

PAULA ROBERTA SILVA DE CARVALHO

**COMPARAÇÃO DAS MEDIDAS INSTRUMENTAIS NÃO
INVASIVAS E PARÂMETROS CLÍNICOS ENTRE O
ENVELHECIMENTO INTRÍNSECO E O
FOTOENVELHECIMENTO DA PELE DOS ANTEBRAÇOS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2017

PAULA ROBERTA SILVA DE CARVALHO

**COMPARAÇÃO DAS MEDIDAS INSTRUMENTAIS NÃO
INVASIVAS E PARÂMETROS CLÍNICOS ENTRE O
ENVELHECIMENTO INTRÍNSECO E O
FOTOENVELHECIMENTO DA PELE DOS ANTEBRAÇOS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Aluna: Paula Roberta Silva de Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Ediléia Bagatin

Departamento de Dermatologia – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal
de São Paulo – EPM/UNIFESP

SÃO PAULO

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Paula Roberta Silva

Comparação das medidas instrumentais não invasivas e parâmetros clínicos entre o envelhecimento intrínseco e o fotoenvelhecimento da pele dos antebraços.

Paula Roberta Silva de Carvalho -- São Paulo, 2017.

xvi, 103 p.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: Comparison of non-invasive instrumental measurements and clinical parameters between intrinsic aging and photoaging of the forearm skin.

1. Envelhecimento intrínseco. 2. Envelhecimento extrínseco. 3. Fotoenvelhecimento. 4. Fotodano. 5. Medidas instrumentais. 6. Pele.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP
DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA
Pós-Graduação em Medicina Translacional

Chefe de Departamento:

Profa. Dra. Silmara da Costa Pereira Cestari

Coordenação da Pós-Graduação

Profa. Dra. Dulce Elena Casarini.

O projeto foi financiado pela FAPESP – Processo no. 2013/01118-5.
A aluna recebeu bolsa CAPES.

Dedico este trabalho ao meu esposo Márcio Borges de Carvalho e à minha mãe Cléia Cândida Silva por sempre acreditarem em mim mais do que eu mesma.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por ter me sustentado até aqui e por ter me capacitado nessa jornada.

Aos meus filhos, que são a verdadeira razão pela qual eu sempre sigo em frente.

Aos meus pais e esposo por todo apoio e carinho.

À Juliana Soares, por toda paciência e apoio, e por se tornar uma amiga tão especial.

À Dra. Juliana Sumita, por toda parceria e todos os bons exemplos que um ser humano pode dar. Tenho orgulho de ser amiga de uma profissional como você.

À Dra. Ediléia, minha orientadora, por toda paciência e por sempre ser tão solícita.

À Adriana Sanudo, pelo auxílio estatístico.

À minha amiga-irmã Aparecida Janice Fontes, por todo apoio e paciência.

Agradeço a participação de todas as voluntárias. Aprendi muito com vocês.

RESUMO

Carvalho PRS. **COMPARAÇÃO DAS MEDIDAS INSTRUMENTAIS NÃO INVASIVAS E PARÂMETROS CLÍNICOS ENTRE O ENVELHECIMENTO INTRÍNSECO E O FOTOENVELHECIMENTO DA PELE DOS ANTEBRAÇOS.** [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina; 2016.

Fundamentos: O envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento da pele apresentam diferenças biomecânicas e morfológicas que refletem clinicamente em aspereza, rugas superficiais e profundas, redução da elasticidade, hipo e hiperpigmentações e queratoses actínicas. A redução da espessura da epiderme é decorrente do tempo aumentado de migração das células basais até a camada córnea e da descamação pela diminuição do conteúdo hídrico e dos componentes do NMF (*Natural Moisturizing Factor* ou Fator Natural de Hidratação). A menor densidade do tecido colágeno dérmico deve-se à redução da sua síntese e aumento da degradação. O fotodano, relacionado à exposição solar crônica, acentua todas estas características e pode acarretar o desenvolvimento de lesões pré-malignas (queratoses actínicas) e malignas (carcinomas baso e espinocelular). **Objetivo:** Avaliar e comparar as características da pele das faces flexora (área coberta, com predomínio do envelhecimento intrínseco) e extensora (área exposta ao sol e outros fatores ambientais, com predomínio do envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento) dos antebraços através de parâmetros clínicos e medidas instrumentais não invasivas. **Casuística e Métodos:** O estudo transversal de intervenção diagnóstica incluiu 23 mulheres com idade superior a 60 anos. As faces extensora e flexora dos antebraços direito e esquerdo foram comparadas em relação aos parâmetros clínicos e as medidas instrumentais não invasivas, tais como: hidratação (corneometria), relevo da superfície da pele (profilometria), propriedades viscoelásticas, espessura dérmica e ecogenicidade dérmicas (ultrassom). **Resultados:** O conteúdo aquoso da camada córnea mostrou diferença significativa, ou seja, a face flexora (mais protegida) apresentou um valor médio maior do que a extensora (menos protegida). A média das medidas obtidas através das imagens do ultrassom de alta frequência mostrou diferenças entre as faces; a flexora apresentou menor espessura dérmica e maior ecogenicidade comparada à extensora. As medidas do relevo da pele mostraram diferenças significantes quando comparadas aspereza e descamação entre as faces extensora e flexora em ambos os antebraços, sendo menores na face flexora. Com relação à profundidade das rugas, houve diferença significativa da média entre as faces avaliadas apenas para o antebraço esquerdo ($p=0,017$), uma vez que a face flexora apresentou média maior do que a extensora. Não houve correlação significativa entre o conteúdo aquoso da camada córnea (corneometria) e das propriedades visco-elásticas da pele, assim como entre elas e as medidas obtidas pelo ultrassom. Na profilometria, apenas a descamação apresentou correlação negativa com a corneometria. As medidas das propriedades visco-elásticas da pele apresentaram correlação positiva entre as faces. As medidas obtidas pelo ultrassom e as das propriedades visco-elásticas da pele apresentaram correlação positiva na face flexora. Na face extensora, houve correlação positiva entre aspereza, descamação e profundidade das rugas. Na face flexora, a profundidade das rugas apresentou correlação negativa com a espessura dérmica; a densidade dérmica

apresentou correlação negativa com as outras medidas do ultrassom. Estes resultados paralelos aos parâmetros clínicos estabelecidos como rugas, elastose e diminuição da elasticidade e do conteúdo hídrico, evidenciam as diferenças entre fotoenvelhecimento e envelhecimento intrínseco. **Conclusão:** Diferenças significativas nas características biofísicas das faces extensora e flexora dos antebraços, ou seja, áreas com predominância de fotoenvelhecimento ou envelhecimento intrínseco, respectivamente, foram detectadas. As medidas instrumentais não invasivas, por apresentarem correlação positiva com os aspectos clínicos, podem ser ferramentas úteis para avaliação do fotoenvelhecimento e envelhecimento intrínseco em pesquisa clínica, como parâmetros de eficácia e segurança.

Palavras-chave: envelhecimento de pele; elasticidade; exposição à radiação; fotoenvelhecimento; pele.

COMPARISON OF NON-INVASIVE INSTRUMENTAL MEASUREMENTS AND CLINICAL PARAMETERS BETWEEN INTRINSIC AGING AND PHOTOAGING OF THE FOREARM SKIN

ABSTRACT

Background: The intrinsic and extrinsic skin aging present biomechanical and morphological differences, which are reflected in the appearance of roughness, superficial and deep wrinkles, atrophy, reduced elasticity, hypo- and hyperpigmentation and actinic keratosis. The photodamage causes accentuation of all these features and increases the risk for development of premalignant lesions (actinic keratosis) and malignant (basal and squamous cell carcinomas). **Objective:** to evaluate and compare the characteristics of the flexor (with a predominance of intrinsic aging) and extensor (chronically exposed to sunlight area and other environmental factors, with a predominance of extrinsic aging or photoaging) skin surfaces of the forearms. **Methods:** The cross-sectional study of diagnostic interventions, including 23 females, aged over 60 years. The extensor and flexor faces of right and left forearms were compared in relation to clinical parameters and non-invasive instrumental measures, such as: skin surface (profilometry), viscoelastic properties, hydration (corneometry) as well as dermal thickness and echogenicity (ultrasound). **Results:** The water content in the corneal layer showed a significant difference as the flexor area showed an average value greater than the extensor face. The average of the measurements obtained by high-frequency ultrasound showed difference between the faces. The skin surface measurements showed significant differences when compared roughness and desquamation of the extensor and flexor faces on both forearms, but for the flexor face, the differences were smaller. Regarding the wrinkles depth, there was a significant difference of average between the evaluated faces only for the left forearm ($p = 0.017$), once the flexor face presented an average value greater than the extensor. There was no significant correlation between measurements of the aqueous content of the corneal layer and the viscoelastic properties of the skin, as well as among those obtained by ultrasound. In the profilometry, only the scaling presented a negative correlation with the corneometry. The visco-elastic properties of the skin showed a positive correlation between the faces. The measurements obtained by the ultrasound and the visco-elastic properties of the skin showed a positive correlation in the flexor face. In the extensor face, there was a positive correlation between roughness, scaliness and wrinkle depth. In the flexor face, the depth of the wrinkles presented negative correlation with a dermal thickness. Dermal density showed negative correlation with other ultrasound measurements. These results were in agreement with established clinical parameters such as wrinkles, elastosis, decreased elasticity and water content, demonstrating the differences between photoaging and chronological aging. **Conclusion:** Significant differences in the biophysical characteristics of the extensor and flexor surfaces of the forearms were detected. The non-invasive instrumental measures were positively correlated with clinical findings. We concluded that they are useful tools for the evaluation of photoaging and chronological aging in clinical research, as efficacy and safety parameters.

Keywords: Aging skin; elasticity; radiation exposure; photoaging; skin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens obtidas pelo Ultrassom de alta frequência (20 MHz) - DermaScan® (Cortex Technology, Dinamarca), cedidas pela empresa.....	27
Figura 2 – Determinação do local das medidas instrumentais não invasivas.....	35
Figura 3 – Medição com o Corneometer® (Courage&Khazaka, Alemanha).....	36
Figura 4 – Medição com o VisioScan® (Courage&Khazaka, Alemanha).....	37
Figura 5 – Captura das imagens com o DermaScan® (Cortex Technology, Dinamarca).....	38
Figura 6 – Boxplot – medidas R2 e R7.....	43
Figura 7 – Profundidade das rugas ou medida da superfície da pele (profilometria) na face flexora do antebraço direito.....	46
Figura 8 – Profundidade das rugas ou medida da superfície da pele (profilometria) na face extensora do antebraço direito.....	46
Figura 9 – Ecogenicidade ou densidade dérmica calculada através das imagens da ultrassonografia de alta frequência na face extensora do antebraço direito.....	47
Figura 10 – Ecogenicidade ou densidade dérmica calculada através das imagens da ultrassonografia de alta frequência na face flexora do antebraço direito.....	47
Figura 11 – Gráfico Boxplot relacionando espessura da derme.....	48
Figura 12 – Gráfico de dispersão entre corneometria e descamação da face flexora.....	51
Figura 13 – Gráfico de dispersão entre R2 e R7 na face flexora.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados clínicos demográficos das pacientes.....	40
Tabela 2: Distribuição das 24 participantes de acordo com a classificação de GUIMARÃES (2015) e graus de envelhecimento intrínseco.....	41
Tabela 3: Distribuição das 23 participantes de acordo com classificação de GUIMARÃES (2015) nos antebraços.....	41
Tabela 4: Distribuição das 23 participantes de acordo com o grau de envelhecimento intrínseco nos antebraços.....	42
Tabela 5: Média $\pm$ erro padrão das medidas da corneometria de acordo com o lado e a face dos antebraços (n=23).....	43
Tabela 6: Média $\pm$ erro padrão das medidas da aspereza da pele obtidas pelo VisioScanVC 98® de acordo com lado e face dos antebraços (n=23).....	44
Tabela 7: Média $\pm$ erro padrão das medidas da descamação da pele obtidas pelo VisioScanVC 98® de acordo com lado e face dos antebraços (n=23).....	44
Tabela 8: Média $\pm$ erro padrão das medidas de maciez da pele obtidas pelo VisioScanVC 98® de acordo com lado e face dos antebraços (n=23).....	45
Tabela 9: Média $\pm$ erro padrão das medidas de profundidade das rugas obtidas pelo VisioScanVC 98® de acordo com lado e face dos antebraços (n=23).....	45
Tabela 10: Média $\pm$ erro padrão das medidas da ecogenicidade dérmica (%), calculadas pelas imagens obtidas pela ultrassonografia de alta frequência (n=23).....	47
Tabela 11: Média $\pm$ erro padrão das medidas de espessura (mm), calculadas pelas imagens obtidas pela ultrassonografia de alta frequência (n=23).....	48
Tabela 12: Média $\pm$ erro padrão das medidas da intensidade total (%), calculadas pelas imagens obtidas pela ultrassonografia de alta frequência (n=23).....	49
Tabela 13: Correlação de Spearman entre as medidas obtidas pelo Corneometer® e os outros equipamentos.....	50
Tabela 14: Correlação de Spearman entre as medidas obtidas pelo VisioScan®.....	52
Tabela 15: Correlação de Spearman entre as medidas obtidas pelo VisioScan® e Dermascan®.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

UV – Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A

ROS – Reactive Oxygen Species – Espécies Reativas de Oxigênio

US – Ultrassonografia

NMF – Natural Moisturizing Factor ou Fator Natural de Hidratação

UNIFESP – Universidade Federal do Estado de São Paulo

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa Clínica

UNICCO – Unidade de Cosmiatria, Cirurgia e Oncologia

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HSP – Hospital São Paulo

LEP – Low Echogenic Pixels – Pixels de baixa ecogenicidade

MEP – Medium Echogenic Pixels – Pixels de média ecogenicidade

HEP – High Echogenic Pixels – Pixels de alta ecogenicidade

SLEB ou **SENEB** – Sub-Epidermal Low ou Non-Echogenic Band – Faixa subepidérmica de baixa ecogenicidade ou não ecogênica

(SEsm) – Skin Smoothness – Maciez

(SEr) – Skin Roughness – Aspereza

(SEsc) – Scaliness – Descamação

(SEw) – Wrinkles – Rugas

LISTA DE SÍMBOLOS

mHz – Mega Hertz

mbar – Milibar

s – Segundos

mm – Milímetros

cm – Centímetros

min – Minutos

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Lista de símbolos.....	xiv
 1 INTRODUÇÃO	 17
 2 QUESTÕES DA PESQUISA	 19
 3 OBJETIVOS	 21
3.1 Geral	22
3.2 Específicos	22
 4 REVISÃO DA LITERATURA	 23
4.1 Envelhecimento cutâneo.....	24
4.2 Quadro Clínico	25
4.3 Medidas Instrumentais não Invasivas	25
4.3.1 Ultrassonografia Bidimensional de Alta Frequência ou 20 MHz	25
4.3.2 Profilometria ou Medidas de Superfície	28
4.3.3 Cutometria ou Medidas das Propriedades Visco-Elásticas da Pele.....	28
4.3.4 Corneometria ou Medida do Conteúdo Aquoso da Camada Córnea.....	29
 5 CASUÍSTICA E MÉTODOS	 31
5.1 Delineamento.....	32
5.2 População	32
5.3 Critérios de Inclusão	32
5.4 Critérios de Exclusão	32
5.5 Parâmetros Avaliados.....	33
5.5.1 Clínicos	33
5.5.2 Medidas Instrumentais Não Invasivas	33
5.6 Análise Estatística	38
 6 RESULTADOS	 39
6.1 Dados Demográficos da População do Estudo	40
6.2 Dados Clínicos.....	40
6.3 Medidas Instrumentais Não Invasivas	42
6.4 Correlações entre as Medidas Instrumentais Não Invasivas	49
 7 DISCUSSÃO	 54
 8 CONCLUSÕES	 60

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	62
10 PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	66
ANEXO 1	72
ANEXO 2	78
ANEXO 3	80
ANEXO 4	82
ANEXO 5.....	84
ANEXO 6.....	89
APÊNDICE A	91
APÊNDICE B	96
APÊNDICE C	118

O envelhecimento é um processo biológico inexorável e poucos estudos clínicos comparam de forma objetiva os mecanismos extrínseco e intrínseco, que se superpõem ao longo do tempo.¹

Ocorrem modificações nos músculos, gordura e pele da face; os tecidos se reposicionam por ação da gravidade; as rugas se originam da atrofia das várias camadas da pele, elastose e influência do excesso de expressões faciais.²

No fotoenvelhecimento ocorre destruição da estrutura fibrilar, aumento da substância intercelular, a junção dermo-epidérmica fica achatada e existe infiltrado inflamatório, ainda que subclínico.³ As células de Langerhans sofrem redução comprometendo a resposta imune, acelera-se o processo de encurtamento dos telômeros, acentuando a senescência e a apoptose celular. Também ocorre aumento da síntese de melanina e diminuição dos antioxidantes naturais, diminuindo a proteção ao DNA.⁴

Os sinais do envelhecimento intrínseco, agravados pelo fotodano, caracterizam-se por: rugas superficiais e profundas, sulcos, alterações do relevo da pele, redução da elasticidade, modificações de textura, ptoses, alterações na pigmentação e dilatações vasculares (telangiectasias). A busca pela prevenção e tratamentos eficazes para controlar o fotoenvelhecimento tem aumentado nos últimos anos, o que justifica a realização de estudos que caracterizem o quanto o envelhecimento intrínseco é acelerado pelos fatores ambientais.^{5- 8}

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar áreas com predomínio de sinais de fotoenvelhecimento e envelhecimento intrínseco dos antebraços, através de parâmetros clínicos e medidas instrumentais não invasivas para verificar se o fotoenvelhecimento acentua de forma significativa as alterações da pele cronicamente exposta aos fatores ambientais.

2.1. Existem diferenças entre os sinais clínicos do fotoenvelhecimento e do envelhecimento intrínseco?

2.2. Existem diferenças entre as medidas instrumentais não invasivas da pele acometida pelo fotoenvelhecimento e envelhecimento intrínseco?

2.3. As diferenças nos parâmetros clínicos correlacionam-se com as determinadas pelas medidas instrumentais não invasivas da pele?

2.4. É possível estabelecer o valor das medidas instrumentais não invasivas como critérios de eficácia e segurança nos tratamentos antienvelhecimento?

3.1 Geral:

Avaliar, comparar e correlacionar as medidas instrumentais não invasivas obtidas na pele dos antebraços com predomínio das características clínicas do envelhecimento intrínseco e extrínseco.

3.2 Específicos:

3.2.1 Caracterizar os sinais clínicos do envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento nos antebraços.

3.2.2 Determinar as características da pele com predomínio de sinais de envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento, através de medidas instrumentais não invasivas.

3.2.3 Correlacionar os sinais clínicos do envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento nos antebraços com as medidas instrumentais não invasivas.

3.2.4 Comparar os sinais clínicos e as medidas obtidas através de métodos instrumentais não invasivos entre áreas com predomínio de envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento nos antebraços.

