

L I N H A

Drone

Drone Grey Over



NOT TESTED
ON ANIMALS



NON TOXIC



NON GMO



FOR ALL
SKIN TYPES



SUSTAINABLE
DEVELOPMENT



Drone Grey Over

RECUPERANDO A COR NATURAL DOS CABELOS

HAIR TECH Glia Innovation

Dermatologicamente testado

Um ativo dermocosmético que vai além da tecnologia, proporciona autoestima e bem-estar

Benefícios

Drone® GreyOver é um ingrediente ativo dermocosmético, ativador/estimulante da produção de melanina capilar, com efeitos pro-pigmentante, pro-idade e pro-equilíbrio redox para cabelos. Obtido pela combinação de tecnologias em "biomimetic peptide design" e sistema de delivery de alta performance, Drone® GreyOver restaura a cor original dos cabelos grisalhos, bem como retarda e previne o processo de despigmentação capilar. Análogo peptídico da melanocortina (α -MSH, do inglês Alpha-melanocyte stimulating hormone), Drone® GreyOver é uma solução biomimética, eficaz e biocompatível, com resultados in vitro e clínicos seguros e proeminentes.

Atributos/Claims marcantes: prevenir, retardar e reverter o processo de embranquecimento/despigmentação do cabelo; diminuir a densidade dos cabelos grisalhos; cuidado capilar antienvelhecimento; vitalidade e autoestima. Dermatologicamente testado..

Aplicação

Tônicos capilares, shampoos e condicionadores, com ações naturais para cabelos e barbas: fortalecedor de fios, fortificante de cor natural; alternativa biocompatível para o couro cabeludo a tintura química; reversão de cabelos grisalhos prematuros, efeito anti-cabelo branco.

Recomendação de uso para formuladores:

Drone® GreyOver deve ser usado a uma temperatura de 40°C ou inferior. No entanto, pode ser aquecido, se necessário.

INFORMAÇÕES REGULATÓRIAS

Em fase de liberação.

Dose recomendada:

0.5% - 2%

Faixa de pH: 4,0 - 8,4



Informações **Regulatórias**

INCI	CAS
PHOSPHATE BUFFERED SALINE	-
CAPRYLYL GLYCOL	1117-86-8
PHENOXYETHANOL	122-99-6
GLYCERIN	56-81-5
PALMITOYL TETRAPEPTIDE-20 AMIDE	-
POLOXAMER 407	9003-11-6



Sistema Drone® GreyOver reativa o processo de melanogênese capilar

As pessoas usam como comunicação social as características genéticas refletidas pela saúde de sua pele e de seu cabelo, seja como identificação étnica, de saúde, estética, gênero e/ou idade. Em particular, o cabelo se transforma em uma identidade, e o aspecto natural do cabelo mostra mudanças marcantes relacionadas à idade, em várias etapas da vida. Por exemplo, durante a puberdade, muitas vezes há uma mudança no calibre dos fios, alterações na cor para cabelos mais profundamente pigmentados, mais grossos ou quebradiços. Além disso, a heterocromia da fibra capilar (cabelos de cores diferentes em diferentes locais do corpo) torna-se mais aparente com a idade durante os 20 a 40 anos de vida, em homens com destaque para o couro cabeludo e barba. **Mas, com o avanço de nosso relógio biológico, sem dúvida, a alteração mais marcante e inevitável que acontece com os cabelos, é o aparecimento dos fios brancos, um evento que afetará homens e mulheres sem distinção.**

Vale mencionar, que a manutenção dos fios brancos difere entre homens e mulheres, onde os homens tendem a assumirem os fios com mais facilidade, independentemente da idade, já para as mulheres, a manutenção dos fios é um processo mais desgastante. Mas em tempos modernos, mulheres e homens estão procurando soluções eficazes que proporcionem o retardamento da despigmentação ou que induzam a re-pigmentação dos fios. Uma estratégia psico-comercial esperada por um mercado mundial que envelhece, e que está ávido por soluções revitalizadoras.

Do ponto de vista da biologia e metabolismo celular, os melanócitos capilares parecem ser mais sensíveis que os melanócitos epidérmicos à influência do envelhecimento; haja visto o rápido e dramático aparecimento de cabelos



grisalhos (Ref. 1), em comparação com a mudança gradual na pigmentação da pele. Essas variações de pigmentação relacionadas à idade (ao processo de envelhecimento) parecem ter forte origem hormonal e genética, mas também a dieta alimentar e estilo de vida podem contribuir para desencadear alterações nos fios.

