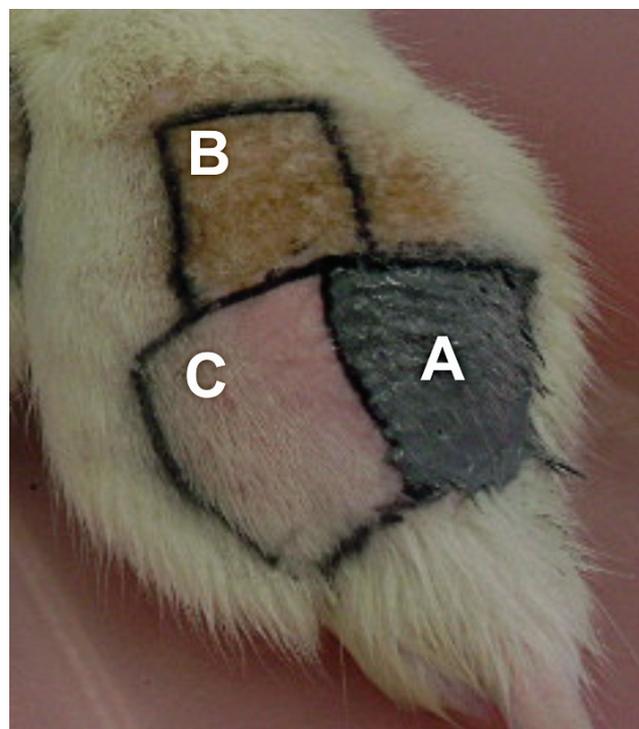


Figura 1: Esquema de terapia tópica com argila (A), água (B) e ácido retinoico 0,025% (C).

¹ Radiação ultravioleta do tipo A.

2.3. Processamento histológico

Ao final do período experimental, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico, e amostras de pele de cada região foram retiradas para processamento histológico. Após a retirada do material biológico, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com os preceitos do Cobeia (Comitê Brasileiro de Experimentação Animal) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP (CAPPesq), sob o Protocolo n. 1.114/08.

2.4. Processamento da biópsia de pele

Imediatamente após a retirada, a pele foi imersa em formol a 10% para fixação. Após fixação, o material foi submetido à desidratação em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes com 3µm a 4µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e Picrosirius, com a finalidade de analisar o colágeno tecidual em microscópio de luz polarizada.

2.5. Quantificação do colágeno por análise de imagem

Os tecidos corados pelo Picrosirius foram analisados em microscópio de luz polarizada, acoplado a um analisador de imagem. O sistema utilizado consistiu de uma câmera CCD Sony conectada a um microscópio Olympus, a partir do qual as imagens podiam ser visualizadas em um monitor. Por intermédio de um sistema digital inserido num computador (Pentium III – 300Mhz), as imagens foram processadas por um *software* Image ProPlus 6.0. Foram, então, selecionados aleatoriamente dez campos, incluindo os compartimentos da epiderme, derme superficial e profunda, visualizados sob um aumento de 400 vezes. A área total medida pelo analisador em cada campo é de 68.265,680µm². A área contendo colágeno em cada campo foi medida através da seleção de tonalidades birrefringentes, vermelho-alaranjado para fibras grossas e verde-azulado para fibras finas, e são correspondentes às bandas colagênicas, com posterior medida de área digitalizada.

2.6. Análise estatística

Para comparação das médias, foi utilizada a análise de variância (Anova), seguida de Newman-Keuls. Os resultados estão expressos como média ± epm. Foram considerados significativos resultados de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Na Figura 2, estão apresentados painéis representativos das biópsias de pele retiradas de cada área tratada. Nas amostras de pele de ratos controle (não tratados), é possível notar a preservação da arquitetura da matriz extracelular, principalmente das fibras de colágeno, fortemente evidenciadas em rosa pelo H&E, e dos anexos cutâneos, representados através de pelos e glândulas (Figura 2A).