4.1 Envelhecimento Cutâneo

Quase todas as estruturas e funções da pele são afetadas pelo envelhecimento, tais como: capacidade de auto-renovação da epiderme, fundamental para a sua função de barreira; resposta imunológica; termo-regulação; organização e constituição da matriz extracelular dérmica, com predomínio de colágeno tipo I.⁹⁻¹¹ A pele desempenha múltiplas funções, incluindo efeitos mecânicos sobre a elasticidade do tecido, característica responsável pelo retorno à sua forma original após a remoção da tensão.¹²

O envelhecimento intrínseco ou cronológico é determinado por fatores genéticos, hormonais e metabólicos. O envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento é influenciado por fatores ambientais como radiação solar, poluição, tabagismo, dieta e excesso de álcool. Vários fatores determinam o dano causado à pele pela exposição à luz ultra-violeta (UV) tais como: latitude, estação do ano, hora do dia, exposição aguda ou crônica. O fotodano caracteriza-se por manifestações clínicas agudas (queimadura solar, reações de fotossensibilidade) e crônicas (elastose solar, envelhecimento precoce, carcinogênese).¹³ Os raios UV achatam a interface dermo epidérmica, com perda das papilas dérmicas. Desta forma, a espessura dérmica vascularizada é reduzida, levando à diminuição da atividade dos fibroblastos e das fibras de elastina. O colágeno, componente essencial para a elasticidade e sustentação da pele, apresenta-se diminuído com o envelhecimento.¹⁴ A radiação UV contribui para a geração das espécies reativas de oxigênio ou *reactive oxygen species* (ROS), também produzidas pelo metabolismo mitocondrial. As ROS são neutralizadas por sistemas antioxidantes naturais até certo limite, a partir do qual causam danos diretos ao DNA e peroxidação lipídica de várias estruturas celulares.^{15,16} Além disso, são ativadas vias de sinalização nucleares com produção de citocinas pró-inflamatórias (via NF-kB), redução da síntese de colágeno e aumento da produção das metaloproteinases (via AP-1) com inflamação, degradação e redução da matriz dérmica extracelular.^{17,18} O dano direto ao DNA gera fotoprodutos (dímeros de pirimidina e timina) e ativa o gene supressor de tumor p53 como mecanismo de proteção, induzindo apoptose das células com risco carcinogênico.^{15,19,20} A mutação do gene p53 torna-o indutor de tumor, quando podem se desenvolver lesões pré-neoplásicas (queratoses actínicas) e o câncer de pele não melanoma - carcinomas baso e espinocelular.²¹ As queratoses actínicas múltiplas caracterizam o

fotoenvelhecimento avançado e são marcadores de risco para carcinogênese, pois constituem o chamado "campo de cancerização".²²

Em estudo descritivo, foram observadas as seguintes alterações no envelhecimento intrínseco: diminuição da espessura da epiderme, rugas finas, xerose e perda de elasticidade. Já no fotoenvelhecimento, além destes sinais, estavam presentes: hipo e hiperpigmentações, elastose, rugas profundas, telangiectasias e púrpura.¹ Especial atenção é necessária para o fato de que a exposição solar excessiva e seus efeitos são um problema de saúde pública no que diz respeito a danos solares acumulados. O excesso de exposição pode aumentar 66% o risco de doenças de pele, tais como xerose e eczemas.²³

4.2 Quadro Clínico

A gravidade dos sinais clínicos característicos do fotoenvelhecimento dos antebraços pode ser estabelecida pela escala de Guimarães (2015), que inclui a presença de: 1) queratose actínica superficial; 2) queratose actínica hipertrófica; 3) rugas; 4) lentigos solares; 5) púrpura visível; 6) cicatrizes pseudo-estelares; 7) elastose e 8) diminuição da elasticidade. O grau de cada sinal multiplicado por fatores multiplicativos resultam em escores correspondentes à gravidade do fotoenvelhecimento classificado em: 1) leve, escore de 0 a 30; 2) moderado, 31 a 70; 3) avançado, 71 a 100; 4) grave, maior que 100.²⁴ Para o envelhecimento intrínseco, os seguintes sinais são considerados: 1) redução da elasticidade; 2) redução da espessura; 3) rugas finas e 4) xerose ou ressecamento da pele.

4.3 Medidas Instrumentais Não Invasivas

4.3.1 Ultrassonografia Bidimensional de Alta Frequência ou 20 MHz

Esta técnica permite a análise de parâmetros quantitativos, morfologia e estrutura da derme em relação à espessura, ecogenicidade geral e segmentada através da captura de imagens e análise digital dos resultados.²⁵ A frequência elevada transmite uma imagem com alta definição, adequada para estudar os tecidos próximos à superfície do corpo, numa profundidade máxima de 0,3 cm. É possível observar herniações, nodulações, irregularidades, espessura, profundidade e edema. As imagens são calculadas em pixels, numa escala de 0 a 255 pixels. A ecogenicidade diminui se houver edema. Para as mensurações, é necessário ter um ambiente

climatizado com temperatura e umidade controladas, pois estes fatores interferem nos resultados. Ela permite visualização da epiderme, derme, interface entre derme e hipoderme e região superior da hipoderme, dependendo da área corporal. É também um método preciso para determinar a espessura da pele e o conteúdo de colágeno em várias regiões anatômicas com diferentes intervalos de idade. A espessura da pele é considerada um parâmetro objetivo e fisiológico que permite a avaliação da influência de fatores endógenos ou ambientais, como os raios UV nos tecidos.²⁵⁻²⁹ Para avaliar o envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento, pode-se analisar a derme total, derme superior, derme inferior e a relação entre eles. Os parâmetros da derme total na área fotoexposta apresentam maior correlação com os parâmetros clínicos.³⁰

A captura de imagens da pele por ultrassonografia é realizada através do disparo de um pulso acústico e medida pela resposta acústica que é captada por um transdutor de ultrassom. Os sinais são então processados, e é produzida uma imagem em corte que representa uma análise da intensidade e amplitude. Áreas com pequenas alterações na densidade como tecido cicatricial e gordura produzem uma baixa reflexão e são visualizadas como cores escuras ou hipoeecogênicas, enquanto áreas com alterações significativas na densidade, como a derme jovem e saudável, são visualizadas como áreas brilhantes ou hipereecogênicas.³⁰

A frequência do ultrassom determina a resolução e penetração da medida. A baixa frequência permite penetração mais profunda, porém as imagens apresentam baixa resolução. Quando a frequência do US é mais alta, a penetração é mais superficial e as imagens apresentam alta resolução. Sistemas de ultrassom de alta frequência utilizam frequência acima de 18 MHz para obter imagens da estrutura da pele com resolução aceitável.³¹

O equipamento Dermascan®, 20 MHz, tem três componentes principais, incluindo um transdutor, um sistema de elaboração e um banco de dados. A onda ultrassônica é parcialmente refletida no limite entre estruturas adjacentes, gerando ecos de diferentes amplitudes. A intensidade dos ecos é avaliada por um microprocessador e visualizada como uma imagem bidimensional colorida. A escala de cor de ecogenicidade varia de branco, amarelo, vermelho, verde para azul e preto. Em sonogramas cutâneos normais, a epiderme aparece como uma faixa hipereecóica branca, a derme como uma composição multicolorida (amarelo, verde e/ou vermelho) e o tecido subcutâneo aparece negro (hipoeecóico). Pixels com ecogenicidade baixa

(*Low Echogenicity Pixels*) (LEP) quantificam o grau de hidratação cutânea, processos inflamatórios, elastose solar e degeneração de colágeno. Pixels com ecogenecidade média e alta (*Medium Echogenicity Pixels and High Echogenicity Pixels*) (MEP e HEP) quantificam as estruturas de colágeno, fibras de elastina e microfibrilas. A chamada SLEB ou SENEb – (*Sub-Epidermal Low ou Non-Echogenic Band*) é uma faixa subepidérmica de baixa ecogenecidade ou não ecogênica que pode ser observada na derme papilar, particularmente nas regiões com predomínio do fotoenvelhecimento, reflete a elastose, degradação do tecido colágeno, acúmulo de glicosaminoglicanas e de água.³⁰ O software tem a capacidade de associar a amplitude do pixel a uma escala numérica variando entre 0 e 255. Selecionando um determinado intervalo da escala 0-255, obtêm-se valores correspondentes a um determinado tipo de pixel. Assim, o intervalo 0-30 corresponde ao LEP, o intervalo 50-150 ao MEP e o intervalo 200-255 ao HEP.³² A **Figura 1** mostra imagens obtidas por ultrassom de alta frequência (20 MHz) nas quais identifica-se: epiderme representada pela faixa branca; diminuição da ecogenecidade dérmica com o envelhecimento da pele representada pelos espaços escuros ou hipoeecogênicos, e redução de cores pela desestruturação dérmica e o limite derme-hipoderme.

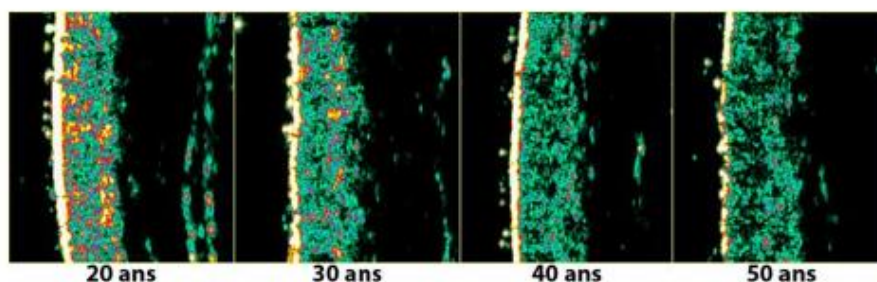


Figura 1 – Imagens obtidas pelo Ultrassom de alta frequência (20 MHz) - DermaScan® (Cortex Technology, Dinamarca), cedidas pela empresa

4.3.2 Profilometria ou Medidas de Superfície

A medida do relevo da pele é obtida através de um sistema de câmera de vídeo com fonte de luz UVA, unidade de digitalizador e software Windows para processamento de dados de imagens na superfície da pele.³³ A profilometria é o método que analisa a maciez e aspereza da pele, assim como a presença e intensidade da descamação e rugas.³¹ Como método não invasivo, apresenta grande confiabilidade nestes parâmetros, tanto na pele normal como quando há hiperqueratose. Pode ser aplicado em diversos segmentos corporais.³⁴ Seus parâmetros também se correlacionam com a hidratação da pele, mensurada por outros equipamentos, sendo utilizado em diversos estudos para comprovar a eficácia de cosméticos e fármacos.³⁵

O equipamento VisioScan® (Courage-Khazaka, Alemanha) é uma câmera de vídeo com luz UVA de alta resolução que utiliza o método Surface Evaluation for Living Skin (SELS) para avaliar a rugosidade da pele. Esse método analisa a distribuição do nível de cinza das capturas de imagens e permite o cálculo de quatro parâmetros clínicos (maciez, aspereza, descamação e rugas) para descrever quantitativa e qualitativamente a superfície da pele.³¹

4.3.3 Cutometria ou Medidas das Propriedades Visco-Elásticas da Pele

Este método permite visualizar e medir as propriedades visco-elásticas da pele, como firmeza e elasticidade.³⁶ Um dos equipamentos disponíveis é o Cutometer® (Courage & Khazaka, Alemanha). A medida é feita por meio da deformação vertical da pele, quando tracionada por meio de um vácuo controlado por uma sonda de sucção constante de 500 mbar, com ciclos de sucção e relaxamento.³⁷⁻

³⁸ As curvas obtidas fornecem parâmetros R (R0 a R9) que representam:

R0 - distensão final da primeira curva;

R1 - capacidade da pele de retornar ao estado original;

R2 - medida entre a amplitude máxima e a capacidade de elasticidade bruta;

R3 - ponto máximo mais elevado da última curva;

R4 - ponto mínimo mais baixo da última curva R5 - elasticidade residual;

R6 - razão entre a extensão elástica e visco-elástica, também chamada de relação visco-elástica;

R7 - parte da elasticidade comparada com a curva completa;

R8 - quanto menor o valor, mais elástica será a curva;

R9 - deformação residual no final do ciclo de medição.

As características biomecânicas dos tecidos têm sido amplamente utilizadas para caracterizá-los em relação à viscoelasticidade e distensibilidade.¹² A elasticidade é genericamente definida como a propriedade física de uma substância que permite mudança de comprimento, volume ou forma em resposta a uma força, seguida pela recuperação em direção à sua forma original quando a força é removida. A viscoelasticidade da pele proporciona proteção contra lesões, uma vez que permite um movimento adicional (em comparação com apenas propriedades elásticas) das estruturas da pele afastando-se e voltando para a linha de base.

Várias características do Cutometer® o tornam ideal para pesquisas e medidas das propriedades visco-elásticas da pele. É o mais comumente usado em grande número de estudos em diversas áreas. O seu uso requer pouco treinamento (aproximadamente 2 horas), e uma série de medições realizadas por um operador experiente em quatro locais da pele leva cerca de 5 min. Também permite que o investigador obtenha a medida do quanto de pele foi levantada pela sonda de sucção. As alterações na deformação da pele são registradas opticamente e a análise das curvas de medição registradas permite determinar as características elásticas e plásticas da pele. A sucção pode variar de 20 a 500 mbar (milibar, uma unidade de pressão) e o tempo de sucção de 0,1 a 60s. As suas sondas têm aberturas que variam de 2 a 8 mm de diâmetro. As aberturas menores (2 a 4 mm) são usadas para avaliar as camadas superiores da epiderme, enquanto a abertura maior (8 mm) permite a medida da derme. A saída do Cutometer® inclui medidas de deformação elástica (em centésimos de milímetros, deslocamento total da posição inicial na pressão negativa máxima), retração imediata (em centésimos de milímetros, 0,1 s após a liberação de pressão negativa) e a elasticidade biológica.³⁸

4.3.4 Corneometria ou Medida do Conteúdo Aquoso da Camada Córnea

Esta técnica mede a hidratação da pele, ou seja, o conteúdo aquoso da camada córnea da epiderme que é mantido por um filme hidrolipídico, que tem como função proteger a pele do ressecamento e manter sua flexibilidade. O estrato córneo desempenha o papel de barreira à perda de água e é composto pelos corneócitos e por uma matriz de bicamadas lipídicas intercelulares. O epitélio permanece flexível quando contém 10-20% de água, mas se torna quebradiço quando o teor hídrico é menor que 10%.³⁹ Para essa determinação, utiliza-se o método da capacitância, pois a passagem de corrente alternada de baixa frequência através da pele depende do

teor de água da camada córnea e da sua integridade. As medidas são realizadas em triplicata, sendo que a variação máxima entre as leituras não deve ser maior que 10%. Os resultados são apresentados em unidades corneométricas (intrínsecas do aparelho) que variam de 0 a 100. A alteração da hidratação da pele normalmente é avaliada pela comparação das médias dos índices corneométricos.⁴⁰

O equipamento denominado Corneometer® contém dois eletrodos com diferentes cargas elétricas que formam um campo eletromagnético que determina a constante dielétrica do conteúdo aquoso do estrato córneo. A profundidade de medição é baixa (os primeiros 10-20 μm do estrato córneo). As vantagens deste método são: tempo de medição muito curto (1 s), alta reprodutibilidade das medições e falta de contato galvânico entre a área medida e o aparelho de medição. Assim, os resultados obtidos não são influenciados pela condutividade iónica ou efeitos de polarização.⁴¹

5.1 Delineamento:

Estudo transversal de intervenção diagnóstica.

5.2 População:

Foram incluídas 24 mulheres menopausadas, saudáveis, com idades acima de 60 anos que buscaram a Unidade de Cosmiatria, Cirurgia e Oncologia (UNICCO), do Departamento de Dermatologia - UNIFESP, para tratamento de pele envelhecida nos antebraços e que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (**ANEXO 1**), após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica (CEP) - HSP/ UNIFESP, número CAAE: 12587913.6.00005505 (**APÊNDICE A**). O TCLE foi elaborado e aprovado para um projeto maior que envolveu as medidas instrumentais não invasivas, fotografias, exame clínico, biópsias de pele, exames histopatológicos e imunohistoquímicos, além de intervenção terapêuticas. As pacientes selecionadas foram as mesmas do estudo da pós-graduanda de doutorado, Juliana Sumita.

5.3 Critérios de Inclusão:

1. Mulheres saudáveis menopausadas e que não faziam reposição hormonal, com idade acima de 60 anos;
2. Fototipos II e III de acordo com a classificação de Fitzpatrick⁴² (**ANEXO 2**);
3. Concordância em evitar a exposição solar durante todo o estudo;
4. Concordância com as condições do estudo, capacidade de compreender e seguir rigorosamente as orientações recebidas, disponibilidade para comparecer às reavaliações periódicas e assinatura do TCLE.

5.4 Critérios de Exclusão:

1. Tratamento tópico, exceto filtros solares, com:
 - ácido retinóico, há pelo menos 6 meses;
 - outros retinóides, alfa-hidroxiácidos, poli-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos e ácido ascórbico, há pelo menos 3 meses;
2. Tratamento prévio com retinóide oral nos últimos 6 meses;
3. Tratamento prévio com *peelings* químicos superficiais, microdermoabrasão e laser não-ablativo, por período igual ou superior a 3 meses;
4. Presença de fotodermatose;

5. Presença de dermatoses infecciosas ou inflamatórias nos membros superiores;
6. Quimioterapia nos últimos 3 meses;
7. Evidência clínica de imunossupressão.

5.5 Parâmetros Avaliados

5.5.1 Clínicos

A avaliação dos sinais clínicos do envelhecimento da pele dos antebraços foi realizada em conjunto com a médica dermatologista, pós-graduanda de Doutorado, Juliana Sumita, responsável pela pesquisa do TCLE. Foram utilizadas a escala de GUIMARÃES (2015)²⁴ (**ANEXO 3**) para o fotoenvelhecimento. Para o envelhecimento intrínseco, a escala proposta pelos autores incluiu os seguintes sinais clínicos: 1) redução da elasticidade; 2) redução da espessura; 3) rugas finas e 4) xerose ou ressecamento da pele. Para cada sinal, foi atribuído um grau de acordo com escala de 6 pontos: 0=ausente, 1=muito leve, 2=leve, 3=moderado, 4=grave, 5=muito grave e um escore final variando entre 2 e 20, considerando que pelo menos dois sinais deveriam estar presentes ainda que em grau muito leve. De 2 a 5, o grau de envelhecimento foi classificado como muito leve; de 6 a 9, leve; de 10 a 13, moderado; de 14 a 17, grave e de 18 a 20, muito grave (**ANEXO 4**).

5.5.2 Medidas Instrumentais Não Invasivas

Para a determinação do local das medidas não invasivas, foi traçada uma linha do cotovelo até o punho, na face extensora e flexora e estabelecido um ponto, no espaço de 10cm, 4cm e 7cm (**Figura 2**). Foram feitas 3 medidas na face extensora e 3 medidas na face flexora para cada equipamento nos pontos citados acima. Estas medidas foram realizadas apenas em uma visita, com duração de 30 min para cada paciente. Esta visita era a de pré tratamento para o estudo da pós-graduanda Juliana Sumita, que utilizou uma ficha clínica e depois transferiu os dados para uma planilha de Excel (**ANEXO 5**). Após as demarcações, em sala climatizada (controle de temperatura e umidade), a seguinte ordem para a realização das medidas foi adotada:

- **Corneometria** - Corneometer® (Courage-Khazaka, Alemanha): medida do conteúdo aquoso da camada córnea; a **Figura 3** mostra um exemplo de medição com o Corneometer®.

- **Cutometria** - Cutometer® (Courage-Khazaka, Alemanha): medida das propriedades visco-elásticas da pele; as curvas obtidas fornecem parâmetros R (R0 a R9); neste estudo foram consideradas as medidas R2 e R7.

- **Profilometria** - VisioScanVC98® (Courage-Khazaka, Alemanha): para as medidas de superfície ou relevo da pele; este método utiliza o sistema SELS²⁷⁻²⁹ representado por quatro parâmetros quantitativos e qualitativos:

(SEsm) – *Skin Smoothness* – maciez

(SEr) – *Skin Roughness* – aspereza

(SEsc) – *Scaliness* – descamação

(SEw) – *Wrinkles* – rugas

Exemplo da captura da medição é demonstrado na **Figura 4**.

- **Ultrassonografia** Tridimensional de alta resolução ou frequência, 20 MHz - DermaScan® (*Cortex Technology*, Dinamarca): para as mensurações, é necessário ter um ambiente climatizado com temperatura e umidade controladas, pois estes fatores interferem nos resultados. Permite visualização da epiderme, derme, interface entre derme e hipoderme e região superior da hipoderme, dependendo da área corporal.³⁵ Exemplo da captura das imagens é apresentada na **Figura 5**.

Quando necessária, era feita a tricotomia na face externa dos antebraços. Essa ordem garantia que o gel condutor utilizado para a realização da ultrassonografia (US) não iria interferir nas demais medidas. As medidas eram anotadas na ficha de avaliação (**ANEXO 5**)



Figura 2 – Determinação do local das medidas instrumentais não invasivas



Figura 3 – Medição com o Corneometer® (Courage&Khazaka, Alemanha)



Figura 4 – Medição com o VisioScan® (Courage&Khazaka, Alemanha)



Figura 5 – Captura das imagens com o DermaScan® (Cortex Technology, Dinamarca)

5.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos em média e desvios-padrão para as variáveis quantitativas, e em números absolutos e porcentagens para as variáveis qualitativas.