Cabelos brancos ou grisalhos, geralmente aparecem pela primeira vez ao final dos 20 anos / início dos 30 anos, resultado do intenso ciclo de proliferação ao qual as células pigmentares do folículo piloso, os melanócitos, são submetidos durante seu *"life span"*. Originalmente, os melanócitos dos folículos pilosos, bem como os da epiderme, são derivados da crista neural, para pigmentar o cabelo e a pele, respectivamente (Ref. 2). Os melanócitos na epiderme possuem um índice de proliferação baixo e produzem pigmentos de melanina para proteger a pele da luz ultravioleta (UV), enquanto que os melanócitos nos folículos capilares proliferam e se diferenciam repetidamente para a pigmentação dos fios em cada ciclo capilar. Uma vez que os melanócitos colonizam a matriz capilar na parte inferior de cada folículo piloso durante o desenvolvimento ou durante o ciclo capilar, eles se diferenciam em melanócitos totalmente maduros que produzem pigmento, a melanina, em uma organela especial chamada melanossomo. Os melanossomos são então transferidos para os queratinócitos pré-corticais adjacentes que produzem a haste capilar, onde durante cada ciclo capilar, o cabelo em crescimento (fase anágena*) torna-se pigmentado. Os melanócitos morrem e desaparecem da matriz capilar quando os folículos capilares regridem, mas reaparecem nesse local durante a fase de crescimento do folículo capilar, para dar início ao intenso processo de pigmentação dos fios, que com o processo de envelhecimento tende a cessar.

* O folículo piloso passa por períodos cíclicos de crescimento ativo (anágena), repouso (catégena) e queda (telógena), impulsionados pela proliferação e diferenciação de células-tronco epiteliais (Ref. 3).



Paradoxalmente, como mencionado, alguns melanócitos na epiderme podem até se tornar mais metabolicamente ativos com a idade, em especial se previamente expostos aos raios UV (ultra violeta), resultando no aparecimento de manchas de idade. Essas diferenças, provavelmente refletem a diversidade significativa nos microambientes celulares epidérmicos e foliculares em termos de mecanismos de envelhecimento, e como eles são expostos e/ou respondem as vias de sinalizações e ao estresse oxidativo, que afetam não apenas a melanogênese, mas também a homeostase, sobrevivência dos melanócitos e a manutenção dos reservatórios de células-tronco (Ref. 3-6).

Estudos científicos e clínicos, cada vez mais elaborados, já mostram que a unidade pigmentar do cabelo tem potencial regenerativo, mesmo depois de ter iniciado a produzir fibras capilares brancas. Diante deste cenário regenerativo e promissor, a equipe da **Glia Innovation** apresenta o Sistema Drone® GreyOver, uma solução anti-cabelo branco, pro-pigmentante, capaz de modular as alterações associadas ao envelhecimento capilar por retardar, estimular e manter a produção de melanina nos sistemas capilares por mais tempo, e de uma maneira saudável/biocompatível para os cabelos e para o microambiente celular capilar. Utilizando tecnologias avançadas de "biomimetic peptide design", com alinhamento da análise in silico utilizando técnicas de docking molecular, dinâmica molecular e sistema de delivery de alta performance, o Drone® GreyOver surge como uma solução biomimética derivada do α -MSH (melanotropina, do inglês Alpha-melanocyte stimulating hormone) com resultados in vitro e clínicos dermatologicamente seguros e proeminentes.



SISTEMA DRONE® GreyOver – Vitalidade e regeneração para os cabelos envelhecidos, reconectando a sua cor natural

Ao falarmos de vitalidade estamos falando da habilidade de manter a capacidade regenerativa de nossas células. O processo de regeneração é a capacidade inata dos organismos vivos de se repararem pelo uso benéfico de seus próprios recursos ou processos (Ref. 7). Preservar as propriedades de regeneração da pele, um **sistema tegumentar*** complexo, é uma estratégia fundamental para envelhecer bem e com boa saúde. Com o avanço da idade, no entanto, o metabolismo e o funcionamento das células diminuem e sua capacidade de interagir mutuamente se deteriora, enfraquecendo o processo de regeneração. Nos cabelos, esse ciclo de regeneração inevitavelmente se reflete na cor dos fios, com o aparecimento de fios brancos e enfraquecidos.

***Sistema tegumentar:** conjunto de estruturas que formam a pele (e suas camadas), células, como glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, **foliculos pilosos** (pelos e cabelos) e unhas (Ref. 8).

Destacando o nosso pigmento natural a melanina, um pigmento onipresente, que define não somente a cor da nossa pele, mas também dos nossos pelos, olhos e cabelos. Um pigmento essencial, que não está restrito ao reflexo de cor, mas também participa de uma maquinaria bioquímica e de proteção, que vai além do nosso sistema fisiológico, representa nossa evolução e biodiversidade. A melanina é um pigmento heterogêneo e multifatorial, está relacionado a defesa contra radiação ultravioleta, ao estresse oxidativo, a captação de energia, a ligação a metais e até a regulação térmica (Ref. 9-11). É um pigmento que necessita da conectividade e da integralidade de diferentes tipos celulares da pele. Produzida pelos melanócitos e transferida para os queratinócitos, a melanina é dependente de um bio-tráfego de vesículas/grânulos coordenado para exercer suas funções biológicas. De fato, a pigmentação do folículo piloso resulta de interações sequenciais precisas entre melanócitos foliculares, queratinócitos,



matriz extracelular e fibroblastos da derme (Ref. 10,11).