Quanto à histoarquitetura das fibras de colágeno, pode-se observar, através da coloração de Picrosirius, uma rede densa envolvendo todos os anexos, que se caracteriza pela alta birrefringência da derme (Figura 2B). Já na Figura 2C, referente à pele tratada com água durante sete dias, as fibras de colágeno mostraram-se levemente mais densas e com diminuição de anexos cutâneos. Por outro lado, após 14 dias do procedimento com a água (Figura 2D), foram demonstrados preservação dos anexos cutâneos e aumento da expressão de fibras de colágeno, evidenciado pela alta birrefringência em vermelho, quando se compara com a pele controle (Figura 2B).

Na pele com sete dias de aplicação de argila (Figura 2E), observou-se um aumento de anexos e intensa birrefringência das fibras de colágeno, assim como preservação da organização das mesmas. Após 14 dias de tratamento com argila, a rede de fibras colágenas apresentou-se mais homogênea e inalterada no que diz respeito à quantidade de anexos cutâneos. Quando este procedimento foi comparado com o da pele que recebeu AR, observou-se uma ação positiva após 14 dias na preservação das fibras de colágeno e organização dos anexos cutâneos, enquanto a argila já aos sete dias apresentou um efeito similar.

Os resultados sumarizando a avaliação da histoarquitetura das fibras colágenas na pele de ratos tratados por sete dias estão apresentados na Figura 3. Essa análise revelou que, depois de sete dias de tratamento, ocorreu um aumento significativo na área de fibras colágenas na pele tratada com argila ($n = 6; 51,74 \pm 1,28\mu\text{m}^2$), quando comparado à pele de animais controle não submetidos a nenhum tratamento ($n = 6, 43,39 \pm 1,79\mu\text{m}^2$). O tratamento com ácido retinoico ($n = 6; 45,66 \pm 1,10\mu\text{m}^2$) ou água ($n = 6; 43,62 \pm 0,65\mu\text{m}^2$) não promoveu alteração no total de fibras colágenas, quando comparado à pele controle.

O prolongamento do tratamento com argila por mais uma semana (14 dias) não alterou a quantidade de fibras colágenas já aumentadas aos sete dias. Entre-