Para a Classificação de Zerbini e para o envelhecimento intrínseco foi calculada a concordância dessas classificações entre o antebraço direito e o esquerdo através do coeficiente Kappa.

Utilizou-se análise de variância (ANOVA) com medida repetida para verificar possíveis diferenças entre a face flexora e a extensora em cada uma das medidas obtidas pelos vários aparelhos.

A correlação entre as medidas obtidas pelos vários aparelhos em cada uma das faces foi calculada através do coeficiente de correlação de Spearman. Em toda análise estatística foi utilizado nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram p-valor menor do que 5% ($p<0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Dados Demográficos da População do Estudo

Foram incluídas 24 mulheres com idades variando entre 63 a 85 anos e média de 75 anos (desvio padrão = 6 anos). (**Tabela 1**). Quanto ao fototipo, 62,5% das mulheres foram classificadas como fototipo II (n=15) e 37,5% como fototipo III (n=9). A maioria das mulheres participantes eram não fumantes (n=17; 70,8%), três foram classificadas como ex-tabagistas (12,5%) e 4 como fumantes (16,7%).

Tabela 1: Dados clínicos demográficos das pacientes

VARIÁVEIS		
Idade (anos):	75,1 (desvio	75,5
média e mediana	padrão de 6,2 anos)	
Fototipo (%)	II = 15 (62,5)	III = 9 (37,5%)
Exposição ao sol (%)	Sim = 4 (16,7%)	Não = 20 (83,3%)
Motoristas (%)	Sim = 9 (37,5%)	Não = 15 (62,5%)
Uso regular de filtro solar (%)	Sim = 18 (75%)	Não = 6 (25%)
TRH (%)	Sim = 9 (37,5%)	Não = 15 (62,5%)
Tabagismo (%)	Sim = 4 (16,7%)	Nunca = 17 (70,8%) Pararam = 3 (12,5%)
Câncer de pele (%)	Melanoma = 2 (8,3%) CBC = 4 (16,7%) CEC = 7 (29,1)	Não = 13 (54,2%)
Outro câncer (%)	Sim = 1 (4,2%)	Não = 23 (95,8%)

6.2 Dados Clínicos

A **Tabela 2** demonstra nos antebraços direito e esquerdo, de acordo com a classificação de GUIMARÃES (2015)²⁴; os graus mais frequentes do fotoenvelhecimento foram leves e moderados. O mesmo foi observado no envelhecimento intrínseco.

Tabela 2: Distribuição das 24 participantes de acordo com a classificação de GUIMARÃES (2015) para fotoenvelhecimento e graus de envelhecimento intrínseco

	Antebraço Direito		Antebraço Esquerdo	
	N	%	N	%
Classificação				
Guimarães				
Leve	6	25.0	6	25.0
Moderada	12	50.0	10	41.7
Avançada	3	12.5	6	25.0
Grave	3	12.5	2	8.3
Envelhecimento				
Intrínseco^a				
Muito leve	5	21.8	5	21.8
Leve	7	30.4	6	26.1
Moderado	8	34.8	9	39.1
Grave	3	13.0	3	13.0

a. n = 23 pacientes (uma participante não foi avaliada)

Após a inclusão, uma das mulheres, de 81 anos, desistiu de participar do estudo, por apresentar quadro depressivo. Assim, a média das idades passou para $74,9 \pm 6,2$ anos. A **Tabela 3** apresenta a distribuição das 23 participantes avaliadas de acordo com a classificação de GUIMARÃES (2015) para os antebraços direito e esquerdo.

Tabela 3: Distribuição das 23 participantes de acordo com classificação de GUIMARÃES (2015) nos antebraços

Antebraço	Esquerdo				Total
	Leve	Moderada	Avançada	Grave	
Direito					
Leve	5	1	0	0	6
Moderada	1	8	3	0	12
Avançada	0	1	2	0	3
Grave	0	0	0	2	2
Total	6	10	5	2	23

De acordo com a **Tabela 3**, verifica-se que 18 (73,9%) das participantes avaliadas apresentaram a mesma classificação de Guimarães em ambos os antebraços. Foi calculado o coeficiente de Kappa que foi igual a 61,0%, representando uma boa concordância. Cinco pacientes apresentaram classificações distintas entre os antebraços, sendo que, em três delas, a classificação no antebraço direito foi moderada e no esquerdo foi avançada.

A **Tabela 4** apresenta a distribuição do grau de envelhecimento intrínseco em ambos os antebraços, observando-se que 20 (86,9%) participantes apresentaram a mesma classificação em ambos os braços (Kappa = 82,0%), indicando uma concordância muito boa.

Tabela 4: Distribuição das 23 participantes de acordo com o grau de envelhecimento intrínseco nos antebraços

Antebraço		Esquerdo			
Direito	Muito leve	Leve	Moderado	Grave	Total
Muito leve	5	0	0	0	5
Leve	0	6	1	0	7
Moderado	0	0	7	1	8
Grave	0	0	1	2	3
Total	5	6	9	3	23

6.3 Medidas Instrumentais Não Invasivas

Na corneometria, verificou-se diferença significativa da média dos valores entre as faces $p < 0,001$, ou seja, nos dois antebraços, a face flexora apresentou média maior do que a face extensora, com diferença estimada em $9,4 \pm 1,0$, $p < 0,001$. Não houve diferença entre os lados. Isso indica que a superfície mais exposta aos fatores ambientais, particularmente ao sol, apresenta conteúdo de água menor na camada córnea (**Tabela 5**).

Tabela 5: Média $\pm$ erro padrão das medidas da corneometria de acordo com o lado e a face dos antebraços (n=23)

Face	Lado		p-valor
	Direito	Esquerdo	
Flexora	44,0 $\pm$ 1,9	42,8 $\pm$ 2,3	0,406
Extensora	33,8 $\pm$ 2,2	34,1 $\pm$ 1,9	0,816
p-valor	<0,001	<0,001	

As medidas das propriedades viscoelásticas da pele determinadas pelo Cutometer® são apresentadas na **Fig 6**, mostrando resultados semelhantes nos dois lados (direito e esquerdo), assim como para as faces (flexora e extensora).

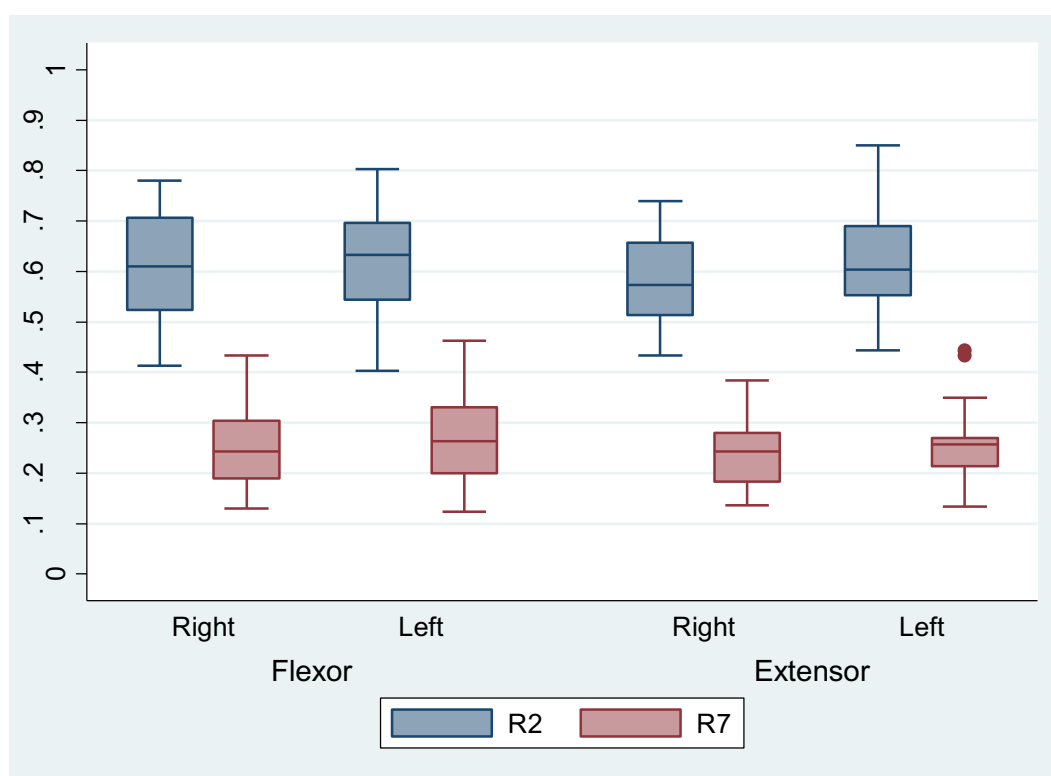


Figura 6 - Gráfico BoxPlot - medidas R2 e R7

Em relação às medidas da superfície ou relevo da pele (profilometria), houve diferença significativa na comparação entre a aspereza e a descamação das faces extensora e flexora nos dois antebraços, sendo que a face flexora apresentou médias

menores que a extensora $p < 0,001$. Essa diferença foi estimada em $1,51 \pm 0,25$ para aspereza (**Tabela 6**) e $0,26 \pm 0,05$ para descamação (**Tabela 7**). Esses resultados indicam a influência esperada de fatores ambientais na superfície da pele fotoexposta (face extensora), causando comprometimento da barreira cutânea.

Tabela 6: Média $\pm$ erro padrão das medidas da aspereza da pele obtidas pelo VisioScanVC 98® de acordo com lado e face dos antebraços (n=23)

Face	Lado		p-valor
	Direito	Esquerdo	
Flexora	$3,73 \pm 0,14$	$4,11 \pm 0,19$	0,276
Extensora	$5,51 \pm 0,43$	$5,36 \pm 0,33$	0,664
p-valor	<0,001	<0,001	

Tabela 7: Média $\pm$ erro padrão das medidas da descamação da pele obtidas pelo VisioScanVC 98® de acordo com lado e face dos antebraços (n=23)

Face	Lado		p-valor
	Direito	Esquerdo	
Flexora	$0,92 \pm 0,07$	$0,91 \pm 0,07$	0,846
Extensora	$1,18 \pm 0,06$	$1,16 \pm 0,08$	0,775
p-valor	<0,001	<0,001	

Em relação à maciez, verificou-se diferença significativa na média dos valores entre as faces p (0,021), ou seja, a face extensora apresentou média maior que a face flexora, com diferença estimada em $7,7 \pm 3,3$. Houve diferença entre os lados, p 0,038, pois o lado esquerdo apresentou média maior que o lado direito, estimada em $6,9 \pm 3$ (**Tabela 8**).

Tabela 8: Média $\pm$ erro padrão das medidas de maciez da pele obtidas pelo VisioScanVC 98® de acordo com lado e face dos antebraços (n=23)

Face	Lado		p-valor
	Direito	Esquerdo	
Flexora	82,6 $\pm$ 3,9	89,0 $\pm$ 5,1	0,172
Extensora	89,8 $\pm$ 3,6	97,1 $\pm$ 4,4	0,117
p-valor	0,125	0,082	

Com relação à profundidade das rugas, houve diferença significativa da média entre as faces avaliadas apenas para o antebraço esquerdo, $p=0,017$, uma vez que a face flexora apresentou média maior do que a extensora. (**Tabela 9 e Figuras 7 e 8**).

Tabela 9: Média $\pm$ erro padrão das medidas de profundidade das rugas obtidas pelo VisioScanVC 98® de acordo com lado e face dos antebraços (n=23)

Face	Lado		p-valor
	Direito	Esquerdo	
Flexora	68,2 $\pm$ 1,9	72,6 $\pm$ 2,3	0,059
Extensora	67,1 $\pm$ 1,9	67,0 $\pm$ 1,9	0,957
p-valor	0,653	0,017	

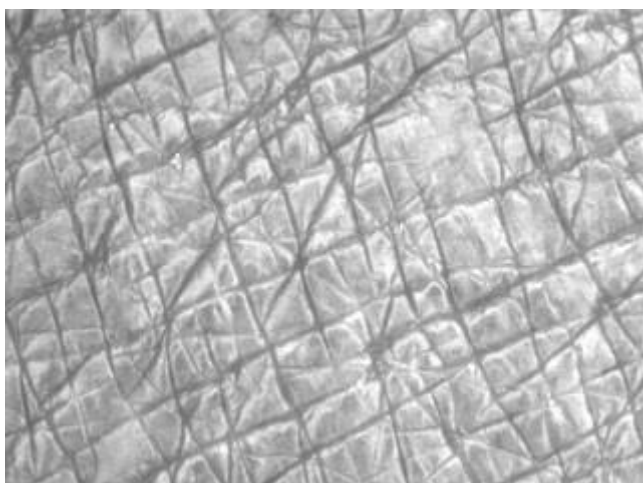


Figura 7 – Profundidade das rugas ou medida da superfície da pele (profilometria) da face flexora do antebraço esquerdo

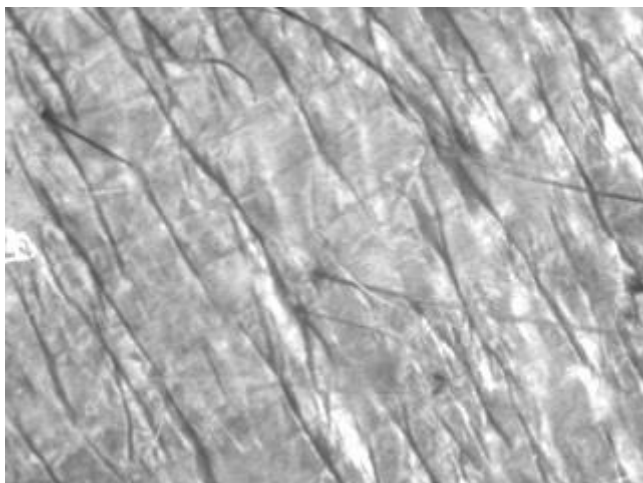


Figura 8 – Profundidade das rugas ou medida da superfície da pele (profilometria) da face extensora do antebraço esquerdo

A média das medidas da ecogenicidade dérmica calculadas através das imagens obtidas pela US de alta frequência mostrou diferença significativa entre as faces, $p < 0,001$, ou seja, independente do lado, a face flexora dos antebraços apresentou ecogenicidade maior do que a face extensora. (**Tabela 10** e **Figuras 9** e **10**).

Tabela 10: Média $\pm$ erro padrão das medidas da ecogenicidade dérmica (%), calculadas pelas imagens obtidas pela ultrassonografia de alta frequência (n=23).

Face	Lado		p-valor
	Direito	Esquerdo	
Flexora	94,7 $\pm$ 0,7	95,0 $\pm$ 0,6	0,864
Extensora	86,8 $\pm$ 2,2	86,6 $\pm$ 2,0	0,911
p-valor	<0,001	<0,001	

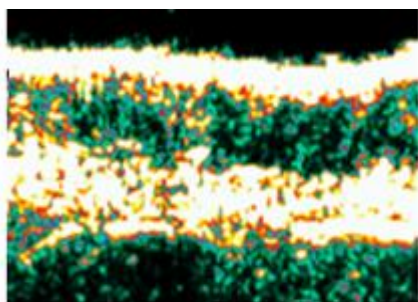
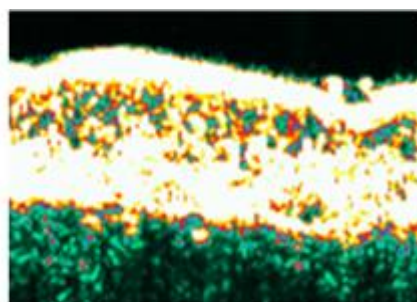
**Figura 9****Figura 10**

Figura 9 – Ecogenicidade ou densidade dérmica calculada através das imagens da ultrassonografia de alta frequência na face extensora do antebraço direito

Figura 10 – Ecogenicidade ou densidade dérmica calculada através das imagens da ultrassonografia de alta frequência na face flexora do antebraço direito

Resultado oposto (**Tabela 11** e **Fig 11**) foi observado em relação à espessura da derme obtida pela ultrassonografia de alta frequência. Houve diferença entre as faces avaliadas, $p=0,002$, ou seja, independente do lado, a face flexora apresentou média menor.

Tabela 11: Média $\pm$ erro padrão das medidas de espessura (mm), calculadas pelas imagens obtidas pela ultrassonografia de alta frequência ($n=23$)

Face	Lado		p-valor
	Direito	Esquerdo	
Flexora	1,11 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,03	0,659
Extensora	1,25 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,05	0,358
p-valor	0,004	0126	

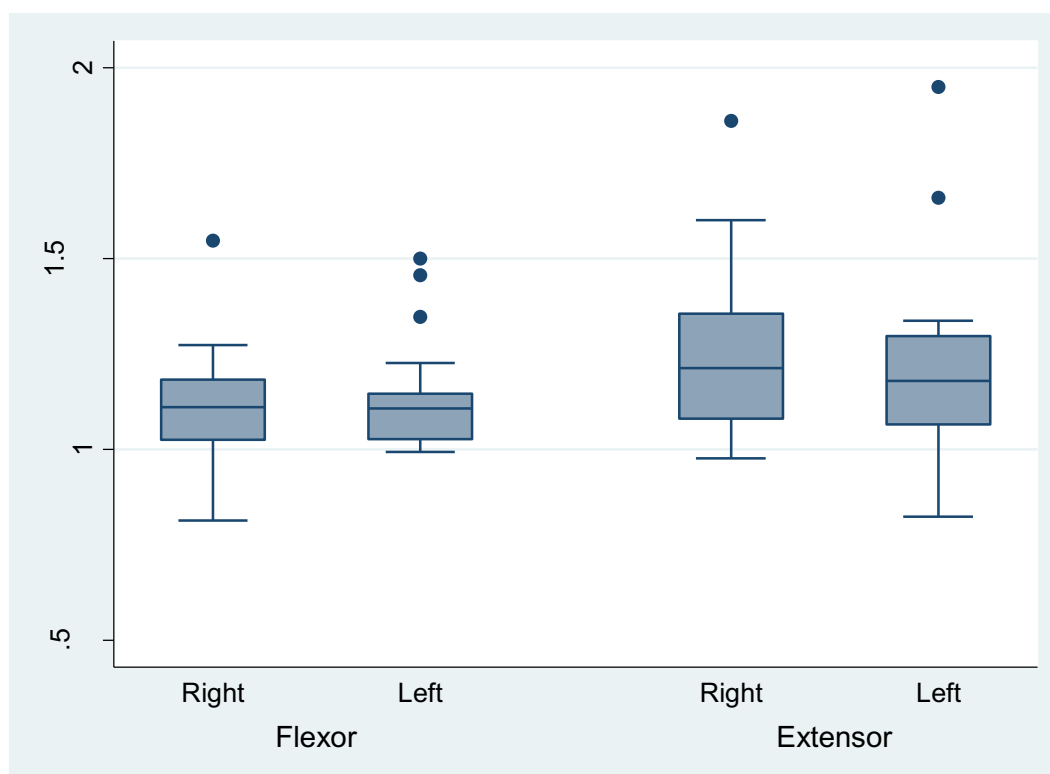


Figura 11 - Gráfico BoxPlot relacionando espessura da derme

A avaliação da intensidade total da derme pela ultrassonografia de alta frequência não mostrou diferença significativa entre os lados, $p < 0,001$, mas sim entre as faces, sendo que a face flexora apresentou média maior, demonstrando o comprometimento da estrutura da derme na face extensora, fotoexposta (**Tabela 12**).

Tabela 12: Média $\pm$ erro padrão das medidas da intensidade total (%), calculadas pelas imagens obtidas pela ultrassonografia de alta frequência ($n=23$)

Face	Lado		p-valor
	Direito	Esquerdo	
Flexora	83,1 $\pm$ 1,4	82,7 $\pm$ 1,3	0,830
Extensora	71,2 $\pm$ 2,6	72,0 $\pm$ 2,4	0,712
p-valor	<0,001	<0,001	

6.4 Correlações entre as Medidas Instrumentais Não Invasivas

Para o cálculo das correlações, elegeram-se as medidas do lado direito, uma vez que não foram verificadas diferenças entre os lados. Assim, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman entre as medidas para as faces flexora e extensora. Essas correlações são demonstradas no **ANEXO 6**.