De maneira específica, esse processo de bio-tráfego envolve continuamente a atividade melanogênica dos melanócitos foliculares, a transferência de seu produto, grânulos de melanina, para os queratinócitos corticais e medulares e a formação de hastes capilares pigmentadas (ricas em melanina) (Ref. 10). No contexto da perda de pigmentação, o grisalho do cabelo humano invariavelmente começa com o declínio gradual da melanogênese, incluindo atividade reduzida da tirosinase, transferência defeituosa de melanossoma e a morte por apoptose de melanócitos do folículo piloso, sendo caracterizado como um evento primário do bulbo capilar (Ref. 8-10). O processo de melanogênese também é um processo de regeneração, e a participação de estoques ou reservatórios de células progenitoras ou "stem cells" é um evento crucial e crítico (Ref. 10). O reservatório dessas células indiferenciadas também se esgota, e nesse estágio o acinzentado e envelhecimento dos fios torna-se potencialmente irreversível. Simultaneamente, há o dano oxidativo outro fator marcante no processo de envelhecimento dos fios, que leva a apoptose de melanócitos do folículo piloso, a falta de manutenção de células progenitoras e do próprio aparelho enzimático da melanogênese (redução da via da tirosinase). Somados a esses fatores, também há fatores neuroendócrinos, com a participação do α -MSH, hormônio estimulador de melanócitos alfa (melanotropina), o fator de transcrição associado à microftalmia (MITF, do inglês *microphthalmia-associated transcription factor*) e a integrina $\alpha 6$ (relacionada a ancoragem celular, um dos componentes centrais na transferência do melanossoma), reguladores bem conhecidos da atividade de melanócitos e do processo de melanogênese do folículo piloso humano, alvos da inovação da equipe Glia Innovation.

O hormônio α -MSH juntamente com seus respectivos receptores estão envolvidos



em diversos processos fisiológicos, incluindo o processo de melanogênese (Ref. 2,12). Por ser um imunomodulador bem tolerado com efeitos citoprotetores e anti-inflamatórios, o α -MSH é conhecido por estimular a melanogênese e a proliferação de melanócitos foliculares, com consequente indução da produção e transferência de melanina, ao interagir com seus receptores MCR (receptores de melanocortina, do inglês *melanocortin receptor*). Neste cenário de interação e função, agonista e receptor, alterações estruturais e funcionais críticas no hormônio α -MSH e/ou em seu receptor durante o processo de envelhecimento resultam no declínio da pigmentação capilar, com o aparecimento dos fios grisalhos (Ref. 2). Em contrapartida, a integração das tecnologias e plataformas da Glia Innovation, permitiu o design biomimético racional e eficaz de um análogo peptídico do α -MSH, o Drone® GreyOver, um ativo biocompatível ao processo de melanogênese folicular, integrado a um sistema de delivery bio-guiado como requer todo o processo de alta performance e de identificação/reconhecimento celular de agentes/ativos biomiméticos.

O sistema Drone® GreyOver (Figura 1) da Glia Innovation, foi desenhado para intervir e reverter o processo de despigmentação capilar. Os efeitos desse peptídeo biomimético em seu sistema de delivery de alta performance, foram investigados in vitro em diferentes alvos moleculares relacionados a perda de pigmentação do folículo piloso, especificamente no aparecimento do grisalho capilar. Também realizamos estudos clínicos sobre a eficácia do efeito anti-cabelo branco ou anti-acinzentado do Drone® GreyOver, em uma formulação tópica biocompatível e dermatologicamente testada.

Importante destacar, que em todos os testes in vitro de eficácia do Drone® GreyOver, utilizou-se como comparação a solução benchmark de mercado, com destaque para a biocompatibilidade do nosso ativo, e para os resultados mais



proeminentes no estímulo do processo de melanogênese do folículo piloso em baixas concentrações, prevenindo o envelhecimento e reativando a pigmentação dos cabelos grisalhos de maneira segura. O mecanismo de ação do Drone® GreyOver está em destaque na Figura 2.