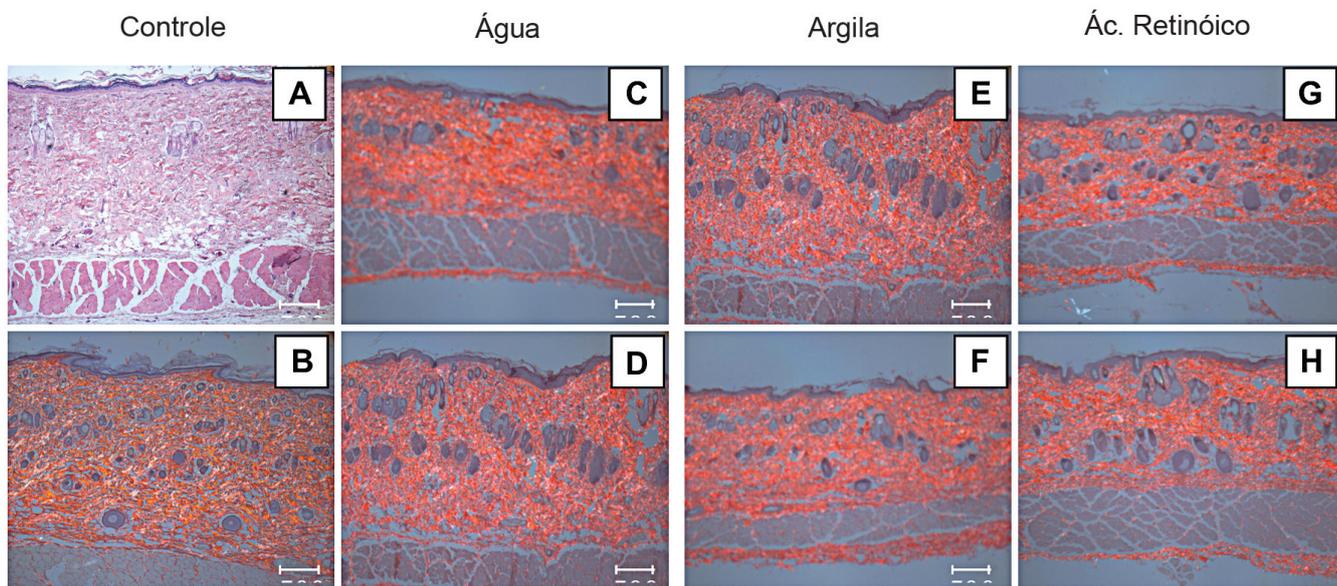


Figura 2: Cortes histológicos de pele de ratos corados com hematoxilina-eosina (A) e nos painéis de B a H, com Picrosirius. O painel B representa a pele de um rato não tratado; C, E e G são painéis representativos dos tratamentos durante sete dias e D, F e G, de tratamento por 14 dias.

tanto, o tratamento com ácido retinoico ($n = 6; 58,07 \pm 1,59 \mu\text{m}^2$) e com água pura ($n = 6; 52,20 \pm 1,22 \mu\text{m}^2$) aumentou a quantidade de fibras colágenas da pele dos animais (Figura 4). Salienta-se que todos os tratamentos, durante 14 dias, aumentaram o volume de fibras colágenas na pele quando comparadas à pele controle

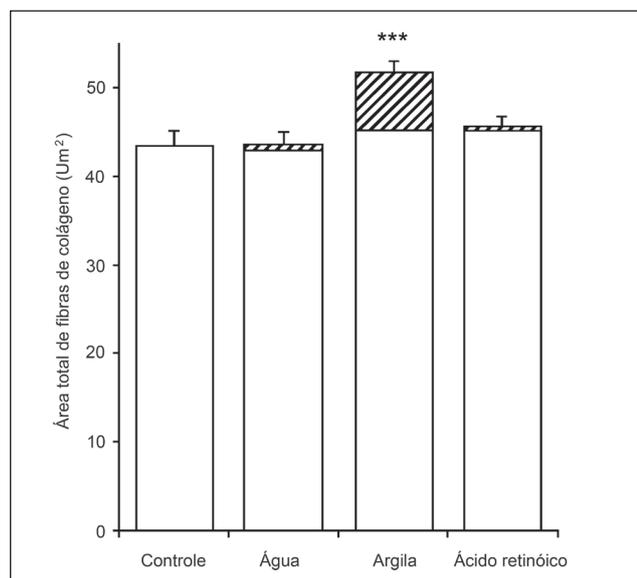


Figura 3: Área total de fibras de colágeno na pele de ratos tratados por sete dias com argila, água e ácido retinoico (0,025%). Animais do grupo controle, não submetidos à vaporização diária ($n = 6$), foram utilizados. As colunas brancas se referem a valores da área de fibras grossas e as hachuradas, de fibras finas. Os resultados estão expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ por comparação aos grupos controle, água e ácido retinoico.

não tratada. Esse fato fica mais claro na Figura 5, onde estão plotados juntos os dados de fibras colágenas na pele de animais tratados com sete e 14 dias.