Não houve correlação significativa entre as medidas da corneometria e das propriedades visco-elásticas da pele e aquelas obtidas pelas imagens da ultrassonografia de alta frequência para as duas faces, ($p > 0,05$). De fato, essa correlação não era esperada, já que a corneometria reflete conteúdo de água da camada córnea e as outras duas medidas dependem da estrutura dérmica (**Tabela 13**).

Tabela 13: Correlação de Spearman entre as medidas obtidas pelo Corneometer® e os outros equipamentos

		FACE			
		Flexora		Extensora	
	Corneometer	R	p-valor	R	p-valor
Cutometer	R2	0,010	0,964	-0,132	0,550
	R7	-0,051	0,819	-0,079	0,721
V	Aspereza	-0,162	0,460	0,033	0,883

DermaScan	Descamação	-0,520	0,011	-0,220	0,312
	Maciez	0,215	0,324	0,077	0,727
	Rugas	0,210	0,337	0,055	0,802
	Densidade	-0,074	0,736	-0,070	0,752
	Espessura	-0,088	0,690	0,125	0,571
	Intensidade	-0,121	0,582	0,027	0,904
	Total	-0,121	0,582	0,027	0,904

Entre as medidas da profilometria, apenas a descamação apresentou correlação negativa com a corneometria na face flexora ($r=-0,520$; $p=0,011$), ou seja, o maior conteúdo de água na camada córnea se correlacionou à menor descamação (**Fig. 12**). Esse resultado seria esperado também para a face extensora. No entanto, a explicação para esse achado pode estar relacionada ao fato das participantes da pesquisa terem sido recrutadas entre pacientes em acompanhamento no ambulatório de Dermatologia, onde recebem orientação para uso diário de protetor solar que colabora para a retenção hídrica e pouca descamação nas áreas expostas. Para as demais medidas, não foi observada nenhuma correlação significativa com as medidas das propriedades visco-elásticas da pele ($p>0,05$).

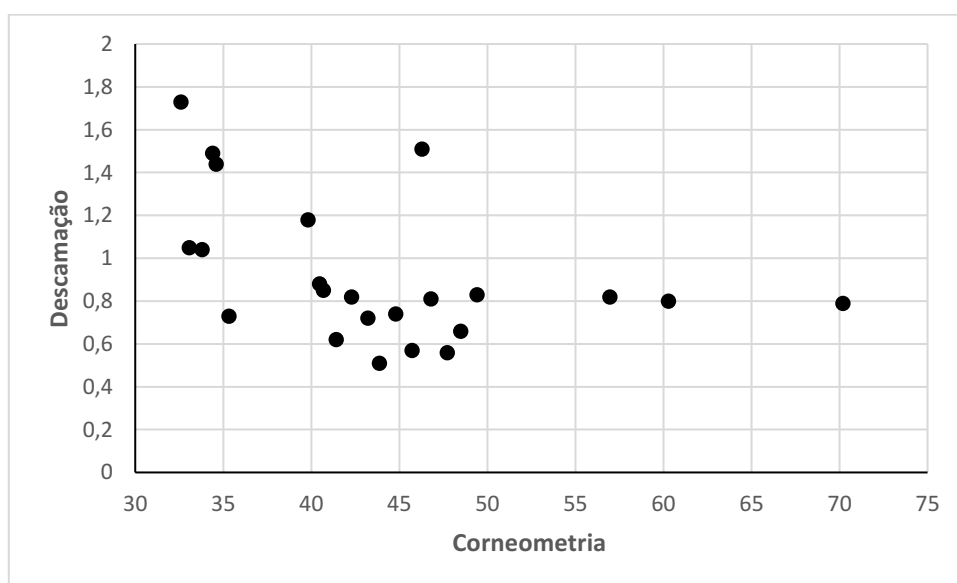


Figura 12 - Gráfico de dispersão entre corneometria e descamação da face flexora

Com relação às medidas R2 e R7 obtidas pelo Cutometer®, houve correlação positiva significativa para as faces flexora ($r=0,968$; $p<0,001$) e extensora ($r=0,841$; $p<0,001$), observado na **Fig. 13**. Nenhuma outra correlação ocorreu entre essas medidas e as de superfície ou profilometria ($p>0,05$).

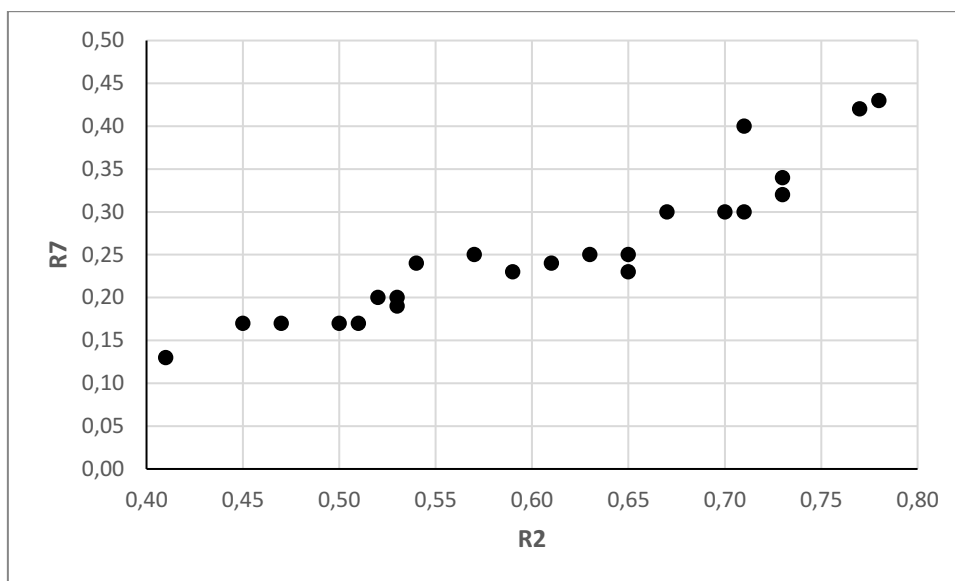


Figura 13 – Gráfico de dispersão entre R2 e R7 na face flexora

Em relação às medidas obtidas pela ultrassonografia de alta frequência e às obtidas pelo Cutometer®, houve correlação positiva significativa para a face flexora ($p<0,05$), indicando que a maior integridade da derme em área fotoprottegida reflete-se em propriedades visco-elásticas da pele conservadas. Para a face extensora, não foi observada nenhuma correlação significativa, assim como entre a espessura da derme e as medidas R2 e R7 Cutometer® das faces flexora e extensora.

Na face extensora, houve correlação positiva e significativa entre a aspereza, descamação e profundidade das rugas ($p<0,05$), demonstrando o efeito dos fatores ambientais na superfície da pele, ou seja, na barreira cutânea. Para as demais medidas de superfície, não houve correlação significativa nas duas faces ($p>0,05$).

A profundidade das rugas apresentou correlação negativa significativa com a espessura dérmica na face flexora ($r=-0,612$; $p=0,002$), indicando que a derme mais espessa se expressa clinicamente com menos rugas.

A ecogenicidade dérmica apresentou correlação negativa com as outras medidas obtidas pela ultrassonografia de alta frequência nas duas faces ($p<0,05$). A

espessura da derme correlacionou-se negativamente às demais medidas, apenas na face extensora ($p < 0,05$). Esses achados indicam que à medida que a ecogenicidade dérmica aumenta, a espessura diminui, uma vez que quanto mais íntegra, organizada e compacta, menos espessa a derme se apresenta. **(Tabela 14 e 15)**

Tabela 14: Correlação de Spearman entre as medidas obtidas pelo VisioScan®

	FACE			
	Flexora		Extensora	
	R	p-valor	R	p-valor
Aspereza				
Descamação	0,358	0,094	0,596	0,003
Maciez	0,227	0,297	-0,140	0,523
Rugas	-0,036	0,872	0,449	0,032
Descamação				
Maciez	-0,157	0,474	-0,184	0,400
Rugas	-0,173	0,430	0,351	0,101
Maciez				
Rugas	-0,055	0,802	0,038	0,865

Tabela 15: Correlação de Spearman entre as medidas obtidas pelo VisioScan® e Dermascan®

		FACE			
		Flexora		Extensora	
		R	p-valor	R	p-valor
DERMASCAN	Aspereza				
	Densidade	-0,307	0,154	-0,033	0,883
	Espessura	0,319	0,138	-0,084	0,703
	Intensidade Total	-0,343	0,110	-0,069	0,754
DERMASCAN	Descamação				
	Densidade	0,003	0,989	0,181	0,409
	Espessura	0,171	0,436	-0,056	0,800

Intensidade Total	0,018	0,934	0,099	0,653
-------------------	-------	-------	-------	-------

Maciez					
DERMASCAN	Densidade	-0,028	0,900	0,165	0,451
	Espessura	0,322	0,134	0,071	0,747
	Intensidade Total	-0,122	0,579	0,217	0,320
Rugas					
DERMASCAN	Densidade	0,211	0,333	-0,189	0,387
	Espessura	-0,612	0,002	-0,143	0,514
	Intensidade Total	0,088	0,690	-0,175	0,426

7 DISCUSSÃO

O envelhecimento cutâneo divide-se em cronológico ou intrínseco que se inicia por volta dos 30 anos, e fotoenvelhecimento que depende da intensidade da exposição crônica e descontrolada aos fatores ambientais, particularmente à radiação solar em todo o seu espectro. O primeiro caracteriza-se pela pele com aparência fina, frágil, inelástica, flácida, seca e com prejuízo na reparação de feridas. A pele com predomínio do envelhecimento extrínseco apresenta alterações caracterizadas por aspereza, ressecamento, discromias, elastose, cicatrizes estelares, telangiectasias e rugas profundas.⁴⁶ O fotoenvelhecimento é motivo de publicações pela busca do entendimento da sua fisiopatologia, diferenciação em relação ao envelhecimento intrínseco e tratamentos efetivos e seguros. Muitas classificações ou escalas de gravidade do fotoenvelhecimento facial foram publicadas.^{43,44} No entanto, para outras áreas do corpo são escassas. Em relação ao fotoenvelhecimento dos antebraços, as duas escalas mais completas publicadas recentemente são as de GUIMARÃES

(2015)²⁴ e MCKENZIE (2011).⁴⁵ Entretanto, não foi encontrada na literatura consultada uma classificação ou escala de gravidade para o envelhecimento intrínseco dos antebraços. Assim, foi elaborada uma escala para este estudo pelos autores **(ANEXO 4)**.

Considerando a classificação de GUIMARÃES (2015)²⁴ e a escala para envelhecimento intrínseco dos antebraços desenvolvida para este estudo, todos os graus de envelhecimento foram observados entre as participantes, com predomínio do moderado. As características clínicas mais frequentes na área fotoprotegida foram rugas finas e redução da elasticidade da pele. Na área fotoexposta, foram observados lentigos, rugas finas e algumas rugas profundas, elastose leve e queratoses⁴⁵.

As medidas instrumentais não invasivas são utilizadas para complementar a avaliação clínica, classificar o tipo predominante de envelhecimento e investigar a eficácia e segurança das medidas terapêuticas.⁴⁶⁻⁴⁸

Neste estudo, a comparação entre as áreas extensora (exposta) e flexora (menos exposta aos fatores ambientais) dos antebraços, através dos aspectos clínicos e dos resultados das medidas instrumentais não invasivas, mostrou que a pele da face extensora apresentou mais rugas finas e maior aspereza do que a face flexora. A presença desse tipo de rugas está relacionada à redução da elasticidade cutânea pela diminuição do tecido colágeno na matriz extracelular dérmica. A aspereza pode ser devida ao ressecamento característico da pele dos membros, pela redução da produção do NMF e pelo uso irregular ou não uso de cremes hidratantes.^{1,8,9}

Vários estudos avaliam as diferenças entre envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento. Avaliando a modulação do metabolismo do colágeno, a comparação entre esses processos foi realizada através da imunohistoquímica (técnicas Western blot e Northern blot), que pode ser de difícil interpretação, além de necessitar de biópsia de pele.⁴⁹ Outros autores conduziram essa comparação através de técnicas não invasivas, mas não incluíram os quatro métodos utilizados no presente estudo e não avaliaram somente os antebraços.^{50,51} O estudo de TROJAHN e colaboradores (2015) mostrou associações entre os vários parâmetros biofísicos e clínicos da pele relacionados à idade cronológica, assim como a inter-relação entre os aspectos clínicos, como rugas e flacidez.⁵⁰ Já FIRROZ e colaboradores (2012) avaliaram, em 50 voluntários, as variações entre parâmetros biofísicos da pele em 8 regiões diferentes mostrando diferenças significativas quanto à elasticidade.⁵¹

Neste estudo, foram investigadas as diferenças e as características biofísicas das faces extensora e flexora dos antebraços. Na corneometria, foi observada uma média dos valores maior na face flexora, indicando que a superfície mais exposta aos fatores ambientais, particularmente o sol, apresenta conteúdo de água na camada córnea inferior em relação à área fotoprotegida. Esta constatação refletiu-se em outros parâmetros avaliados, como aspereza e descamação, intimamente relacionadas ao gradiente adequado de água na pele, que é essencial para a manutenção das suas propriedades mecânicas e função de barreira.^{52,53} Fatores que modificam a umidade do estrato córneo não são completamente explicados na literatura. No entanto, sabe-se que a exposição ambiental, os hábitos individuais e vários fatores extrínsecos e intrínsecos podem modificar a estrutura e função da camada córnea.²³

Apoiando a hipótese de danos e prejuízos à barreira cutânea nas áreas fotoexpostas, MARY e colaboradores (2010) demonstraram maior ressecamento da pele na área fotoenvelhecida pela exposição cumulativa aos raios UV, comparada à área fotoprotegida.⁵⁴ De fato, vários estudos tem mostrado que parâmetros biomecânicos influenciam a barreira epidérmica e são diferentes em áreas fotoexpostas e protegidas.^{50,55,56}

A ultrassonografia é uma técnica de imagem muito útil na Dermatologia, particularmente quando de alta frequência, pois permite avaliação da profundidade e tamanho de lesões tumorais, identificação de edema e alterações da matriz extracelular através das medidas da espessura e ecogenicidade dérmicas.⁵⁷ Já foram identificadas diferenças na ecogenicidade dérmica entre áreas fotoexposta e protegida, concluindo que esse método poderia ser o melhor para avaliar o fotoenvelhecimento.^{55,58,59} CRISAN e colaboradores (2012) realizaram um estudo ultrassonográfico para avaliação da pele em diferentes faixas etárias e, entre outras regiões, analisaram as faces flexora e extensora dos antebraços. Observaram que a espessura da área fotoexposta (face extensora) do antebraço tende a aumentar depois dos 60 anos, enquanto a da área fotoprotegida (face flexora) diminui.²⁵

No presente estudo, a face flexora apresentou espessura menor, o que pode ser interpretado pela presença da derme mais compacta e melhor organizada. Em relação à ecogenicidade, a área com predomínio do fotoenvelhecimento apresentou média dos valores menor, o que pode refletir na degradação da matriz extracelular dérmica causada pelos fatores ambientais.

Neste estudo, foram analisadas as diferenças em relação à profilometria, ou seja, entre as medidas de superfície ou relevo cutâneo. Comparando aspereza e descamação, foi observada correlação positiva, ou seja, à medida que uma aumentou, a outra também aumentou. Ambas apresentaram médias maiores no fotoenvelhecimento quando comparadas ao envelhecimento intrínseco, demonstrando a influência esperada de fatores ambientais na superfície da pele fotoexposta, com comprometimento da barreira cutânea. Comparando a medida da aspereza da pele em diferentes idades, foi relatado aumento com a idade, ou seja, correlação positiva entre idade e tempo de exposição ao sol. Esse aspecto da pele reflete-se em mais rugas e flacidez nas peles mais idosas.⁵²

Há relatos conflitantes quanto às alterações na espessura da pele. FIRROZ e colaboradores (2012), através de avaliação quantitativa, concluíram que o envelhecimento intrínseco é caracterizado pelo afinamento progressivo da pele, enquanto que o fotoenvelhecimento é um processo bifásico em que a atrofia da pele é precedida por uma fase hipertrófica e transitória.⁵¹ Em relação à profundidade das rugas, neste estudo, a pele da face flexora no antebraço esquerdo apresentou média maior que a extensora. Esperava-se a presença de rugas mais profundas nas áreas fotoexpostas. No entanto, observando a profundidade das rugas, sem considerar o lado, observou-se que rugas finas e profundas estavam presentes em ambas as faces. Este resultado pode ser explicado pelo fato da maioria das participantes apresentarem grau moderado de fotoenvelhecimento, com presença de elastose leve que pode ser insuficiente para determinar rugas mais profundas, características do envelhecimento extrínseco. ALI e colaboradores (2014) consideraram que a rugosidade da pele estaria intimamente relacionada à hidratação epidérmica e não às alterações dérmicas.⁵² Os achados desse estudo não corroboram essa hipótese, uma vez que a hidratação avaliada pela corneometria foi melhor na área flexora, que apresentou rugas mais profundas pelo menos no antebraço esquerdo.

A pele altamente fotoexposta apresenta quantidade aumentada de glicosaminoglicanas e proteoglicanas na substância fundamental dérmica, com redução das fibras colágenas.²⁵ Em estudo comparativo avaliando a face de mulheres em diferentes idades (30 a 80 anos), foi observada redução da recuperação elástica após deformação na pele fotoenvelhecida e descrita uma diminuição da elasticidade, que poderia ser explicada pela redução das fibras elásticas e alterações na matriz extracelular.⁵⁰

Para avaliar as propriedades viscoelásticas da pele e as diferenças entre as faces dos antebraços, foram consideradas as medidas R2 e R7 obtidas pelo Cutometer®, que se referem à elasticidade inicial da pele ou global e sua recuperação após a deformação, respectivamente, relacionadas à função das fibras elásticas.^{25,53} A verificação, neste estudo, da redução da elasticidade ou das propriedades viscoelásticas da pele, sem diferenças entre as faces flexora e extensora dos antebraços, indica que tal alteração ocorre pelos dois mecanismos de envelhecimento cutâneo. A utilização do equipamento Cutometer® foi descrita anteriormente como uma ferramenta útil para medidas objetivas e não invasivas das propriedades biomecânicas da pele, produzindo dados absolutos e relativos. Um estudo utilizou o Cutometer® para avaliar a elasticidade da pele relacionada à idade, enquanto outro analisou a elasticidade da pele em diferentes regiões do corpo. Ambos encontraram diferenças entre as regiões analisadas e as idades, razão pela qual o método foi padronizado para áreas específicas e idades próximas para fins de avaliação.⁵

Os achados mais marcantes e as principais diferenças entre o envelhecimento intrínseco e o fotoenvelhecimento detectados neste estudo foram:

- Conteúdo aquoso da camada córnea significativamente maior na área com predomínio do envelhecimento intrínseco, ou seja, menos exposta aos fatores ambientais;
- Nenhuma diferença na comparação das propriedades viscoelásticas da pele entre as áreas de envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento;
- Aumento da descamação e aspereza na área fotoenvelhecida e maior profundidade das rugas na área com predomínio do envelhecimento intrínseco;
- Derme mais espessa, porém com menor ecogenecidade na área fotoenvelhecida.

8 CONCLUSÕES

- Os sinais clínicos do envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento, leve a moderado, nos antebraços corresponderam ao que é descrito na literatura.
- As medidas instrumentais não invasivas permitiram diferenciar as características da pele com predomínio de sinais de envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento.
- Foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros avaliados pelas medidas instrumentais não invasivas nas áreas com predomínio do envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento.
- Os sinais clínicos do envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento nos antebraços puderam ser correlacionados aos resultados das medidas obtidas através de métodos instrumentais não invasivos.
- Os sinais clínicos e as medidas instrumentais não invasivas permitiram a caracterização do envelhecimento intrínseco e fotoenvelhecimento, leve a moderado, nos antebraços.
- A avaliação clínica, através de escala validada, permitiu estabelecer a gravidade do fotoenvelhecimento dos antebraços.
- As escalas de gravidade e as medidas instrumentais não invasivas obtidas na pele dos antebraços demonstraram ser ferramentas úteis como parâmetros de eficácia e segurança para estudos clínicos sobre o envelhecimento cutâneo.

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O financiamento limitado para conduzir o estudo permitiu a inclusão de um número reduzido de participantes na pesquisa, ou seja, o tamanho da amostra foi pequeno. A estratificação dos resultados por faixas etárias não foi possível dado o número reduzido de participantes. A não inclusão de participantes do gênero masculino não permite estender as conclusões desse estudo para os homens.