COORDENADAS PARA A MISSÃO DRONE® GreyOver

A tecnologia sistema Drone® da Glia Innovation proporciona alta eficácia de forma sustentada e segura para máxima percepção do usuário. A entrega eficiente e específica de um ingrediente são desafios críticos em qualquer tratamento cosmético, seja facial ou capilar. Drone® Greyover minimiza esses desafios uma vez que suas nano-esferas de transporte são compostas por um copolímero biocompatível, em uma configuração coordenada para entrega célula específica, possibilitando a liberação do ativo nos melanócitos capilares. Outro diferencial da seletividade de entrega do Drone® GreyOver é a possibilidade do uso de doses mais baixas, garantindo alta performance de maneira biocompatível e segura. A configuração final do sistema Drone® GreyOver requer uma ligação química entre ligantes externos específicos, que dita a missão do Drone® GreyOver ao interagir com o receptor específico MC1R do α -MSH em melanócitos foliculares (Figura 1). Tecnologia aliada a autoestima.

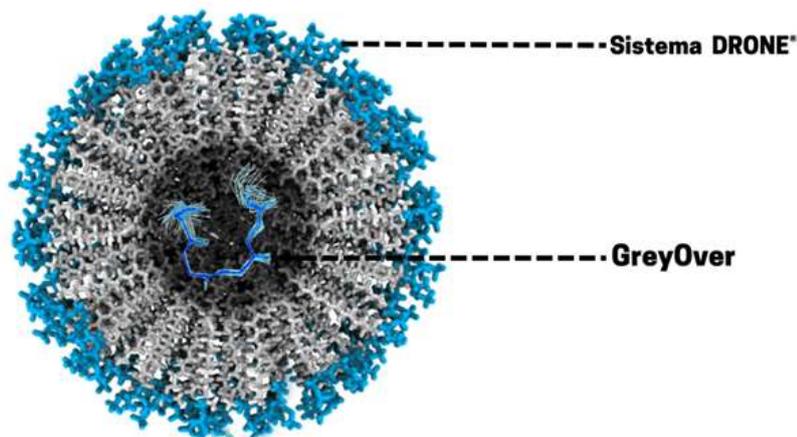


Figura 1: DRONE® GreyOver sistema de nano-esferas (nanopolimérico bifásico) contendo o tetrapeptídeo análogo ao α -MSH (do inglês Alpha-melanocyte stimulating hormone). Palmitoyl-tetrapeptide-20, em configuração L-