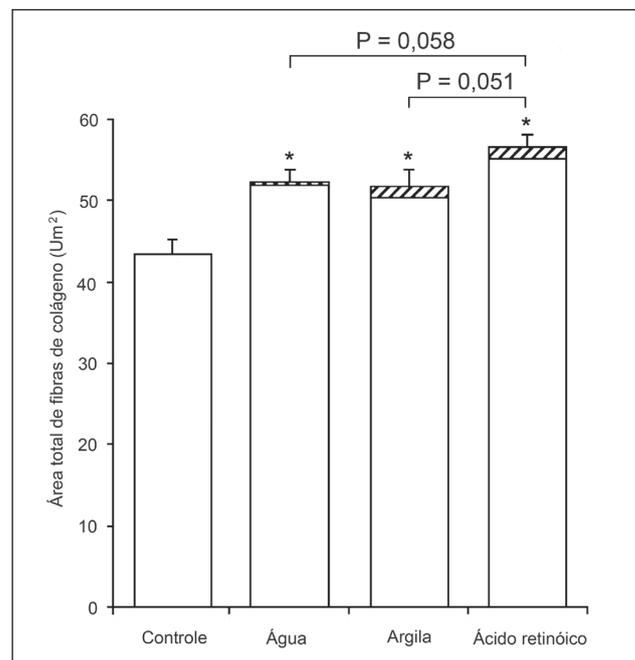


Figura 4: Área total de fibras de colágeno na pele de ratos tratados por 14 dias com argila, água e ácido retinoico (0,025%). Animais do grupo controle, não submetidos a vaporização diária ($n = 6$), foram utilizados. As colunas brancas se referem a valores de área com fibras grossas e as hachuradas, de fibras finas. Os resultados estão expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$ por comparação ao grupo controle ($n = 6$).

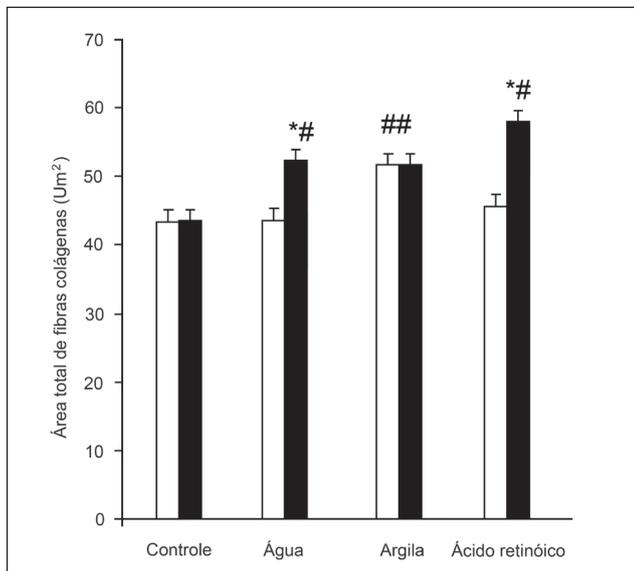


Figura 5: Efeito da aplicação diária/40min com H₂O, argila e ácido retinoico sobre o total de fibras colágenas da pele de ratos. Animais do grupo controle não foram submetidos a nenhum tratamento. As colunas brancas representam a média \pm epm de seis animais tratados por sete dias e as colunas negras representam a média \pm epm de seis animais tratados por 14 dias. * $p < 0,05$ por comparação com os valores registrados no sétimo dia e # por comparação aos animais do grupo controle.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo, em ratos, mostrou que a argila utilizada foi eficaz em melhorar o conteúdo de colágeno da pele de ratos após sete dias de aplicação. O prolongamento do tratamento para 14 dias não promoveu um aumento adicional na rede de colágeno da pele. Nessa fase experimental, a pele tratada com água e ácido retinoico apresentaram um aumento igual da área de colágeno.

Esses achados representam a primeira descrição experimental do efeito de argila sobre o conteúdo de colágeno em pele de ratos. Corroborando os achados da presente pesquisa, e utilizando uma argila contendo sílica diluída com um extrato de algas de uma lagoa na Irlanda, um elegante estudo mostrou que a lama de sílica associada a microalgas da Lagoa Azul melhoraram a função de barreira da pele e preveniram o envelhecimento prematuro. Ambos – a argila e o extrato de algas – induziram a expressão gênica de COL1A1 e COL1A2 em células não irradiadas; interessante, as algas foram até superiores à argila. Estas conclusões, baseadas em experimentos *in vitro* e *in vivo*, fornecem uma justificativa científica para os benefícios do banho na Lagoa Azul. Entretanto, o fato de os autores do refe-