Estudos futuros com tamanho amostral maior poderão validar ainda mais a utilização de medidas instrumentais não invasivas para avaliar o grau de dano cutâneo relacionado ao envelhecimento intrínseco agravado por fatores ambientais. Do mesmo modo, podem ser úteis como parâmetros de eficácia e segurança em pesquisa clínica sobre o tratamento do envelhecimento da pele.

REFERÊNCIAS

1. DURAI, PC.; THAPPA, DM.; KUMARI, R.; MALATHI, M. ***Aging in elderly: chronological versus photoaging.*** Indian J Dermatol Venereol Leprol, 57(5):343-52, 2012.
2. RITTIÉ, L.; FISHER, G.J. ***Natural and sun-induced aging of human skin.*** Cold Spring Harb Perspect Med, 5; 5(1), 2015.
3. LEVAKOV, A.; VUCKOVIC, N.; DOLAI, M.; KACANSKI, M.M.; BOZANIC, S. ***Age-related skin changes.*** Med Pregl, 65(5-6):191-5, 2012.
4. SVOBODOVÁ, A.; VOSTÁLOVÁ, J. ***Solar radiation induced skin damage review of protective and preventive options.*** Int J Radiat Biol, v. 86, n. 12, p. 999-1030, 2010.
5. KOCKAERT, M.; NEUMANN, M. ***Systemic and topical drugs for aging skin.*** J. Drugs. Dermatol, v. 2, p. 435-41, 2003.
6. STERN, R.S. ***Treatment of photoaging.*** Engl J Med, 350:1526-34, 2004.
7. ROKHSAR, C.K.; LEE, S.; FITZPATRICK, R.E. ***Review of photorejuvenation: devices, cosmeceuticals, or both?*** Dermatol. Surg., v. 31, p. 1166-78, 2005.
8. FLAMENT, F.; BAZIN, R.; LAQUIEZE, S.; RUBERT, V.; SIMONPOETRI, E.; PIOT, B. ***Effect of the sun on visible clinical signs of aging in Caucasians skin.*** Clin Cosmet Invest Dermatol, 27 (6):211-32, 2013.
9. NKENGNE, A.; BERTINI, C. ***Aging and facial changes-documenting clinical signs, part 1: clinical changes of the aging face.*** Skin Med., v. 1. n. 5, p. 284-9, 2012.
10. WOLF, J.; WEINBERGER, B.; ARNOLD, C.R.; MAIER, A.B.; WESTENDORP, R.G.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. ***The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts.*** Exp Gerontol, v. 47, n. 9, p. 749-53, 2012.
11. SEITE, S.; ZUCCHI, H.; SEPTIER, D.; IGONDJO-TCHEN, S.; SENNI, K.; GODEAU, G. ***Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme.*** Jour Eur Acad Dermatol Venereol, v. 20, n. 8, p. 980-7, 2006.
12. BRANCALION, C.L.; DA COSTA, G.A.; MORANO, C.N.; ROSSI, L.A.; CALDEIRA, O.G.E. ***Influence of therapeutic ultrasound on the biomechanical characteristics of the skin.*** J Ther Ultrasound, 17:4:21, 2016.
13. BATTIE, C.; VERSCHOORE, M. ***Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage.*** Indian J Dermatol Venerol Leprol, Suppl1: S9-S14, 2012.
14. AMIRKHANI, M.A.; SHOAE-HASSANI, A.; SOLEIMANI, M.; HEIAZI, S.; GHALICHI, L.; NILFOROUSSHADEH, M.A. ***Rejuvenation of facial skin and improvement in the dermal architecture by transplantation of autologous stromal vascular fraction: a clinical study.*** Biompactis, 6(3):149-154, 2016.

15. MURPHY, G.; YOUNG, A.R.; WULF, H.C.; KULMS, D.; SCHWARZ, T. **The molecular determinants of sunburn cell formation.** Exp. Dermatol, v. 10, p. 155-60, 2001.
16. RABE, J.H.; MAMELAK, A.J.; MCELGUNN, P.J.; MORISON, W.L.; SAUDER, D.N. **Photoaging: mechanisms and repair.** J. Am. Acad. Dermatol, v. 55, n. 1, p. 1-19, 2006.
17. 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., v. 27, n. 1, p. 17-34, 2005.
18. POON, F.; KANG, S.; CHIEN, A.L. **Mechanisms and treatments of photoaging.** Photodermatol Photoimmunol Photomed, v. 31, n. 2, p. 65-74, 2015.
19. SCHARFFETTER-KOCHANKE, K.; BRENNISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L. et al. **Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms.** Exp. Gerontol, v. 35, n. 3, p. 307-16, 2000.
20. FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S. et al. **Mechanisms of photoaging and chronological skin aging.** Arch. Dermatol, v. 138, p. 1462-70, 2002.
21. CÉSARINI, J.P.; MICHEL, L.; MAURETTE, J.M.; ADHOUTE, H.; BÉJOT, M. **Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids.** Photodermatol Photoimmunol Photomed, 19(4):182-9, 2003.
22. BRAATHEN, L.R.; SZEIMES, R.M.; BASSET-SEGUIN, N.; BISSONNETTE, R.; FOLEY, P.; PARISER, D. et al. **Guidelines on the use of photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer: an international consensus.** J Am Acad Dermatol, 56(1):125-43, 2007.
23. DE FARIAS, P.T.; AZAMBUJA, A.P.; HORIMOTO, A.R.; NAKAMURA, M.S.; DE OLIVEIRA, A.; KRIEGER, J.E. et al. **A population-based study of the stratum corneum moisture.** Clin Cosmet Investig Dermatol, 18:9:79-86, 2016.
24. GUIMARÃES, C.O.Z.; BAGATIN, E.; GUADANHIM, L.R.; STEMBERG, F.; PICOSSE, F.R.; NUNES, G. et al. **Development and validation of a clinical scale for the evaluation of forearm skin photoaging.** J Cutan Med Surg., 19(4):380-7, 2015.
25. CRISAN, D.; LUPSOSOR, M.; BOCA, A.; CRISAN, M.; BADEA, R. **Ultrasonographic Assessment of Skin Structure According to Age.** Indian J Dermatol Venereol Leprol, v. 78 (4) p. 519, 2012.
26. SCHIMIDT-WENDTNER, M.H.; BURGDORF, W. **Ultrasound scanning in dermatology.** Arch Dermatol, 141 (2):217-24, 2005.

27. MLOSEK, R.K.; DEBOWSKA, R.M.; LEWANDOWSKI, M.; MALINOWSKA, S.; NOWICKI, A. ***Imaging of the skin and subcutaneous tissue using classical and high-frequency ultrasonographies in anti-cellulite therapy.*** Skin Res Technol, 17:461-8, 2011.
28. CHRIST, C.; BRENKE, R.; SATTLER, G.; SIEMS, W.; NOVAK, P.; DASER, A. ***Improvement in skin elasticity in the treatment of cellulite and connective tissue weakness by means of extracorporeal pulse activation therapy.*** Aesthe Surg J, 28(5): 538-44, 2008.
29. BOUSQUET-ROUAUD, R.; BAZAN, M.; CHAINTREUIL, J.; ECHAGUE, A. ***High-frequency ultrasound evaluation of cellulite treated with the 1064 nm Nd: YAH laser.*** J Cosmet Laser Ther, 11:34-44, 2009.
30. CAETANO, L.V.N.; SOARES, J.L.M.; BAGATIN, E.; MIOT, H.A. ***Reliable assessment of forearm photoageing by high-frequency ultrasound: a cross-sectional study.*** Interna Journal of Cosmet Science, 38,170-177, 2016.
31. LEE, K.C.; DRETZKE, J.; GROVER, L.; LOGAN, A.; MOIEMEN, N. ***A systematic review of objective burn scar measurements.*** Burns Trauma, 27:4:14, 2016.
32. CRISAN, D.; CRISAN, M.; SCHAEFFETTER-KOCHANNEK, K.; BADEA, R. ***The role of vitamina C in pushing back the boundaries of skin aging: an ultrasonographic approach.*** Clin Cosmet Investig Dermatol, 2:8:463-70, 2015.
33. KANLAYAVATTANAKU, M.; LOURITH, N.; CHAIKUL, P. ***Jasmine rice panicle: A safe and efficient natural ingredient for skin aging treatments.*** J Ethnopharmacol, 4:193:607-616, 2016.
34. HASHMI, F.; WRIGHT, C.; NESTER, C.; LAM, S. ***The reliability of non-invasive biophysical outcome measures for evaluating normal and hyperkeratotic foot skin.*** J Foot Ankle Res, 9:8:28, 2015, 2015.
35. FOX, L.T.; DU PLESSIS, J.; GERBER, M.; VAN ZYL, S.; BONESCHANS, B.; HAMMAN, J.H.¹ ***In vivo skin hydration and anti-erythema effects of Aloe vera, Aloe ferox and Aloe marlothii gel material after single and multiple applications.*** Pharmacogn Mag, S392- 403, 2014.
36. DUMOULIN, M.; GAUDOUT, D.; LEMAIRE, B. ***Clinical effects of an oral supplement rich in antioxidants on skin radiance in women.*** Clin Cosmet Investig Dermatol, 18:9:315-324, 2016.
37. DOBREV, H. ***Application of Cutometer area parameters for the study of human skin fatigue.*** Skin Res Technol, 11:120-2, 2005.
38. EVERETT, J.S.; SOMMERS, M.S. ***Skin viscoelasticity: physiologic mechanisms, measurement tissues, and application to nursing Science.*** Biol Res Nurs, 15(3):338-46, 2013.

39. EZERSKAIA, A.; PEREIRA, S.F.; URBACH, H.P.; VERHAGEN, R.; VARGHESE, B. ***Quantitative and simultaneous non-invasive measurement of skin hydration and sebum levels.*** Biomed Opt Express, 7(6):2311-20, 2016.
40. QASSEM, M.; KYRIACOU, P.A. ***Investigating skin barrier function utilizing reflectance NIR spectroscopy.*** ConfProc IEEE Eng Med Biol Soc., p. 3735-8, 2014.
41. CONSTANTIN, M.M.; POENARU, E.; POENARU, C.; CONSTANTIN, T. ***Skin hydration assessment through modern noninvasive bioengineering technologies.*** Maedica (Buchar), 9(1):33-8, 2014.
42. FITZPATRICK, T.B. ***The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI.*** Arch. Dermatol, v. 124, p. 869-71, 1988.
43. GUINOT, C.; MALVY, D.J.M.; AMBROISINE, L.; LATREILLE, J.; MAUGER, E.; TENENHAUS, M. et al. ***Relative contribution of intrinsic vs extrinsic factors to skin aging as determined by a validated skin age score.*** Arch Dermatol, 138:154-60, 2002.
44. ALEXIADES ARMENAKAS, M.R. ***A quantitative and comprehensive grading scale for rhytides, laxity, and photoaging.*** J Drugs Dermatol, 5-808-9, 2006.
45. MCKENZIE, S.; SABODA, K.; DUCKET, L.D.; GOLDMAN, R.; HU, C.; CURIEL-LEWANDROWSKI, C.N. ***Development of a photographic scale for consistency and guidance in dermatologic assessment of forearm sun damage.*** Arch Dermatol, 147:31-6, 2011.
46. PENA FERREIRA, M.R.; COSTA, P.C.; BAHIA, F.M. ***Efficacy of anti-wrinkle products in skin surface appearance: a comparative study using non-invasive methods.*** Skin Res Technol, v. 16, n. 4, p. 444-9, 2010.
47. NETO, P.; FERREIRA, M.; BAHIA, F.; COSTA, P. ***Improvement of the methods for skin mechanical properties evaluation trough correlation between different techniques and factor analysis.*** Skin Res Technol, 19 (4):405 -16, 2013.
48. SOARES, J.L.M.; MIOT, H.A.; SANUDO, A.; BAGATIN, E. ***Cellulite: poor correlation between instrumental methods and photograph evaluation for severity classification.*** Int J Cosmet Sci, 37(1):134-40, 2015.
49. CHUNG, J.H.; SEO, J.Y.; CHOI, H.R.; LEE, M.K.; YOUN, C.S.; RHIE, G.; CHO, K.H. et al. ***Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo.*** J Invest Dermatol, 117; 1218-24, 2001.
50. TROJAHN, C.; DOBOS, G.; LICHTERFELD, A.; BLUME-PEYTAVI, U.; KOTTNER, J. ***Characterizing Facial Skin Ageing in Humans: Disentangling Extrinsic from Intrinsic Biological Phenomena.*** Biomed Res Int., 318586, 2015.

51. FIROOZ, A.; SADR, B.; BABAKOOHI, S.; SARRAF-YAZDY, M.; FANIAN, F.; KAZEROONI-TIMSAR, A. et al. ***Variation of Biophysical Parameters of the Skin with Age, Gender and Body Region***. Scientific World Journal, DOI: 10.1100/386936, 2012.
52. ALI, A.; AKHTAR, N.; CHOWDHARY, F. ***Enhancement of human skin facial revitalization by moringa leaf extract cream***. Postepy Dermatol Alergol, 31(2): 71-6, 2014.
53. AKHTAR, N.; ZAMAN, S.U.; KHAN, B.A.; AMIR, M.N.; EBRAHIMZADEH, M.A. ***Calendula Extract: effects on mechanical parameters of human skin***. Acta Pol Pharm, 68(5):693-701, 2011.
54. MAC MARY, S.; SAINTHILLIER, J.M.; JEUDY, A.; WILLIAMS, C.; BELL, M.; HUMBERT, P. ***Assessment of cumulative exposure to UVA trough the study of asymmetrical facial skin aging***. Clin Interv Aging, 23:5:277-84, 2010.
55. FREIS, O.; PERIE, G.; RATHJENS, A. ***Correlating aging with skin's mechanical and optical properties***. Cosmetic&Toiletries, vol. 129 n° 4, pp. 66-75, 2014.
56. BOIREAU-ADAMEZYK, E.; BAILLET-GUFFROY, A.; STAMATAS, G.N. ***Age-dependent changes in stratum corneum barrier function***. Skin Res Technol, 20(4):409-15, 2014.
57. BAGATIN, E.; CAETANO, L.V.N.; SOARES, J.L.M. ***Ultrasound and Dermatology: basic principles and more applications in dermatologic research***. Exp Ver Dermatol, 8 (5):463-77, 2013.
58. SANDBY-MØLLER, J.; THIEDEN, E.; PHILIPSEN, P.A.; SCHMIDT, G.; WULF, H.C. ***Dermal echogenicity: a biological indicator of individual cumulative UVR exposure?*** Arch Dermatol, 295:498-504, 2004.
59. BOYER, G.; LAQUIÈZE, L.; LE BOT, A.; LAQUIÈZE, S.; ZAHOUANI, H. ***Dynamic indentation on human skin vivo: ageing effects***. Skin Res Technol, 15(1):55-67, 2009.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

O **fotoenvelhecimento** da pele representa as alterações causadas pela exposição prolongada ao sol sem proteção adequada, seja pelo trabalho ou pelo lazer. A pele vai ficando mais espessa e amarelada; surgem aos poucos manchas escuras e brancas, rugas, vasinhos, áreas mais avermelhadas e ásperas (chamadas de **queratoses actínicas ou solares**), e até o câncer de pele. Muitos tratamentos podem ser usados para controlar essas alterações: hidratantes, filtros solares, ácidos, *peelings químicos* ou esfoliações, laser, terapia fotodinâmica, cirurgias, etc.

Por ter sinais de fotoenvelhecimento e lesões consideradas pré-câncer de pele, você está sendo convidado (a) a participar de um estudo médico com o uso de ácido retinóico a 0,05% e *peelings* de ácido retinóico a 5% para tratamento dessas lesões causadas pelo sol.

Antes de decidir se você quer participar, é importante que você leia e entenda este documento.

Neste estudo existirão 2 tipos de tratamento, um para cada antebraço:

1. Em um dos antebraços (escolhido pelo médico), **você aplicará** na sua casa ácido retinóico a 0,05% **nas noites de 2ª, 4ª e 6ª feiras, por 24 semanas (6 meses)**.

Usará filtro solar de manhã (ao acordar), às 12 horas (meio dia) e às 15 horas (3 horas da tarde).

Neste antebraço, você também usará um **creme hidratante à noite, nas noites que não for aplicar o ácido**.

Caso aconteça ressecamento exagerado da pele, você suspenderá o ácido e usará apenas o hidratante até melhorar. Se for necessário, poderá entrar em contato com os investigadores para antecipação da consulta;

2. No outro antebraço, você será submetido (a) à aplicação de *peeling* de ácido retinóico a 5%, **uma vez a cada 15 dias, durante 16 semanas consecutivas (4 meses), realizada pelo médico (a) na UNICCO** (Unidade de Cosmiatria, Cirurgia e Oncologia) do Departamento de Dermatologia – UNIFESP / Hospital São Paulo. Após a aplicação, não poderá ser aplicado o filtro solar, por isso você deverá **vir com camisa ou blusa de mangas compridas e largas**. O *peeling* deverá permanecer em

contato com a pele por um período de **6 horas** e só depois será removido com água e sabonete, em casa.

Usará filtro solar de manhã (ao acordar), às 12 horas (meio dia) e às 15 horas (3 horas da tarde).

Neste antebraço, você também usará um **creme hidratante todas as noites**.

Caso aconteça ressecamento exagerado da pele, você usará apenas vaselina até melhorar. Se for necessário, poderá entrar em contato com os investigadores para antecipação da consulta.

Você deverá evitar a exposição ao sol, procurando não andar pela rua nos horários de sol mais forte, procurando sempre a sombra, usando roupa para cobrir áreas mais expostas como o rosto e os braços, além de aplicar o filtro solar pela manhã, ao meio dia, e às 15 horas, ou a cada 3 horas de acordo com a sua atividade e exposição ao sol.

Durante o tratamento, você poderá ficar com a pele dos antebraços ressecada, avermelhada, com descamação e sensação de queimação, coceira, dor e ardor leves. Esses sintomas são esperados e fazem parte da resposta ao tratamento. Para amenizar, você deverá usar o creme hidratante todas as noites no antebraço tratado com os *peelings*, e nas noites de sábado, domingo, 3ª e 5ª feiras (noites que você não usará o ácido) no outro antebraço. Ao terminar o tratamento, esses sintomas desaparecerão em 2 a 4 semanas e a sua pele apresentará melhora da textura, manchas e rugas, assim como diminuição no número e tamanho das queratoses actínicas ou mesmo seu desaparecimento total.

Para participar deste estudo, você deverá seguir corretamente as orientações dos médicos e comparecer às consultas marcadas, que são necessárias para o acompanhamento de seu tratamento.

É importante que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes deste estudo:

- sua participação é totalmente voluntária, ou seja, você não é obrigado (a);
- você poderá interromper sua participação antes de receber os medicamentos ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá punição ou perda de seu direito de futuro tratamento médico no Hospital São Paulo – UNIFESP;

- existem outros tratamentos para o fotoenvelhecimento e para as queratoses actínicas, e você pode conversar sobre eles com o médico antes de decidir participar deste estudo;
- depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária para o bom entendimento do estudo;
- seus dados, durante sua participação neste estudo, serão mantidos confidencialmente, ou seja, seu nome nunca será usado em nenhum relatório deste estudo. Durante o estudo você será identificado (a) apenas pelas suas iniciais;
- os investigadores (médicos) garantem o cumprimento da legislação brasileira sobre a confidencialidade dos seus dados;
- sua participação neste estudo poderá ser interrompida se você apresentar condições de saúde que representem riscos para você na opinião dos médicos;
- qualquer informação importante que surgir sobre os medicamentos do estudo durante sua participação e que possa afetar a sua saúde, será levada ao seu conhecimento;
- espera-se que, com o tratamento, ocorra melhora na aparência geral da sua pele, das manchas e queratoses e que isto leve você a se sentir melhor psicológica, social e profissionalmente;
- é possível, porém, que você não tenha nenhum benefício ou um benefício parcial com os tratamentos;
- sua participação no estudo, entretanto, poderá ajudar pacientes no futuro, através do fornecimento de informações importantes sobre o tratamento do fotoenvelhecimento e das queratoses actínicas;
- antes de iniciar o tratamento, será feita aplicação do ácido retinóico em concentrações diferentes em cada antebraço; após 6 horas da aplicação, o produto será removido e serão feitas 3 biópsias de pele em cada antebraço. Após a análise dessas biópsias, você será chamado (a) para iniciar o tratamento;
- a duração do tratamento será de 4 meses com os *peelings* e de 6 meses com o tratamento domiciliar, e você deverá comparecer à cerca de 17 consultas ou visitas. Porém, como o problema da sua pele é crônico, você ficará em acompanhamento neste Hospital, na Unidade de Cosmiatria, Cirurgia e

Oncologia (UNICCO) do Departamento de Dermatologia – UNIFESP para sempre. Ao terminar o tratamento de cada antebraço, seu retorno para avaliação da manutenção dos resultados será agendado para 6 meses após cada tratamento concluído;

- todos os pacientes farão 3 biópsias de pele antes do tratamento e 2 ao final do tratamento, na parte de cima dos dois antebraços (5 em cada antebraço). A biópsia de pele é um processo doloroso, por isso você receberá anestesia local infiltrativa (uma injeção superficial). O único desconforto que você vai sentir é uma picada de agulha muito fina (tipo agulha de insulina). A realização da biópsia pode deixar uma cicatriz.