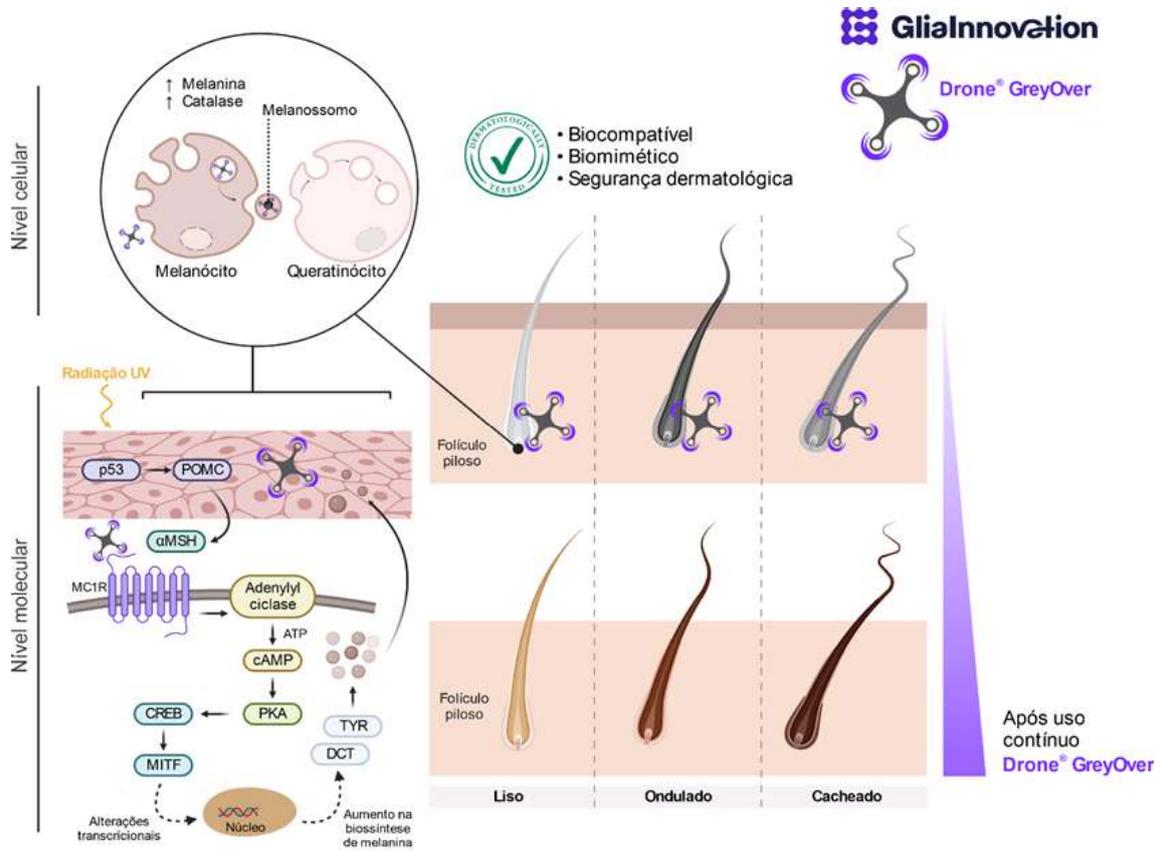


Figura 2: Drone® GreyOver é um análogo peptídico sintético da melanocortina (α-MSH, do inglês Alpha-melanocyte stimulating hormone), atuando em receptores MCR (receptores de melanocortina, do inglês melanocortin receptor), que ativam a via do cAMP para induzir o processo de melanogênese, aumentando a biossíntese e bio-tráfego de melanina na interface do folículo piloso (bulbo/haste capilar e papila dermal), re-ativando a produção de melanina em melanócitos (fase anágena, de crescimento e pigmentação) com manutenção do equilíbrio redox, principalmente com o aumento regulado na atividade da catalase (enzima responsável por controlar os níveis de H₂O₂) (Ref. 2).



TESTES CLÍNICOS – DRONE® GreyOver Eficaz na Re-pigmentação dos Cabelos Grisalhos – Resultados Perceptíveis por usuários

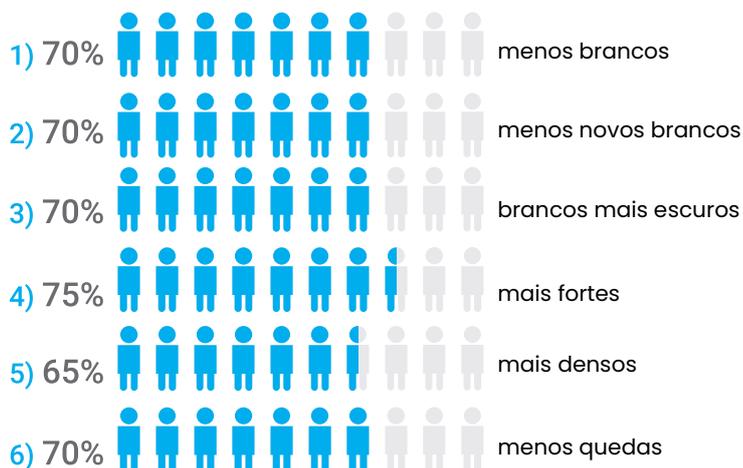
Testes clínicos de eficácia percebida ou apreciabilidade cosmética de ingredientes ativos, juntamente com amplos testes de segurança e eficácia in vitro, conferem uma base sólida para o lançamento de novas tecnologias, ainda mais se tratando de um grande desafio como a aplicação para a reversão de cabelos grisalhos. A equipe da Glia Innovation assume o compromisso de estabelecer segurança, biocompatibilidade e eficácia como os pilares de seus lançamentos. O Drone® GreyOver foi submetido a testes in vitro e clínicos de segurança e eficácia, desde o cultivo de células em sistema 2D até testes de colorimetria e apreciabilidade cosméticas em voluntários. Os testes clínicos de apreciabilidade cosmética realizados em 31 voluntários, confirmaram a eficácia do Drone® GreyOver, com resultados perceptíveis pelos usuários, que incluíam desde mulheres e homens, com diversos graus de cabelos grisalhos, enquadrados na faixa etária de 35 a 63 anos. Foi comprovado que o Drone® GreyOver quando utilizado em uma formulação do tipo tônico capilar multifuncional, foi eficaz em: 1) diminuir o crescimento de fios brancos; 2) escurecer os cabelos grisalhos; 3) conferir maior densidade aos fios; 4) retardar o aparecimento de novos fios brancos com excelentes resultados visíveis em apenas 30 dias de tratamento. Os resultados de apreciabilidade cosmética do Drone® GreyOver também foi comparada aos resultados da solução benchmark de mercado, confirmando sua eficácia e biocompatibilidade, que em diversos quesitos se destacou com superioridade a solução que está disponível no mercado (destaque para a Figura 3).