rido estudo terem utilizado a forma bruta desse fango, sem nenhuma purificação, dificulta a transposição das inferências observadas (GREYER-BECK *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos sobre o efeito do ácido retinoico (AR) mostram que houve um aumento significativo da área de fibras colágenas somente após 14 dias de aplicação. Esses achados são corroborados por dados de literatura. Por outro lado, embora o AR seja um potente estimulador da síntese de colágeno, suas ações, em pele humana, no que tange a pigmentação, elasticidade, firmeza e redução de rugas, são progressivas. Em um estudo realizado em humanos, utilizando-se uma quantidade maior do que aquela empregada nesta pesquisa (0,1%), muitos desses parâmetros só se mostram significativamente diferentes de peles tratadas com o veículo após quatro semanas, e, a partir daí, houve melhora crescente até oito semanas (TUCKER-SAMARAS *et al.*, 2009). Dos poucos estudos em pele de animais de experimentação, salientam-se os trabalhos em uma cepa de camundongos sem pelo. Um mês após o tratamento com luz UV, profundas alterações foram observadas na superfície da pele desses animais, e essas modificações incluem rugas e alterações de conteúdo de colágeno (TAKEMA, HATTORI & AIZAWA, 1996; KAMBAYASHI *et al.*, 2003).

Um recente estudo utilizando um tratamento tópico diário com AR (0,05%), peptídeos similares ao colágeno (pentapeptídeos e hexapeptídeos) e óleo de soja (*soy rejuvenating serum*; Reviva Labs, Inc.) mostrou que os três tratamentos, durante um mês, reduziram a rugosidade da pele dos animais, aumentaram a espessura da derme e da epiderme. Seus autores, embora não tenham quantificado o colágeno diretamente, o fizeram de maneira indireta e mostraram mais uma vez a importância da manutenção da hidratação da pele, uma vez que o creme à base de óleo de soja foi tão eficaz quanto o ácido retinoico em melhorar as rugas da pele (BHATTACHARYA *et al.*, 2009). Vale a pena salientar que, no protocolo desta pesquisa, foram avaliadas peles normais, e não fotoexpostas, daí talvez ter-se encontrado uma resposta ao ácido retinoico mais tardia.

Os resultados obtidos em relação à hidratação da pele foram igualmente surpreendentes. Inicialmente proposto para ser um controle para a vaporização e temperatura, esse procedimento, após 14 dias, foi tão eficaz quanto a argila e o AR em melhorar o conteúdo de colágeno na pele dos ratos na segunda semana, mostrando a importância da hidratação e, principalmente, da temperatura nessa síntese. Real-

mente, a síntese proteica é alterada por variações de temperatura, estando aumentada em temperaturas mais altas e reduzida nas mais baixas (ZHEGUNOV & KOTLIAROV, 1992; JACKIM & McDONALD, 1966). Em função da conhecida progressão dos efeitos do AR, é recomendável que este estudo se estenda por mais tempo, quando os dois tratamentos devem se diferenciar em termos de quantidade de colágeno na pele.

5. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados aqui verificados apontam para um efeito importante da argila sobre a síntese de fibras colágenas em pele de ratos e abre novas perspec-

tivas para futuros estudos de fangoterapia, que devem incluir caracterização dessa argila, uma avaliação do efeito desses componentes sobre a síntese e degradação, além de um maior tempo de exposição aos produtos. Futuros achados servirão para um melhor embasamento da utilização de argilas nos tratamentos estéticos.

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Antonio dos Santos Filho, pelos cuidados com os animais e auxílio nos ensaios experimentais; à Sra. Cássia Arruda, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, pelo auxílio técnico na preparação histológica das biópsias de pele.