Se você tiver algum problema clínico, manifestar um efeito colateral ou tiver mais perguntas a fazer sobre o estudo ou sobre seus direitos como paciente, procure as Dras. Juliana Mayumi Sumita e Ediléia Bagatin nos telefones (11) 5549-7888 ou 5549-7525 (UNICCO) durante o dia. Fora desse horário e nos finais de semana, você poderá encontrar ajuda no Pronto Atendimento do Hospital São Paulo, situado à Rua Pedro de Toledo, 606, esquina com a Rua Botucatu, Vila Clementino. Para facilitar o seu atendimento, você terá o cartão de matrícula do Hospital e um cartão de participação no estudo.

Este estudo foi analisado por um Comitê de Ética em Pesquisa que tem por objetivo proteger o bem-estar dos pacientes. Se você tiver perguntas a fazer sobre seus direitos como paciente, também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética – UNIFESP, no telefone (11) 5571-1062, fax (11) 5539-7162, e-mail: cepunifesp@epm.br, ou na Rua Botucatu, 572, 1º andar, conjunto 14.

Tendo sido informado (a) que a minha participação neste estudo é voluntária e que posso me retirar, a qualquer momento, não sendo obrigado (a) a justificar esta decisão, sem sofrer qualquer prejuízo no meu atendimento no Hospital São Paulo – UNIFESP e por me sentir suficientemente esclarecido (a), autorizo minha participação e assino este documento.

Declaro ter recebido uma cópia do presente termo.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Eu, abaixo assinado, confirmo ter explicado este termo e o estudo ao sujeito da pesquisa e ter-lhe entregado uma cópia por mim assinada e datada.

Nome do médico responsável ou carimbo: _____

Assinatura do médico responsável: _____

Data ____/____/____

Classificação do Fototipo (FITZPATRICK, 1988)

Classificação	Cor da Pele	Característica após exposição solar
I	Branca	Sempre queima, nunca bronzeia
II	Branca	Bronzeia com dificuldade
III	Branca	Bronzeia moderadamente
IV	Castanho-clara	Bronzeia com facilidade
V	Castanho-escura	Bronzeia muito facilmente
VI	Negra	Nunca queima, só bronzeia

Escala clínica para fotoenvelhecimento dos antebraços
(GUIMARÃES, 2015)

Item	Grau de Gravidade					Fator Multiplicativo	Total
	0	1	2	3	4		
Queratose actínica (superficial)	Nenhum	1-2	3-5	6-10	>10	x 4	
Queratose actínica (hipertrófica)	Nenhum	1	2	3	> 3	x 1	
Rugas	Nenhum	Poucas e finas	Múltiplas e finas	Múltiplas, finas, profundas, mas localizadas	Múltiplas, profundas e generalizadas	x 9	
Lentigos	0-4	5-10	11-20	21-25	>25	x 4	
Púrpura visível	Nenhum	Sim	-	-	-	x 2	
Cicatrizes estelares	Nenhum	Sim	-	-	-	x 4	
Elastose	Ausente	Localizada	Difusa	-	-	x 8	
Diminuição de Elasticidade	Ausente	Localizada	Difusa	-	-	x 16	
Pontuação Final	(Soma de cada grau de gravidade pelos fatores multiplicativos dos itens)						

Fotoenvelhecimento

Leve: 0 a 30.

Moderado: 31 a 70.

Avançado: 71 a 100.

Grave: maior que 100.

Escala clínica para envelhecimento intrínseco dos antebraços
(desenvolvida pelos autores para o presente estudo)

Item	Grau de Gravidade					Total
	1 muito leve	2 leve	3 moderado	4 grave	5 muito grave	
Elasticidade						
Espessura						
Rugas Finas						
Xerose ou Ressecamento						
Pontuação Final						

Envelhecimento Intrínseco:

Muito leve – 2 a 5.

Leve – 6 a 9.

Moderado – 10 a 13.

Grave – 14 a 17.

Muito grave – 18 a 20.

FICHA DAS MEDIDAS INSTRUMENTAIS NÃO INVASIVAS**“AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E ESTUDO CLÍNICO-LABORATORIAL PARA VERIFICAR E COMPARAR EFICÁCIA E SEGURANÇA DO ÁCIDO RETINÓICO A 0,05% EM CREME E A 5% EM *PEELINGS* SUPERFICIAIS”**

- Iniciais: _____
- Nome: _____
- Nº: _____
- Idade: _____ anos
- Data de nascimento: ____/____/____
- Naturalidade: _____
- Procedência: _____
- Profissão: _____
- Estado civil: _____
- Endereço: _____
- Bairro: _____
- Cidade: _____
- Telefone: _____
- RG: _____
- CPF: _____
- RH: _____
- Antecedentes pessoais (comorbidades e medicações): _____

Fototipo:

(1) II

(2) III

Escala Guimarães

	Antebraço D					
A. QA	0	1	2	3	4	X14
B. rugas	0	1	2	3	4	X14
C. púrpuras visíveis	0	1	-	-	-	X14
D. melanoses	0	1	2	3	4	X8
E. elastose solar	0	1	2	-	-	X2
F. elasticidade	0	1	2	-	-	X1
Score final						

	Antebraço E					
A. QA	0	1	2	3	4	X14
B. rugas	0	1	2	3	4	X14
C. púrpuras visíveis	0	1	-	-	-	X14
D. melanoses	0	1	2	3	4	X8
E. elastose solar	0	1	2	-	-	X2
F. elasticidade	0	1	2	-	-	X1
Score final						

A pontuação final compreende quatro categorias de gravidade (assinalar com um X)

Score Final	Antebraço D	Antebraço E
(1) Leve (0-30 pontos)		
(2) Moderada (31-70 pontos)		
(3) Avançada (71-100 pontos)		
(4) Grave (maior que 100 pontos)		

Fuma?

(0) Não

(1) Ex-tabagista – fumou por quantos anos? ____ Parou há quanto tempo? ____

(2) Fumante – Há quanto tempo? ____ Quantos cigarros/dia? ____

Tabela integrada das correlações das medidas não invasivas avaliadas de acordo com o lado e face dos antebraços (n=23)

Equipamento	Medida	Direita		Valor de p	Esquerda		Valor de p
		Flexor	Extensor		Flexor	Extensor	
Corneometer	Corneometria	44.0 ± 1.9	33.8 ± 2.2	<0.001	42.8 ± 2.3	34.1 ± 1.9	<0.001
Cutometer	R2	0.61 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.255	0.62 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.952
	R7	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.441	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.498
Visioscan	Aspereza	3.73 ± 0.14	5.51 ± 0.43	<0.001	4.11 ± 0.19	5.36 ± 0.33	<0.001
	Descamação	0.92 ± 0.07	1.18 ± 0.06	<0.001	0.91 ± 0.07	1.16 ± 0.08	<0.001
	Maciez	82.6 ± 3.9	89.8 ± 3.6	0.125	89.0 ± 5.1	97.1 ± 4.4	0.082
	Rugas	68.2 ± 1.9	67.1 ± 1.9	0.653	72.6 ± 2.3	67.0 ± 1.9	0.017
Dermascan	Ecogenecidade (%)	94.7 ± 0.7	86.8 ± 2.2	<0.001	95.0 ± 0.6	86.6 ± 2.0	<0.001
	Espessura	1.11 ± 0.03	1.25 ± 0.04	0.004	1.13 ± 0.03	1.20 ± 0.05	0.126
	Intensidade (mm)	83.1 ± 1.4	71.2 ± 2.6	<0.001	82.7 ± 1.3	72.0 ± 2.4	<0.001

a. Os dados representam a média data ± erro padrão.

APÊNDICE A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E ESTUDO CLÍNICO-LABORATORIAL PARA VERIFICAR E COMPARAR EFICÁCIA E SEGURANÇA DO ÁCIDO RETINÓICO A 0,05% EM CREME E A 5% EM PEELINGS SUPERFICIAIS

Pesquisador: JULIANA MAYUMI SUMITA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 12587913.6.0000.5505

Instituição Proponente: Escola Paulista de Medicina

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Escola Paulista de Medicina

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 834.152

Data da Relatoria: 01/10/2014

Apresentação do Projeto:

EMENDA1 - Ref. Projeto de Pesquisa: CAAE 12587913.6.00005505

Parecer de Aprovação no. 3111.409 (21/6/2013)

Auxílio Regular à Pesquisa - FAPESP - no. Processo: 2013/01118-5

Objetivo da Pesquisa:

Emenda com atualização de pesquisadores, metodologia, referências bibliográficas, local da pesquisa, orçamento, cronograma e novo TCLE

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e desconfortos descritos com a inclusão exames

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serve o presente documento para informar a emenda solicitada ao projeto e sua justificativa:

1. Substituição do Pesquisador Responsável Paulo C. P. Rosa pelo Diogo O. Silva e inclusão das Pesquisadoras Silvia M. Pereira, Milvia M. S. S. Enokihara, Adriana Sanudo, e Paula R. Carvalho. A pesquisadora Paula R. Carvalho utilizará os resultados das avaliações dos "parâmetros de eficácia relativos às medidas instrumentais não-invasivas" deste estudo na sua tese de mestrado

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 834.152

cujo tema será a correlação entre parâmetros clínicos e medidas objetivas, sob orientação da pesquisadora Dra. Ediléia Bagatin.

2. Correções na digitação do texto e suas referências bibliográficas
3. Aumento de 20 para 24 participantes da pesquisa, com o propósito de cobrir eventuais perdas por retirada prematura para que a população final do estudo não inviabilize a análise estatística.
4. A faixa etária, no "critério de inclusão", não terá limite máximo devido às possíveis dificuldades de seleção dos participantes da pesquisa.
5. Serão doados alguns produtos como hidratante e filtro solar pela Indústria Farmacêutica Galderma do Brasil (Cetaphil Loção Hidratante Pele Normal a Seca® e Cetaphil UVA/UVB Defense®), sem nenhum conflito de interesse.
6. Inclusão de ultrassonografia bidimensional de alta resolução, profilometria, e cutometria nos "parâmetros de eficácia". São avaliações instrumentais não-invasivas da epiderme e derme dos antebraços das participantes da pesquisa que não causarão nenhum desconforto e não envolvem nenhum risco.
7. Explicações sobre as avaliações não-invasivas incluídas no TCLE em anexo.
8. A técnica "tape stripping" será realizada 10 a 15 vezes, e não 8 vezes, conforme atualização da literatura científica.
9. A área do "tape stripping" aumentará de 2 para 20 cm², por praticidade técnica, sem desconforto ou riscos para as participantes da pesquisa.
10. Serão fornecidos às participantes da pesquisa sachês contendo quantidade suficiente para as aplicações, respeitando a distribuição do princípio ativo na proporção de 2 mg/cm². Considerando que a área média da superfície extensora de um antebraço feminino é 25 x 10 cm (dobra do cotovelo até a proeminência óssea do punho), ou seja, 250 cm², será utilizado 0,5g de tretinoína (tanto a 0,05% quanto a 5%) por aplicação.
11. No dia da aplicação da tretinoína pelo pesquisador, a participante da pesquisa será orientada a usar roupa de mangas compridas e largas.
12. A tretinoína a 0,05% para uso domiciliar será fornecida às participantes da pesquisa em sachês contendo 0,5g. O pesquisador fornecerá sachês quinzenalmente para avaliar a aderência ao tratamento.
13. O tratamento domiciliar com tretinoína a 0,05% terá periodicidade de 3 noites alternadas por semana (por exemplo: segundas, quartas e sextas-feiras), e não "noites alternadas" como previsto no texto anterior.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 834.152

14. Ao final do tratamento, nas visitas 12 e 14, será realizada uma biópsia de 6 mm da mesma forma que no pré-tratamento, pela necessidade de um fragmento de pele (metade dessa biópsia) para análise farmacológica, que foi considerada importante após revisão da literatura científica. Isto não acarretará nenhum desconforto adicional, risco ou sequela.

15. As biópsias serão realizadas 30 dias, e não 15 dias, após o término dos tratamentos, para que não haja intercorrência na cicatrização, evitando aspectos inestéticos (visitas 12 e 14).

16. Foram adicionadas visitas após 6 meses de cada tratamento para avaliação do resultado e eficácia a longo prazo (visitas 16 e 17).

17. O laboratório do Depto de Dermatologia da UNIFESP e o laboratório privado MM Médicos Associados S/C LTDA foram substituídos pelo laboratório privado APC – Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia S/C LTDA, por praticidade técnica.

18. O orçamento anterior continha erros que no entanto foram corrigidos e aprovados pela FAPESP.

19. O TCLE e o cronograma do estudo foram modificados conforme as alterações citadas acima.

20. O estudo recebeu apoio da FAPESP.

Etapas cumpridas: Desenvolvimento da metodologia analítica. Desenvolvimento e estudo da estabilidade das formulações. Estudo de liberação/permeação in vitro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Emenda e justificativas apresentadas adequadamente

Recomendações:

Nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 834.152

Considerações Finais a critério do CEP:

PARECER ACATADO

SAO PAULO, 16 de Outubro de 2014

Assinado por:

José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

Prof. Dr. Leércio Lourenço
Vice-Coordenador do CEPUNIFESP

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

FOREARM SKIN AGING: CHARACTERIZATION BY INSTRUMENTAL MEASUREMENTS

Carvalho PRS¹, Sumita JM¹, Soares JLM¹, Sanudo A², Bagatin E¹

¹Department of Dermatology

²Department of Preventive Medicine

Federal University of Sao Paulo – UNIFESP, Sao Paulo, Brazil

Correspondence:

Paula Roberta Silva de Carvalho

Address: Rua Estado de Israel, 192 – São Paulo – SP – CEP 04022-000

E-mail: robertacarvalho2013@bol.com.br

Phone: + 55 11 994119930

Financial Support – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, São Paulo, Brazil – Process number: 2013/01118-5

ABSTRACT

Background: The intrinsic aging and photoaging skin presents biomechanical and morphological differences, which are reflected in the appearance of roughness, superficial and deep wrinkles, atrophy, reduced elasticity, hypo and hyperpigmentation and actinic keratosis. **Objective:** To evaluate and compare the characteristics of the flexor (with a predominance of intrinsic aging) and extensor (chronically exposed to sunlight and other environmental factors, with a predominance of photoaging) skin surfaces of the forearms. **Methods:** Interventional, prospective, diagnostic study, including 23 females, aged over 60 years. The extensor and flexor faces of both forearms were compared in relation to clinical parameters and non-invasive instrumental measurements, such as skin surface, elasticity, hydration as well as dermal thickness and echogenicity. **Results:** Regarding the water content of the stratum corneum, the flexor face presented an average value of stratum corneum water content higher than the extensor face. The average of the measurements obtained through images of high frequency ultrasound showed the flexor area with greater dermal thickness and echogenicity compared to the extensor face. The measurements of the skin relief showed significant differences between the extensor and flexor faces. The roughness and scaling were lower in the flexor face. Regarding the wrinkles depth, there was no significant difference between the evaluated faces, and the average of the measurements is slightly higher in the flexor face, which demonstrated that wrinkles are present in the intrinsic aging and photoaging. The presence of elastosis in photoaging and the reduction of elasticity and thickness were according to the results of the non-invasive measurements. **Conclusion:** Meaningful differences in the biophysical characteristics of the extensor and flexor faces of the forearm were detected. Because the non-invasive instrumental measurements

correlate with clinical findings, they may be useful tools to assess efficacy and safety of photoaging and intrinsic aging treatments in clinical research.

Keywords: Skin physiology/structure; Suncare/UV protection; Statistics.

1: INTRODUCTION

Aging is an inexorable biological process and few clinical studies compare objectively the extrinsic and intrinsic mechanisms that overlap over time [1]. The intrinsic aging is determined by genetic, metabolic and hormonal factors. Almost all the structures and functions of the skin are affected by aging, such as self-renewal capacity of the epidermis - essential for its barrier function, immune response, thermoregulation, organization and establishment of the dermal extracellular matrix, rich in collagenous tissue [2], [3], [4], [5], [6]. The photoaging is characterized by acute clinical (sunburn, photosensitivity) and chronic (solar elastosis, premature aging, carcinogenesis) manifestations [7]. In photoaging occurs destruction of the fibrillary structure, increased intercellular substance, the dermo-epidermal junction is flattened and there is inflammatory infiltrate, although subclinical [13], [14], [15]. The search for effective prevention and treatments for controlling skin aging has increased in recent years, which justify the need for studies that characterize in which extent intrinsic aging is accelerated by environmental factors, including objective parameters [17], [13], [18], and [19].

The aim of this study was to evaluate and compare areas with a predominance of photoaging and intrinsic signs of aging of the forearms, through clinical and non-invasive instrumental measurements.

2: METHODS

Design: Interventional, prospective, diagnostic study. Population: After the approval by Institutional Review Board, 23 healthy women from a public dermatologic clinic signed the Consent Form and were included in the study. The age group of the studied group was the most adequate for the comparison of the photoaging and intrinsic age. In this population, due to the rigorous selection criteria, these aspects were very homogeneous.

The inclusion criteria were menopausal and healthy women, aged over 60 years. Intervention: The evaluation of clinical signs of photoaging skin on both forearms was performed by the main investigator and a dermatologist medical researcher, by using

the Guimarães Scale [20] which includes: 1) superficial actinic keratosis; 2) hypertrophic actinic keratosis; 3) wrinkles; 4) solar lentigos; 5) visible purpura; 6) pseudo-stellar scars; 7) elastosis; 8) decrease in elasticity. The level of each signal multiplied by multiplicative factors results in scores corresponding to the photoaging severity, classified as: 1) mild, score from 0 to 30; 2) moderate, 31 to 70; 3) advanced, 71 to 100; 4) severe, higher than 100. For intrinsic aging, the scale proposed by the authors included the following clinical signs: 1) elasticity reduction; 2) thickness reduction; 3) fine wrinkles and 4) xerosis or dry skin. For each signal, it was attributed a level according to a 6-point scale: 0 = absent, 1 = very mild, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe and a final score ranging from 2 to 20, considering that at least two signs should be presented even if in a very mild level. From 2 to 5, the level of aging was classified as very mild; from 6 to 9, mild; from 10 to 13, moderate; from 14 to 17, severe and from 18 to 20, very severe.

The non-invasive measurements were carried out with the following devices: 1) VisioScan VC 98 (Courage-Khazaka, Germany) for skin surface (profilometry) using the SELS system represented by four parameters: Skin Smoothness (SESM); Skin Roughness (SER); Scaliness (SESC) and Wrinkles (SEW) [21], [22], [8].; 2) Cutometer (Courage-Khazaka, Germany) for viscoelastic properties of the skin; the measurement was made through the vertical deformation of the skin when pulled by a vacuum controlled by a constant suction probe 500 mbar, with cycles of suction and relaxation. The following parameters were used: R2 - maximum amplitude and the skin deformation capacity (gross elasticity) and R7 - portion of elasticity compared with the complete curve. ([23], [24], [25]; 3) Corneometer (Courage-Khazaka, Germany) to analyze the water content of the corneal layer through Capacitance Method [26]; 4) DermaScan-C (Cortex Technology, Denmark) which is a two-dimensional ultrasound (US) of high resolution or frequency above 20 MHz, for analysis of the dermis morphology and quantitative parameters, as like dermal thickness and echogenicity [27], [29], [30], [31]. In order to determine the size of the non-invasive measures applicable to traction in a vertical line, the dimensions of the extensor and flexor surfaces of the forearms at the 10, 7 and 4 cm of the elbows were made as measures (**Figure 1** and **Figure 2**). It was made 3 measurements on the extensor face and 3 measurements on the flexor face for each equipment in an acclimatized room (temperature and humidity controlled). It was adopted the following order for the measurements performing: Corneometer®; Cutometer®, VisioScan® and DermaScan®. When necessary, the trichotomy was

made on the extensor surface .This sequence ensured that the conductive gel used for the US did not interfere in the other measurements.