% DE PARTICIPANTES PARA AS RESPOSTAS



Drone GreyOver 2%



Benchmark 2%

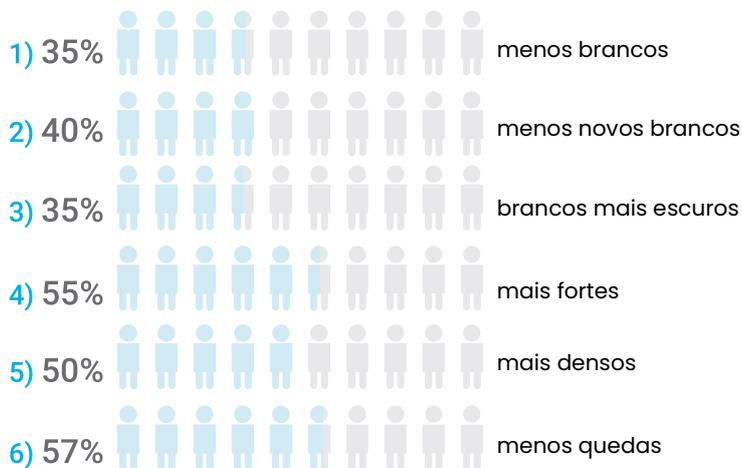


Figura 3: Respostas dos 31 participantes aos questionários de apreciabilidade cosmética aplicados após 30 dias de uso do tônico capilar contendo Drone® GreyOver (2%) em comparação a solução benchmark de mercado (2%). Drone® GreyOver proporciona cabelos menos grisalhos/brancos, mais fortes, mais densos, que crescem mais e com menos queda.

Drone® GreyOver – Eficácia comprovada no Teste de Avaliação Instrumental da Cor do Cabelo por Colorimetria

O objetivo principal do estudo foi avaliar o efeito direto do Drone® GreyOver na pigmentação do cabelo e correlacionar a durabilidade dos efeitos com as



lavagens dos fios. Para os testes foram utilizadas mechas de cabelos grisalhos de 3 voluntárias, para a aplicação (no couro cabeludo) de um tônico capilar contendo Drone® GreyOver a 2%, para avaliar a transição de coloração por sistema $L^* a^* b^*$, medidas capturadas pelo equipamento espectrofotômetro CM-3600A® – Konica Minolta. As análises foram realizadas por um período de 30 dias, onde a transição de cor do branco para o preto, após tratamento com Drone® GreyOver, foi avaliada após 10 e 15 lavagens. Os resultados mostraram que houve alteração no valor de L^* após 10 e 15 aplicações do Drone® GreyOver, demonstrando o escurecimento das mechas, com nítida diminuição dos fios brancos, proporcionando proteção da despigmentação e diminuição de fios cinzas das mechas grisalhas de 10% após 10 lavagens (t_{10}) e de 15% após 15 lavagens, quando comparadas ao tempo inicial (t_0) antes da aplicação do tônico capilar contendo o Drone® GreyOver (2%), resultado obtidos em apenas 1 mês de tratamento (Figura 4).



Drone® GreyOver



COLORIMETRIA

DRONE® GREYOVER

EFICÁCIA NA DIMINUIÇÃO DOS FIOS BRANCOS, PROTEÇÃO DA DESPIGMENTAÇÃO E DIMINUIÇÃO DE FIOS CINZAS EM ÁREAS GRISALHAS DE 15% EM APENAS 1 MÊS DE USO. A SOLUÇÃO BENCHMARK DE MERCADO APRESENTA EFICÁCIA DE 30% NA DIMINUIÇÃO DOS FIOS BRANCOS EM 3 MESES DE USO (dado informado pelo concorrente).

Figura 4: Eficácia do Drone® GreyOver (2%) em mechas submetidas a sucessivas lavagens (10 e 15) após a aplicação do ativo, redução de fios brancos comprovado pelo teste de colorimetria L* (transição do branco para o preto de 15% em apenas 1 mês de uso do Drone® GreyOver).



TESTES IN VITRO – SISTEMA DRONE® GreyOver

Para os testes *in vitro* de segurança, toxicidade e eficácia utilizamos a cultura primária de melanócitos humanos, Human Melanocyte (hML)-nh-skp-ML0009, adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro* (Brasil) (com controle de qualidade microbiológico, incluindo negatividade para micoplasma). As células foram cultivadas de acordo com as instruções do fornecedor em meio de cultivo MBM-4 Melanocyte Basal Medium 4 (MBM-4) suplementado com Melanocyte Growth Medium 4 (MGM-4) (Lonza, Switzerland), contendo fatores adequados por proporcionar proliferação coordenada e coesa, bem como longevidade prolongada à cultura primária até a 5ª passagem.

*Com aprovação do comitê de ética, Plataforma Brasil CAAE 62729416.9.0000.5395.