REFERÊNCIAS

- ARGENZIANO, Giuseppe; DELFINO, Mario & RUSSO, Nadia. Mud and baththerapy in the acne cure. *Clinica Terapeutica*, v. 155, n. 4, p. 121-125, Roma, April, 2004.
- BAGNATO, Gian Filippo F.; DE FILIPPIS, Luigi G.; MORGANTE, Salvatore; MORGANTE, Maria L.; FARINA, Giuseppe; CALIRI, Annalisa; ROMANO, Christian; D'AVOLA, Giovanni M.; PINELLI, Pietro; CALPONA, Pina R.; STREVA, Paolina; RESTA, Maria L.; DE LUCA, Grazia & DI GIORGIO, Rosamaria M. Clinical improvement and serum amino acid levels after mud-bath-therapy. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, v. 24, n. 2-3, p. 39-47, Milano, 2004.
- BELLOMETTI, Simona; GIANNINI, Silvana; SARTORI, Leonardo. & CREPALDI, Gaetano. Cytokine levels in osteoarthritis patients undergoing mud bath therapy. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, v. 17, n. 4, p. 149-153, Milano, 1997.
- BELLOMETTI, Simona; RICHELMI, Plinio; TASSONI, Tommaso & BERTÈ, Francantonio. Production of matrix metalloproteinases and their inhibitors in osteoarthritic patients undergoing mud bath therapy. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, v. 25, n. 2, p. 77-94, 2005.
- BHATTACHARYYA, Tapan K.; LINTON, Jeannie; MEI, Lily & THOMAS, J. Regan. Profilometric and morphometric response of murine skin to cosmeceutical agents. *Archives of Facial Plastic Surgery*, v. 11, n. 5, p. 332-337, Chicago, September/October, 2009.
- BRITSCHKA, Zélia Maria N.; TEODORO, Walci R.; VELOSA, Ana Paula P. & MELLO, Suzana Beatriz V. de. The efficacy of Brazilian black mud treatment in chronic experimental arthritis. *Rheumatology International*, v. 28, n. 1, p. 39-45, Berlin, November, 2007.
- CLIJSEN, Ron; TAEYMANS, Jan; DUQUET, William; BAREL, André & CLARYS, Peter. Changes of skin characteristics during and after local parafango therapy as used in physiotherapy. *Skin Research and Technology*, v. 14, n. 2, p. 237-242, Copenhagen, May, 2008.
- COELHO, Antonio C.V.; SANTOS, Pérsio de S. & SANTOS, Helena de S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 146-152, São Paulo, janeiro/fevereiro, 2007.
- COSTA, Antônio Carlos S. da; TORINO, Cleonice Aparecida & RAK, João Gilberto. Capacidade de troca catiônica dos coloides orgânicos e inorgânicos de latossolos do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 21, n. 3, p. 491-496, Maringá, 1999.
- COSTANTINO, Maria & LAMPA, Enrico. Psoriasis and mud bath therapy: clinical-experimental study. *Clinica Terapeutica*, v. 156, n. 4, p. 145-149, Roma, luglio/agosto, 2005.
- DÁRIO, Giordana M. 2008. 80f. *Avaliação da atividade cicatrizante de formulação contendo argila medicinal sobre feridas cutâneas em ratos*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma: Unesc.
- DICHEVA, M.A.; KHYSHIKTUEV, B.S.; ANIKINA, L.V. & POPOV, V. M. Changes in the mineral metabolic indices of