Figure 1 - Determination of the measurements extensor area.

Statistical analysis: Analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements was used to verify possible differences between the flexor and extensor faces in each measurement, taking into account the forearm sides. The correlation between the measurements in each side was calculated using the Spearman's correlation coefficient. In all statistical analysis, a significance level of 5% ($\alpha=0.05$) was considered.

3: RESULTS

Twenty-three women aged from 63 to 85 (mean of 75 years and standard deviation of 6 years) were included. Considering the phototype, 15/23 (62.5%) was phototype II and 8/23 (37.5%) was phototype III. Besides, the majority was non-smokers (16/23 or 69.6%), 3 were classified as former smokers (13,05%) and 4 as smokers (17,39 %). The population was homogeneous concerning phototype and degree of photoaging.

Table 1: Distribution of the 23 participants according to GUIMARÃES (2015) classification in the forearms

Forearm Right	Left				Total
	Mild	Moderate	Advanced	Severe	
Mild	5	1	0	0	6
Moderate	1	8	3	0	12
Advanced	0	1	2	0	3
Severe	0	0	0	2	2
Total	6	10	5	2	23

In sunny countries like Brazil, the skin aging is much more due to the sun exposure and photoprotection habits than to age. As the patients were followed at the Dermatology Service, they were already oriented to use sunscreen daily. In this population, due to the rigorous selection criteria, this aspect were homogeneous.

Independent of the side, it was observed a significant difference in the average values of stratum corneum water content between the faces ($p < 0.001$). In other words, the flexor face displayed an average higher than the extensor face, with an estimated difference in 9.4 ± 1.0 ($p < 0.001$). There was no difference between the forearm sides ($p > 0.05$). This indicates that the surface most exposed to environmental factors, particularly the sun, presents lower water content in the stratum corneum (**Table 2**).

Table 2: Mean $\pm$ standard error of the corneometry measurements according to the side and face of the forearms (n=23)

Face	Side		p-value
	Right	Left	
Flexor	44.0 $\pm$ 1.9	42.8 $\pm$ 2.3	0.406

Extensor	33.8 ± 2.2	34.1 ± 1.9	0.816
p-value	<0.001	<0.001	

The measurements of the viscoelastic properties are presented in **Table 3** and **4**. The averages of R2 and R7 measurements were similar on the sides as well as for the flexor and extensor faces.

Table 3: Mean ± standard error of the measurement R2 of Cutometer® according to the side and face (n=23)

Face	Side		p-value
	Right	Left	
Flexor	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.491
Extensor	0.58 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.077
p-value	0.255	0.952	

Table 4: Mean ± standard error of the measurement R7 of Cutometer® according to the side and face (n=23)

Face	Side		p-value
	Right	Left	
Flexora	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.417
Extensora	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.366
p-value	0.441	0.498	

Regarding the measurements of the surface or relief of the skin (profilometry), there was a significant difference in the comparison of the roughness and the scaliness between the extensor and flexor faces in both sides, and the flexor face presented smaller means than the extensor ($p < 0.001$). This difference was estimated at 1.51 ± 0.25 for roughness (**Table 5**) and 0.26 ± 0.05 for scalinnes (**Table 6**). These results indicate the expected influence of environmental factors on the photoexposed skin surface (extensor face), causing skin barrier impairment.

Table 5: Mean $\pm$ standard error of roughness measures according to the side and forearm face (n=23)

Face	Side		p-value
	Right	Left	
Flexor	3.73 $\pm$ 0.14	4.11 $\pm$ 0.19	0.276
Extensor	5.51 $\pm$ 0.43	536 $\pm$ 0.33	0.664
p-value	<0.001	<0.001	

Table 6: Mean $\pm$ standard error of the measurement of scaliness according to the side and face forearm (n=23)

Face	Side		p-value
	Right	Left	
Flexor	0.92 $\pm$ 0.07	0.91 $\pm$ 0.07	0.846
Extensor	1.18 $\pm$ 0.06	1.16 $\pm$ 0.08	0.775
p-value	<0.001	<0.001	

In relation to smoothness, there was a significant difference in the mean values between the faces p (0.021), that is, the extensor face presented a mean greater than the flexor face, with an estimated difference of 7.7 ± 3.3 . There was a difference between the sides p (0.038), the left side had a mean greater than the right side, estimated at 6.9 ± 3 presented in **Table 7**.

Table 7: Mean $\pm$ standard error of smoothness according to the side and forearm face (n=23)

Face	Side		p-value
	Right	Left	
Flexor	82.6 $\pm$ 3.9	89.0 $\pm$ 5.1	0.172
Extensor	89.8 $\pm$ 3.6	97.1 $\pm$ 4.4	0.117

p-value	0.125	0.082
---------	-------	-------

Regarding the depth of the wrinkles, there was a significant difference only for the left side ($p = 0.017$), where the flexor face presented values higher than the extensor. This result is related to the presence of thinner wrinkles on the extensor face (**Figures 2, 3 and 4**).

Figure 2

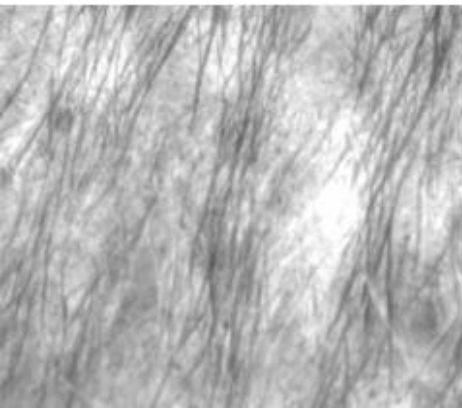
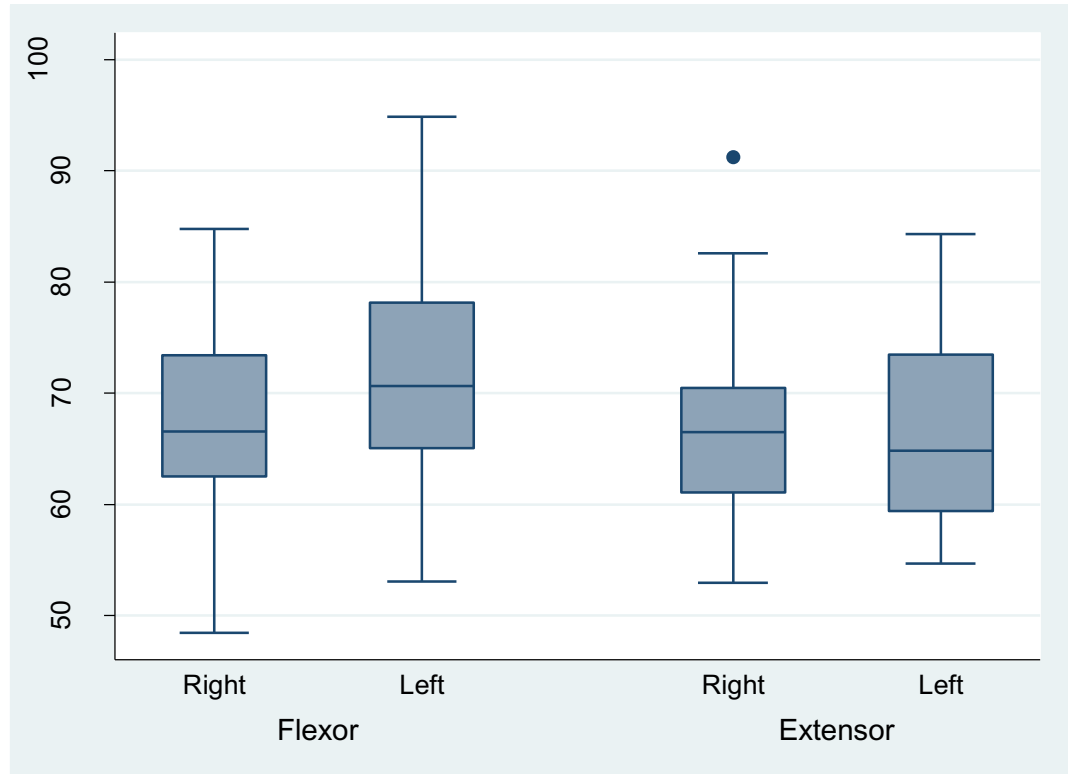


Figure 3

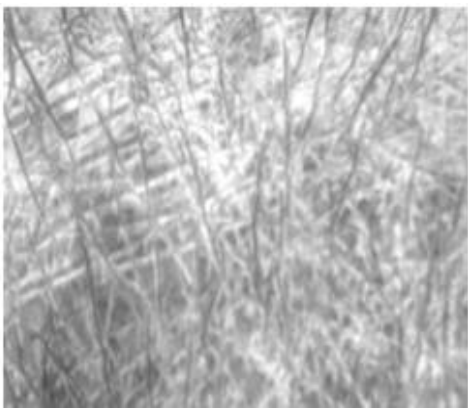


Figure 4

Figure 3. Depth of wrinkles or measurement of the skin surface (profilometry) of the flexor face of the left forearm

Figure 4. Depth of wrinkles or measurement of the skin surface (profilometry) of the extensor face of the left forearm

The average of the dermal echogenicity measurements calculated through the images obtained by high frequency US showed a significant difference between the faces ($p < 0.001$). Therefore, regardless the side, the flexor face of the forearms presented echogenicity higher than the extensor face, which is represented by more prominent sub-epidermal low or non-echogenic band (SLEB) in the papillary dermis (**Table 8**, **Figures 5** and **6**).

Table 8: Average $\pm$ standard error of the dermal echogenicity measurements (%), calculated by the images obtained by high frequency ultrasound (n=23)

Face	Side		p-value
	Right	Left	
Flexor	94.7 $\pm$ 0.7	95.0 $\pm$ 0.6	0.864
Extensor	86.8 $\pm$ 2.2	86.6 $\pm$ 2.0	0.911
p-value	<0.001	<0.001	

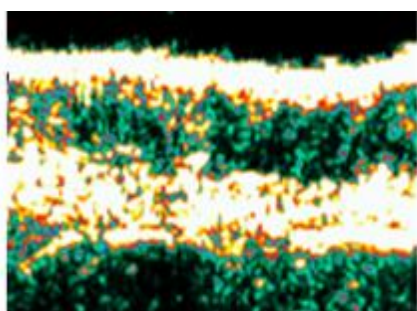


Figure 5

Figure 5: Echogenicity or dermal density calculated from the high frequency ultrasound images of the right forearm extensor face

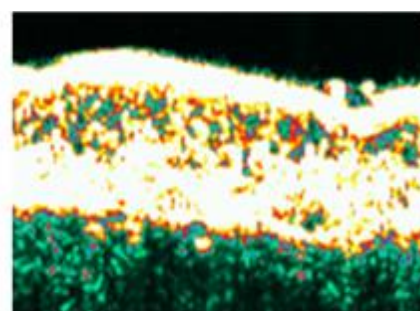
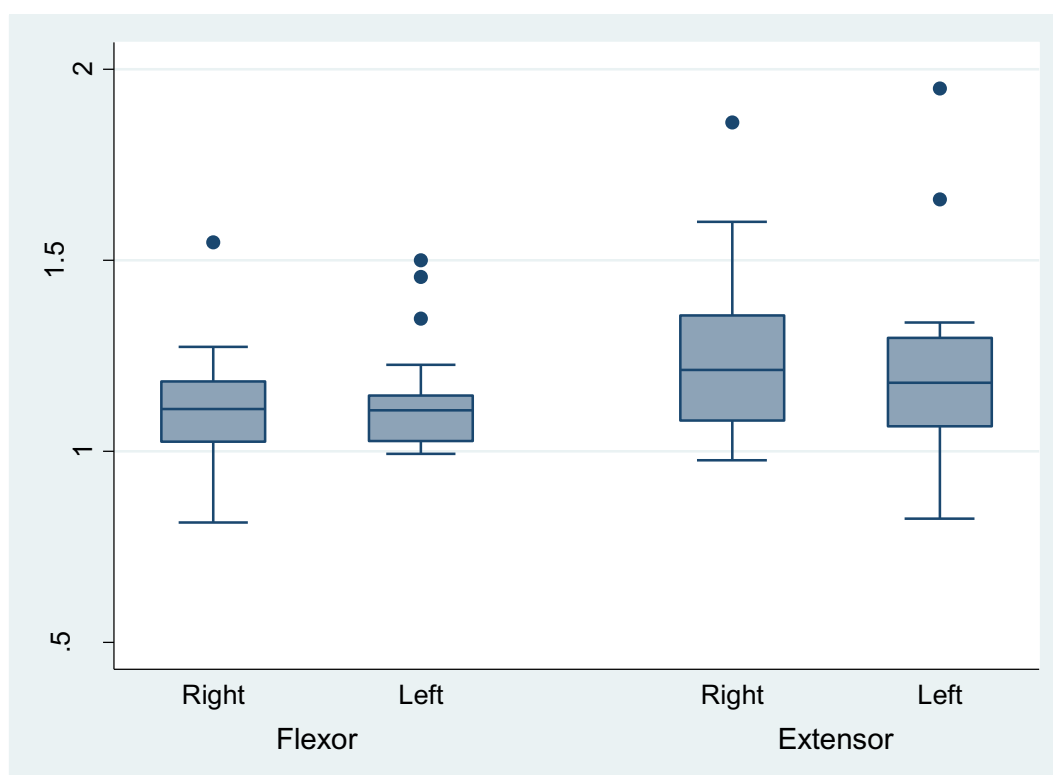


Figure 6

Figure 6: Echogenicity or dermal density calculated from the high frequency ultrasound images of the right forearm flexor face

An opposite result (**Figure 7**) was detected in dermis thickness obtained by the US. There was a difference between the evaluated faces ($p = 0.002$), and regardless the side, the flexor face presented a lower average.

Figure 7



The evaluation of the total dermis intensity by the US did not show a significant difference between the sides ($p < 0.001$), but rather between the faces, considering that the flexor face presented a higher average, displaying the commitment of the dermis structure in the extensor face, photo-exposed (**Table 9**).

Table 9: Average $\pm$ standard error of the total intensity measurements (mm), calculated by the images obtained by high frequency ultrasound ($n=23$)

Face	Side		p-value
	Right	Left	
Flexor	83.1 $\pm$ 1.4	82.7 $\pm$ 1.3	0.830
Extensor	71.2 $\pm$ 2.6	72.0 $\pm$ 2.4	0.712

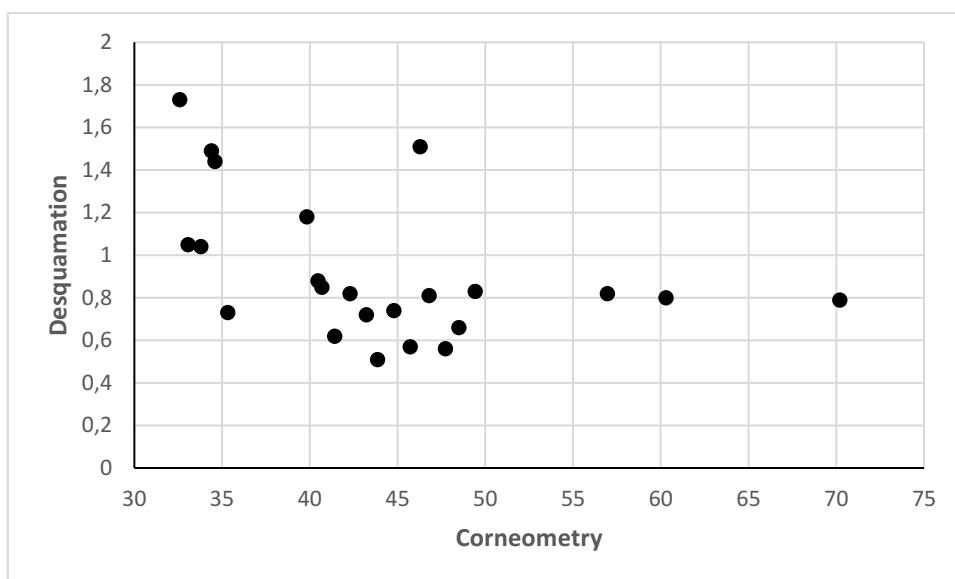
p-value	<0.001	<0.001
---------	--------	--------

3.1: Correlations between non-invasive instrumental measurements

For the correlations, the measurements on the right side were used, since only in the profilometry there was a difference between the sides.

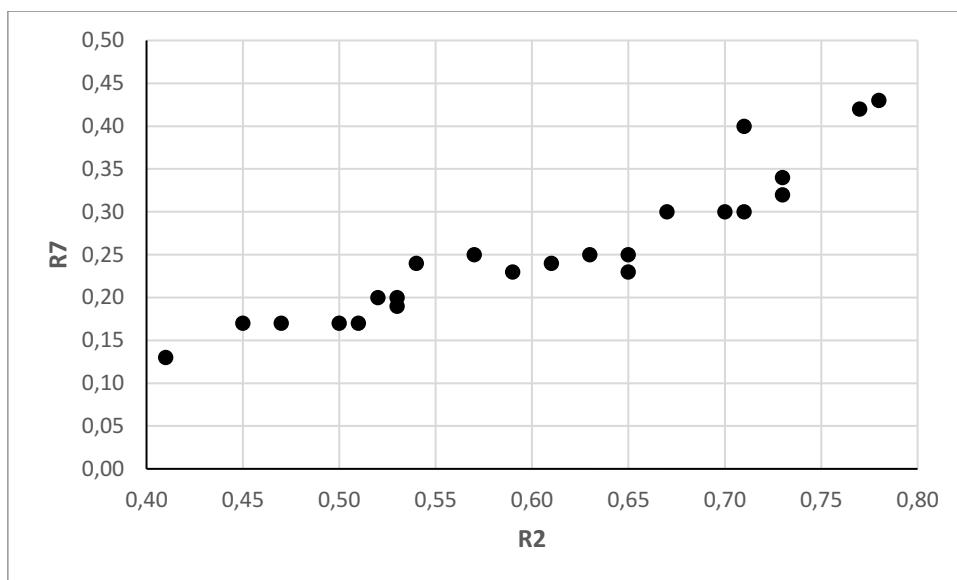
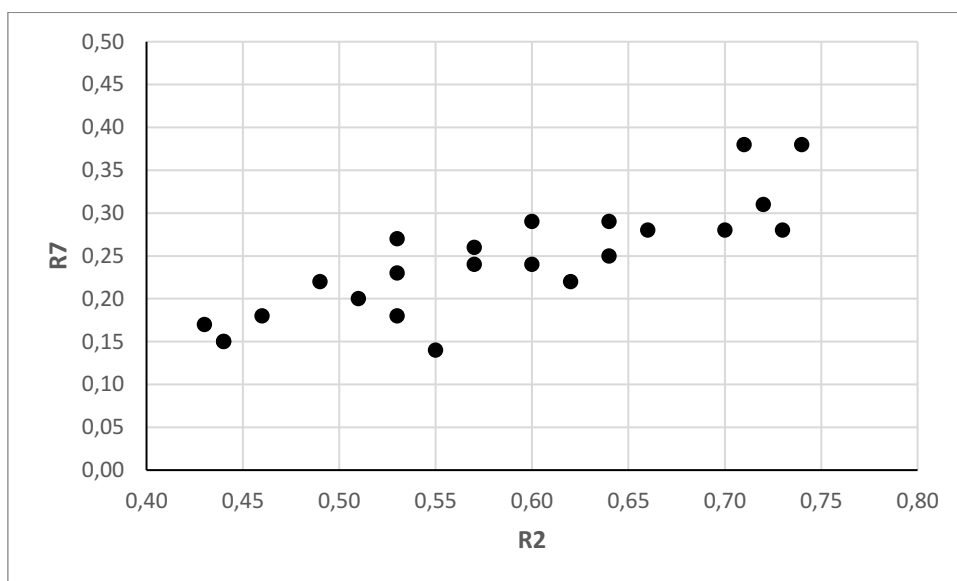
There was no significant correlation among the corneometry measurements and the viscoelastic properties of the skin and those obtained by the US images for both faces ($p > 0.05$). There is published evidence that surface and dermal properties may be related. In a study wrinkling was related to skin rigidification (for both stratum corneum and dermis) coupled to a certain weakening of the upper dermis (loss of echogenicity)[31]. Among the profilometry measurements, only scaliness presented a negative correlation with the corneometry on the flexor face ($r = -0.520$; $p = 0.011$).