Drone® GreyOver é Seguro e Biocompatível

Ensaio de viabilidade celular pela Análise da Redução do MTT e análise morfológica

Para os ensaios de avaliação de segurança e citotoxicidade *in vitro* do Drone® GreyOver, as células (hML)-nh-skp-ML0009, melanócitos cutâneos (4×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços, e após 24h, as células foram tratadas com o Drone® GreyOver (10^{-8} a 10^{-9} M; 0,05%-1%) ou com a solução benchmark de mercado nas mesmas concentrações, e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 e 48h. Subsequentemente, a capacidade de redução do MTT pelos melanócitos foi analisada por método colorimétrico. No gráfico da Figura 5, pode-se observar a biocompatibilidade e segurança do Drone® GreyOver frente a atividade metabólica dos melanócitos cutâneos. Em todas as concentrações testadas os melanócitos apresentaram atividade metabólica ativa, sem comprometimento da viabilidade celular. Em contraste, os melanócitos tratados



com a solução benchmark de mercado se mostraram sensíveis as concentrações a partir de 0,5%, com destaque para a queda drástica da viabilidade celular para $13\pm 6\%$, quando os melanócitos foram tratados com 1% da solução concorrente. Os resultados de viabilidade celular destacam a biocompatibilidade do Drone® GreyOver as células pigmentares da pele humana.

Metabolismo Celular Ativo e Regulado – Melanócitos Saudáveis sem Perda de Viabilidade sob Tratamento com Drone® GreyOver *in vitro*

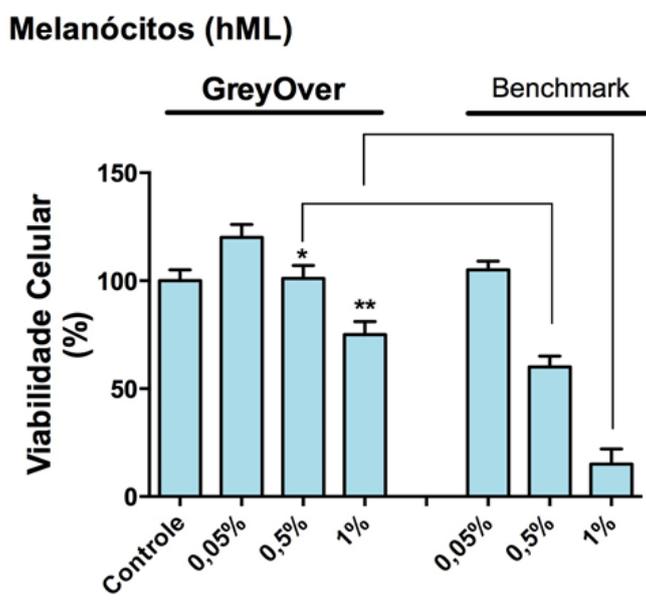


Figura 5: Análise da Viabilidade Celular de melanócitos de pele humana por redução do MTT sob tratamento com Drone® GreyOver (análises em 24h e 48h). A cultura primária (hML)-nh-skp-ML0009 foi tratada com o Drone® GreyOver (três (3) concentrações diferentes, 0,05%, 0,5% e 1%), e separadamente a solução benchmark de mercado foi testado nas mesmas condições e concentrações. Para o teste de redução do MTT é considerado toxicidade valores abaixo de 50% de viabilidade celular. Experimentos realizados em triplicata. O teste estatístico utilizado t-test (* ≤ 0.001 , ** ≤ 0.0001) GraphPad PRISM5.0 (La Jolla, CA).

Simultaneamente as análises de viabilidade celular/ toxicidade pela redução do MTT, foram conduzidas análises morfológicas dos melanócitos tratados com Drone® GreyOver em microscópio óptico, análises comparadas com a solução benchmark de mercado. No período de 24h a 72h os melanócitos que receberam o tratamento com o Drone® GreyOver (em três concentrações diferentes 0,05%, 0,5% e 1%) foram diariamente monitorados, e os resultados observados indicaram que



as células mantiveram seu fenótipo característico preservado e adequado, com aspecto de células dendríticas, com variação morfológica normal entre bipolar, centro oval e/ou extremidades fusiforme multipolar (Figura 6). Drone® GreyOver demonstrou sua biocompatibilidade nas análises morfológicas/fenotípicas em todas as concentrações e tempos analisados. E confirmando os resultados obtidos na análise de viabilidade celular pela redução do MTT, os melanócitos que foram tratados com o ativo benchmark na concentração de 1% em todos os tempos analisados, adquiriram uma morfologia inadequada, com perda das características fenotípicas típicas, com células isoladas sem contato celular, com notório efeito citotóxico. Este efeito também foi observado na concentração de 0,5% em 72h de análise (Figura 6).