REFERÊNCIAS

- osteoarthritis patients with the use of radon therapy and mud therapy. *Voprosy Kurortologii, Fizioterapii i Lechbnoi Fizicheskoi Kultury*, n. 3, p. 37-38, Moscow, May/June, 1998.
- GARCIA, Rosa Maria; MONTEIRO, Maria Eloísa N. & NATIVIDADE, Vilma. Tratamento do melasma facial dérmico com fangoterapia de Peruíbe. *Revista Fisio & Terapia*, v. 13, n. 63, p. 23-25, Rio de Janeiro, julho/agosto, 2008. Disponível em: <<http://issuu.com/oston/docs/name1ff664>>.
- GIBSON, Thomas. Physical properties of skin. In: MCCARTHY, Joseph G. *Plastic surgery*. Vol. 1. Philadelphia: WB Saunders Company, 1990.
- GREYER-BECK, Susanne; MÜHLBERG, Kathrin; BRENDEN, Heidi; FELSNER, Ingo; BRYNJÓLFSDÓTTIR, Ása; EINARSSON, Sigurbjörn & KRUTMANN, Jean. Bioactive molecules from the Blue Lagoon: *in vitro* and *in vivo* assessment of silica mud and microalgae extracts for their effects on skin barrier function and prevention of skin ageing. *Experimental Dermatology*, v. 17, n. 9, p. 771-779, Münster, September, 2008.
- GRIFFITHS, Christopher E. M. The role of retinoids in the prevention and repair of aged photoaged skin. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 26, n. 7, p. 613-618, Oxford, October, 2001.
- HORNEBECK, William. Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathologie Biologie*, v. 51, n. 10, p. 569-573, Paris, December, 2003.
- JACKIM, Eugene & McDONALD, Harry S. Protein and ribonucleic acid synthesis after exposure to warmth. *Nature*, v. 212, p. 406, London, October, 1966.
- JUNQUEIRA, Luiz Carlos U. & CARNEIRO, José. *Histologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 524p.
- JURZAK, Magdalena; LATOCHA, Malgorzata; GOJNICZEK, Katarzyna; KAPRAL, Malgorzata; GARNCARCZYK, Agnieszka & PIERZCHALA, Ewa. Influence of retinoids on skin fibroblasts metabolism *in vitro*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v. 65, n. 1, p. 85-91, Warszawa, January/February, 2008.
- KAMBAYASHI, Hiroaki; ODAKE, Yuki; TAKADA, Koji; FUNASAKA, Yoko & ICHIHASHI, Masamitsu. Involvement of changes in stratum corneum keratin in wrinkle formation by chronic ultraviolet irradiation in hairless mice. *Experimental Dermatology*, v. 12, Suppl. 2, p. 22-27, Münster, 2003.
- KEDE, Maria Paulina V. & SABATOVICH, Oleg (Eds.). *Dermatologia estética*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 771 p.
- KLIGMAN, Lorraine H.; SAPADIN, Allen N. & SCHWARTZ, Elaine. Peelings agents and irritants, unlike tretinoin, do not stimulate collagen synthesis in the photoaged hairless mouse. *Archives of Dermatological Research*, v. 288, n. 10, p. 615-620, Berlin, September, 1996.
- LATEEF, Humaira; SEVENS, Martin J. & VARANI, James. All-trans-retinoic acid suppresses matrix metalloproteinase activity and increase collagen synthesis in diabetic human skin in organ culture. *American Journal of Pathology*, v. 165, n. 1, p. 167-174, Bethesda, July, 2004.
- LOW, John & REED, Ann. *Eletroterapia explicada: princípios e prática*. 3. ed. São Paulo, Manole, 2001. 484p.
- MEDEIROS, Graciela M. da S. *Geoterapia: teorias e mecanismos de ação – um manual teórico-prático*. Tubarão: Unisul, 2007. 111 p.
- NEVOSTRUEV, S. A.; LOGVINOV, S. V.; EVTUSHENKO, I. D. & TIKHONOVSKAIA, O. A. Electrophoresis of sulphide mud extract in combined therapy of chronic inflammatory diseases of uterine appendages (an experimental and clinical study). *Voprosy Kurortologii, Fizioterapii i Lechbnoi Fizicheskoi Kultury*, n. 4, p. 24-28, Moscow, 2004.
- ORÍ, Reinaldo B.; BRITO, Gerly A. C.; FERREIRA, Francisco V. A.; SANTANA, Érika M. & FERNANDES, Mariana R. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histomorfometria e autofluorescência. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 4, p. 425-434, Rio de Janeiro, julho/agosto, 2003.
- ROSADO, Catarina; ROLIM, Marina Inês & RODRIGUES, L. M. Estudo do comportamento de dois modelos de evaporímetros em condições de utilização controlada: medições estáticas e dinâmicas *in vivo*. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, v. 2, n. 2, p. 89-93, Lisboa, 2005.
- RUIZ, Rogério de O.; FOZATI, Daniel José de M.; SANTOS, Nelson B. dos & GONELLA, Hamilton A. Uso de ácido trans-retinoico em derme: estudo experimental. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 8, n. 3, p. 17-24, Sorocaba, 2006.