Figure 8: Scatter Plot of corneometry and desquamation of the flexor face



In other words, the higher water content in the stratum corneum was correlated with less scaliness. This result would also be expected for the extensor face. However, the explanation for this finding may be related to the fact that the research participants were recruited from follow-up patients at the Dermatology ambulatory, where they receive orientation for daily use of sunscreen which contributes to the water retention and just a little scaling in the exposed areas.

Regarding the measurements R2 and R7 obtained by the Cutometer®, there was a significant positive correlation for flexor ($r = 0.968$, $p < 0.001$) and extensor ($r = 0.841$, $p < 0.001$) faces (**Figure 9** and **10**).

Figure 9**Figure 10**

In relation to the measurements obtained by the US and those obtained by the Cutometer®, there was a significant positive correlation for the flexor face ($p < 0.05$), indicating that the greater integrity of the dermis in the photoprotected area reflects itself in the viscoelastic properties of the preserved skin. For the extensor face, it was not observed any significant correlation, as well as among the dermis thickness and the Cutometer® measurements R2 and R7 of the flexor and extensor faces.

In the extensor face, there was a positive and significant correlation between roughness, scaliness and wrinkle depth ($p < 0.05$), demonstrating the effect of environmental factors on the skin surface, that is, on the skin barrier. For the other

surface measurements, there was no significant correlation between the two faces ($p > 0.05$). In other study it was also observed that relative skin-thickness decrease with age is less at sun-exposed areas in comparison with protected areas [31], [32].

The dermal echogenicity showed a negative correlation with the other measurements obtained by the US on both faces ($p < 0.05$). The dermis thickness was negatively correlated with the other measurements only on the extensor face ($p < 0.05$). These findings indicate that as the dermal echogenicity increases, the thickness decreases, since the more intact, organized and compact, the less thick the dermis is. The correlations are shown in **Table 10**.

Table 10: Measures^b evaluated according to the side and face of the forearms (n=23).

Equipment	Measurement	Right		p-value	Left		p-value
		Flexor	Extensor		Flexor	Extensor	
Corneometry	Corneometry	44.0 ± 1.9	33.8 ± 2.2	<0.001	42.8 ± 2.3	34.1 ± 1.9	<0.001
Cutometer	R2	0.61 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.255	0.62 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.952
	R7	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.441	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.498
Visioscan	Roughness	3.73 ± 0.14	5.51 ± 0.43	<0.001	4.11 ± 0.19	5.36 ± 0.33	<0.001
	Desquamation	0.92 ± 0.07	1.18 ± 0.06	<0.001	0.91 ± 0.07	1.16 ± 0.08	<0.001
	Smoothness	82.6 ± 3.9	89.8 ± 3.6	0.125	89.0 ± 5.1	97.1 ± 4.4	0.082
	Wrinkles	68.2 ± 1.9	67.1 ± 1.9	0.653	72.6 ± 2.3	67.0 ± 1.9	0.017
High Frequency Ultrasound	Echogenicity (%)	94.7 ± 0.7	86.8 ± 2.2	<0.001	95.0 ± 0.6	86.6 ± 2.0	<0.001
	Thickness	1.11 ± 0.03	1.25 ± 0.04	0.004	1.13 ± 0.03	1.20 ± 0.05	0.126
	Intensity (mm)	83.1 ± 1.4	71.2 ± 2.6	<0.001	82.7 ± 1.3	72.0 ± 2.4	<0.001

b. Data represent mean ± standard error.

4: DISCUSSION

Skin aging represents the superposition of photoaging over intrinsic aging. The first is primarily caused by UV and the skin alterations are represented by roughness,

dryness, telangiectasia and deep wrinkles [33]. The intrinsic aging is characterized by the thin appearance of skin which is fragile, inelastic, sagging, dry and with repair deficits after injury. Photoaging is a subject of many studies and review articles, as the search for specific treatments and differentiation in relation to chronological aging is constant.

The non-invasive instrumental measurements are used to complement clinical assessment, and to rank not only the intrinsic and photoaging, but in other areas of Dermatology [33], [34]. There are several studies evaluating the differences between photoaging and intrinsic aging, but not always using the four non-invasive assessment tools used here: Corneometer, Cutometer, VisioScan and Dermascan. Some studies have made this comparison, but not between the forearm faces as in this study [35], [36]. This is a pilot study since there are none with this type of comparison in the consulted literature. Regarding the stratum corneum hydration, it was observed that the flexor face had an average higher than the extensor face, indicating that the surface most exposed to environmental factors, particularly the sun, presents lower water content in the stratum corneum in relation to the photoprotected areas. This will reflect on other parameters evaluated, such as roughness and scaliness, since they are closely related to the proper water content in the skin, which is essential for the maintenance of its mechanical properties [37]. Supporting the hypothesis of damage to photo-exposed barrier, it was demonstrated an increased dryness in photoaging area in a study, which assessed the cumulative exposure to UV, compared with the photoprotected area [38]. The high frequency US device allows the identification of changes in the extracellular matrix, which consists of variations in dermal thickness, density and echogenicity, which are supposed to be collagen related [18]. These results indicate that the loss of skin elasticity occurs by chronological as well as by environmental factors.

The skin evaluation by US examined the forearm flexor and extensor faces in different age groups and among other segments, noting that the thickness of the forearm sun-exposed area tends to increase after age 60, while the thickness of the photo protected area tends to decrease [27]. Our study has demonstrated similar results, as the flexor face showed to be thinner than the extensor, revealing a more compact and better-organized dermis. Regarding the dermal echogenicity, the intrinsic aging area showed higher values compared to photoaging. This is a reflection of the dermal extracellular matrix degradation, caused by UV. Studies have revealed that in highly photo exposed

skin, the amount of glycosaminoglycans and proteoglycans is increased in the dermal ground substance, while collagen fibers decrease. The thinning of the skin with aging results as a consequence of a decrease in dermal collagen synthesis [27]. Some authors state that SLEB, which is more pronounced in the extensor face, reflects elastosis, degradation of collagen, accumulation of glycosaminoglycans, and tissue water in papillary dermis [28]. It is known that the severe disorganization of the elastic fibers network and the decrease in the collagen fiber bundles occur with age [36]. There are conflicting reports in the literature regarding changes in skin thickness. Although many authors agree that intrinsic aging is characterized by progressive thinning of the skin, others consider that photoaging is a two-step process in which the atrophy of the skin is preceded by a transitional hypertrophic phase by quantitative assessment [31], [38] [37]. With respect to the wrinkle depth, there was no significant difference between the faces assessed, but the flexor face showed an average higher than the extensor. It is expected the presence of deeper wrinkles in sun exposed areas. Thus, this result can be explained by the fact that most participants presented moderate photoaging, with the presence of slight elastosis, which can mask that characteristic. To evaluate the viscoelastic properties and trace their differences, we list the measurements R2 and R7, which refer to the initial elasticity skin (overall elasticity) and its recovery after deformation, respectively, related to the function of the skin elastic fibers [27], [37]. These measurements showed no differences in sun-exposed and photo protected faces, indicating that the loss of skin elasticity occurs by both mechanisms, i.e., chronological and external factors. There are other parameters to evaluate elasticity. According to PIERARD et al (1995), the face showed bigger changes of elastic properties than the arm and the back. Especially, the R7 of face was most significantly decreased with aging earlier results suggest that age related changes include an increase in skin extensibility (UF) therefore raising the possibility of the immediate and final retraction being an important parameter; F3 assesses the cumulative effects of the immediate and final retractions. More recent studies have suggested the Q parameters are more accurate than the U and R parameters and should be used to improve measurement accuracy of human skin elasticity [39], [40].

However, in a study of the facial skin, including women aged from 30 to 80 years old, it was observed a reduction of the elastic recovery after deformation, indicating the influence of environmental factors on exposed skin [35]. The skin surface analysis showed an interaction between roughness and scaling, and as one increases, the

other also increases. For both higher averages, it was observed in photoaging compared to intrinsic aged skin, demonstrating the role of extrinsic factors, causing skin barrier impairment. It was also reported that the roughness of the skin always increases with age when the same measurements were compared at different ages, indicating a positive correlation between chronological age and time of sun exposure. This results in the wrinkles aggravation and sagging in older skin. Additionally, there is a thickness lowering in the covered areas, which can lead to a decrease in adipose support tissue and an increase of fine wrinkles [35]. Some studies have showed that the roughness is closely related to hydration and smoothness, which was not observed in our study [41]. The strength of this study was the patients' adhesion, and the limitation was the sample size.

5: CONCLUSION

This study showed significant differences in the skin barrier and biomechanical parameters obtained by non-invasive instrumental measurements between intrinsic aging and photoaging.

These measurements may represent effective tools for skin aging analysis in clinical trials and also determine how much the photoaging can aggravate the intrinsic aging.

6: LIMITATIONS OF THE STUDY

The limited funding for the study allowed the inclusion of the reduced number of participants in the study, i.e.. the sample size was small.

The stratification of the results by age groups was not possible for the reduced number of participants.

7: PERSPECTIVES

Future studies with larger sample size may further validate the use of noninvasive instrumental measures to assess the degree of skin damage related to intrinsic aging aggravated by environmental factors. Likewise, they may be useful as parameters of efficacy and safety in clinical research on the treatment of aging of the skin.

Financial support: FAPESP (2013/01118-5)

REFERENCES

1. DURAI, PC.; THAPPA, DM.; KUMARI, R.; MALATHI, M. ***Aging in elderly: chronological versus photoaging***, Indian J Dermatol Venereol Leprol, 57(5):343-52, 2012.
2. RITTIÉ, L.; FISHER, G.J. ***Natural and sun-induced aging of human skin***, Cold Spring Harb Perspect Med, 5; 5(1), 2015.
3. FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S. et al. ***Mechanisms of photoaging and chronological skin aging***. Arch. Dermatol, v. 138, p. 1462-70, 2002.
4. FITZPATRICK, T.B. ***The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI***. Arch. Dermatol, v. 124, p. 869-71, 1988.
5. WOLF, J.; WEINBERGER, B.; ARNOLD, C.R.; MAIER, A.B.; WESTENDORP, R.G.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. ***The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts***. Exp Gerontol, v. 47, n. 9, p. 749-53, 2012.
6. SEITE, S.; ZUCCHI, H.; SEPTIER, D.; IGONDJO-TCHEN, S.; SENNI, K.; GODEAU, G. ***Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme***. Jour Eur Acad Dermatol Venereol, v. 20, n. 8, p. 980-7, 2006.
7. BATTIE, C.; VERSCHOORE, M. ***Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage***. Indian J Dermatol Venerol Leprol, Suppl1: S9-S14, 2012.
8. MURPHY, G.; YOUNG, A.R.; WULF, H.C.; KULMS, D.; SCHWARZ, T. ***The molecular determinants of sunburn cell formation***. Exp. Dermatol, v. 10, p. 155-60, 2001.
9. 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., v. 27, n. 1, p. 17-34, 2005.
10. SCHARFFETTER-KOCHANKE, K.; BRENNEISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L. et al. ***Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms***. Exp. Gerontol, v. 35, n. 3, p. 307-16, 2000.
11. CÉSARINI, J.P.; MICHEL, L.; MAURETTE, J.M.; ADHOUTE, H.; BÉJOT, M. ***Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids***. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 19(4):182-9, 2003.
12. BRAATHEN, L.R.; SZEIMES, R.M.; BASSET-SEGUIN, N.; BISSONNETTE, R.; FOLEY, P.; PARISER, D. et al. ***Guidelines on the use of photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer: an international consensus***. J Am Acad

- Dermatol, 56(1):125-43, 2007.
13. KOCKAERT, M.; NEUMANN, M. **Systemic and topical drugs for aging skin.** J. Drugs. Dermatol, v. 2, p. 435-41, 2003.
 14. LEVAKOV, A.; VUCKOVIC, N.; DOLAI, M.; KACANSKI, M.M.; BOZANIC, S. **Age-related skin changes.** Med Pregl, 65(5-6):191-5, 2012.
 15. NKENGNE, A.; BERTINI, C. **Aging and facial changes-documenting clinical signs, part 1: clinical changes of the aging face.** Skin Med., v. 1. n. 5, p. 284-9, 2012.
 16. SVOBODOVÁ, A.; VOSTÁLOVÁ, J. **Solar radiation induced skin damage review of protective and preventive options.** Int J Radiat Biol, v. 86, n. 12, p. 999-1030, 2010.
 17. FLAMENT, F.; BAZIN, R.; LAQUIEZE, S.; RUBERT, V.; SIMONPOETRI, E.; PIOT, B. **Effect of the sun on visible clinical signs of aging in Caucasians skin.** Clin Cosmet Invest Dermatol, 27 (6):211-32, 2013.
 18. STERN, R.S. **Treatment of photoaging.** Engl J Med, 350:1526-34, 2004.
 19. ROKHSAR, C.K.; LEE, S.; FITZPATRICK, R.E. **Review of photorejuvenation: devices, cosmeceuticals, or both?** Dermatol. Surg., v. 31, p. 1166-78, 2005.
 20. GUIMARÃES, C.O.Z.; BAGATIN, E.; GUADANHIM, L.R.; STEMBERG, F.; PICOSSE, F.R.; NUNES, G. et al. **Development and validation of a clinical scale for the evaluation of forearm skin photoaging.** J Cutan Med Surg., 19(4):380-7, 2015.
 21. PENA FERREIRA, M.R.; COSTA, P.C.; BAHIA, F.M. **Efficacy of anti-wrinkle products in skin surface appearance: a comparative study using non-invasive methods.** Skin Res Technol, v. 16, n. 4, p. 444-9, 2010.
 22. CHOI, J.W.; KWON, S.H.; HUH, C.H. et al. **The influences of skin visco-elasticity hydration level and aging on the formation of wrinkles a comprehensive and objective approach.** Skin Res Technol, v. 19, n. 11, p. 349-55, 2013.
 23. OSHIMA, H.; KINOSHITA, S.; OYOBIKAWA, M. **Use of Cutometer area parameters in evaluating age-related changes in the skin elasticity of the cheek.** Skin Res Technol, v. 19, p. 238-42, 2013.
 24. RYU, H.S.; JOO, Y.H.; PARK, K.C. et al. **Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer.** Skin Res Technol, v. 14, n. 13, p. 354-8, 2008.
 25. NETO, P.; FERREIRA, M.; BAHIA, F.; COSTA, P. **Improvement of the methods for skin mechanical properties evaluation trough correlation between different techniques and factor analysis.** Skin Res Technol, 19 (4):405 -16,

- 2013.
26. QASSEM, M.; KYRIACOU, P.A. **Investigating skin barrier function utilizing reflectance NIR spectroscopy.** ConfProc IEEE Eng Med Biol Soc., p. 3735-8, 2014.
 27. CRISAN, D.; LUPSOSOR, M.; BOCA, A.; CRISAN, M.; BADEA, R. **Ultrasonographic Assessment of Skin Structure According to Age.** Indian J Dermatol Venereol Leprol, v. 78 (4) p. 519, 2012.
 28. SANDBY-MØLLER J.; WULF H.C. **Ultrasonographic subepidermal low-echogenic band, dependence of age and body site.** Skin Res Technol, v. 10, p. 57-63, 2004.
 29. BAGATIN, E.; CAETANO, L.V.N.; SOARES, J.L.M. **Ultrasound and Dermatology: basic principles and more applications in dermatologic research.** Exp Ver Dermatol, 8 (5):463-77, 2013.
 30. CAETANO, L.V.N.; SOARES, J.L.M.; BAGATIN, E.; MIOT, H.A. **Reliable assessment of forearm photoageing by high-frequency ultrasound: a cross-sectional study.** Interna Journal of Cosmet Science, 38,170-177, 2016.
 31. BATISSE, D.; BAZIN, R.; BALDEWECK, T.; QUERLEUX, B. et al. **Influence of age on the wrinkling capacities of skin.** Skin Res Technol, 8 (3): 148-54, 2002.
 32. LASAGNI, C.; SEIDENARI, S. **Echographic assessment of age-dependent variations of skin thickness: A study on 162 subjects.** Skin Res Technol, 1(2):81-5, 1995.
 33. SALLES, A.G.; REMIGIO, A.F.N.; ZACCHI, V.B.L. et al. **Clinical and dermal thickness assessment one year after hyaluronic acid filler treatment.** Rev. Bras. Cir. Plast, vol. 26, 2011.
 34. SOARES, J.L.M.; MIOT, H.A.; SANUDO, A.; BAGATIN, E. **Cellulite: poor correlation between instrumental methods and photograph evaluation for severity classification.** Int J Cosmet Sci, 37(1):134-40, 2015.
 35. TROJAHN, C.; DOBOS, G.; LICHTERFELD, A.; BLUME-PEYTAVI, U.; KOTTNER, J. **Characterizing Facial Skin Ageing in Humans: Disentangling Extrinsic from Intrinsic Biological Phenomena.** Biomed Res Int., 318586, 2015.
 36. FIROOZ, A.; SADR, B.; BABAKOOHI, S.; SARRAF-YAZDY, M.; FANIAN, F.; KAZEROONI-TIMSAR, A. et al. **Variation of Biophysical Parameters of the Skin with Age, Gender and Body Region.** Scientific World Journal, DOI: 10.1100/386936, 2012.
 37. AKHTAR, N.; ZAMAN, S.U.; KHAN, B.A.; AMIR, M.N.; EBRAHIMZADEH, M.A. **Calendula Extract: effects on mechanical parameters of human skin.** Acta Pol Pharm, 68(5):693-701, 2011.

38. MAC MARY, S.; SAINTHILLIER, J.M.; JEUDY, A.; WILLIAMS, C.; BELL, M.; HUMBERT, P. ***Assessment of cumulative exposure to UVA trough the study of asymmetrical facial skin aging.*** Clin Interv Aging, 23:5:277-84, 2010.
39. PIERARD, G.; KORT, R.; LETAWE, C.; OLIMANS, C.; PIERARD-FRANCHIMONT, C. ***Biomechanical assessment of photodamage: derivation of a cutaneous extrinsic ageing score.*** Skin Res Technol, 1(1):17-20, 1995.
40. QU, D.; SEEHRA, GP. ***Improving the accuracy of skin elasticity measurement by using Q-parameters in Cutometer.*** J Cosmet Sci, 67(1):37-44, 2016.
41. ALI, A.; AKHTAR, N.; CHOWDHARY, F. ***Enhancement of human skin facial revitalization by moringa leaf estract cream.*** Postepy Dermatol Alergol, 31(2): 71-6, 2014.

APÊNDICE C

E-MAIL CONFIRMAÇÃO SUBMISSÃO ARTIGO

★ International Journal of Cosmetic Science - Account Created in Manuscript Central

22/12/2016 | 12:28

De: "International Journal of Cosmetic Science" <onbehalfof+majella.lane+btinternet.com@manuscriptcentral.com>

Para: robertacarvalho2013@bol.com.br

22-Dec-2016

Dear Mrs. Carvalho:

A manuscript titled FOREARM SKIN AGING: CHARACTERIZATION BY INSTRUMENTAL MEASUREMENTS (ICS-2016-1876) has been submitted by Mrs. Paula Roberta Carvalho to the International Journal of Cosmetic Science.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/ics>

USER ID: robertacarvalho2013@bol.com.br

PASSWORD: https://mc.manuscriptcentral.com/ics?URL_MASK=093c2652a44b4e39b3212881653188c8

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. This password is case-sensitive and temporary. Please log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/ics> to update your account information and change your password.

Thank you for your participation.

Sincerely,
International Journal of Cosmetic Science Editorial Office