REFERÊNCIAS

- RUIZ, Rogério de O.; FOZATI, Daniel José de M.; SANTOS, Nelson B. dos & GONELLA, Hamilton A. Uso de ácido trans-retinoico em derme: estudo experimental. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 8, n. 3, p. 17-24, Sorocaba, 2006.
- SCHILTZ, John R.; LANIGAN, Julia; NABIAL, Wanda; PETTY, Barbara & BIRNBAUM, Jay E. Retinoic acid induces cyclic changes in epidermal thickness and dermal collagen and glycosaminoglycan biosynthesis rates. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 87, n. 5, p. 663-667, Chapel Hill, November, 1986.
- SCHWARTZ, Elaine; MEZICK, James A.; GENDIMENICO, Gerard J. & KLIGMAN, Lorraine H. *In vivo* prevention of corticosteroid-induced skin atrophy by tretinoin in the hairless mouse is accompanied by modulation of collagen, glycosaminoglycans, and fibronectin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 102, n. 2, p. 241-246, Chapel Hill, February, 1994.
- SILVA, Ana Paula da; SILVA, Elizangela dos A. da & HERNANDEZ-BLAZQUEZ, Francisco J. Processo de queratinização no desenvolvimento do sistema tegumentar em mamíferos. *Saúde e Pesquisa*, v. 1, n. 2, p. 201-207, Maringá, 2008. Disponível em: <<http://www.cesumar.br/pesquisa/periodicos/index.php/saudpesq/article/view/742/606>>.
- SMIRNOV, L. D. Pelotherapy of psoriatic arthritis. *Vestnik Dermatologii Venerologii*, n. 9, p. 32-36, Moscow, September, 1977.
- SUKENIK, Shaul; BUSKILA, Dan; NEUMANN, Lily; KLEINER-BAUMGARTEN, Amalia; ZIMLICHMAN, R. S. & HOROWITZ, Jacob. Sulphur bath and mud pack treatment for rheumatoid arthritis at the dead area. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 49, n. 2, p. 99-102, London, February, 1990.
- TAKEMA, Yoshinori; HATTORI, Michihiro & AIZAWA, Katsunori. The relationship between quantitative changes in collagen and formation of wrinkles on hairless mouse skin after chronic UV irradiation. *Journal of Dermatological Science*, v. 12, n. 1, p. 56-63, Nagoya, April, 1996.
- TUCKER-SAMARAS, Samantha; ZEDAYKO, Tara; COLE, Curtis; MILLER, Dara; WALLO, Warren. & LEYDEN, James J. A stabilized 0.1% retinol facial moisturizer improves the appearance of photodamaged skin in an eight-week, double-blind, vehicle-controlled study. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 8, n. 10, p. 932-936, New York, October, 2009.
- UITTO, Jouni. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 7, n. 2 (Suppl.), p. 12-16, February, 2008.
- VARANI, James; FAY, Kevin & PERONE, Patricia. MDI 301, a non-irritating retinoid, induces changes in human skin that underlie repair. *Archives of Dermatological Research*, v. 298, n. 9, p. 439-448, Berlin, February, 2007.
- WANG, Frank; KAWAK, Heh Shin R.; ELBULUK, Nada; KACZMAREK, Anya L.; HAMILTON, Ted; VOORHEES, John J.; FISHER, Gary J. & KANG, Sewon. Retinoic acid 4-hydroxylase inducibility and clinical response to isotretinoin in patients with acne. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 61, n. 2, p. 252-258, Auburn, August, 2009.
- YAAR, Mina & GILCHREST, Barbara A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology*, v. 157, n. 5, p. 874-887, Derby, November, 2007.
- ZHEGUNOV, Gennadi F. & KOTLIAROV, A. O. Protein synthesis during acclimation of cold-blooded animals to various temperatures. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal (Ukrainian Biochemical Journal)*, v. 64, n. 1, p. 106-110, Kiev, January/February, 1992.