DRONE® GREYOVER HAIR TECH DA GLIA INNOVATION É BIOCOMPATÍVEL

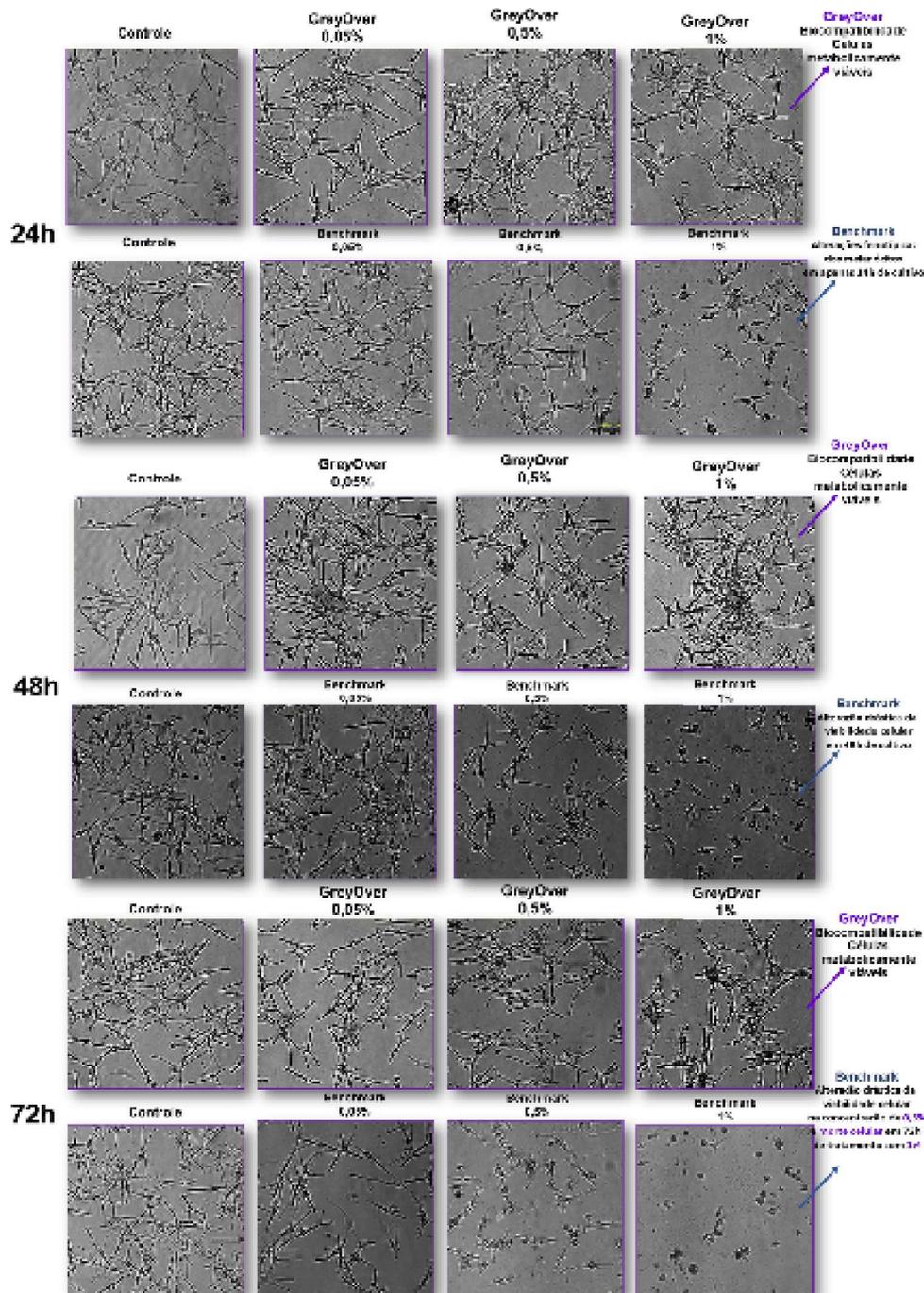


Figura 6: Drone® GreyOver mantém a morfologia/fenótipo adequado de melanócitos cutâneos, de maneira superior a solução benchmark de mercado, em diferentes concentrações até 72h de cultivo. Análise por microscopia de contraste de fase, aumento magnitude de 40x. Barra de escala 100 µm.



Drone® GreyOver Glia Innovation Estimula a Produção de Melanina de maneira mais Eficaz e Segura do que a solução benchmark de mercado em Melanócitos Humanos

Teste de quantificação de produção de melanina

A fim de investigar a atividade estimulante da melanogênese (produção de melanina) do Drone® GreyOver mediada pela interação com o receptor MC1-R, com consequente produção de melanina, utilizou-se modelo de cultura 2D de melanócitos humanos. Desta forma, melanócitos (hML)-nh-skp-ML0009 (3×10^5 células/poço) foram cultivados em placas de 6 poços, e após 24h, as células foram tratadas com o Drone® GreyOver (0.005% e 0.05%) ou com a solução benchmark de mercado nas mesmas concentrações. Após 72h de monitoramento do tratamento com Drone® GreyOver seguiu-se com a quantificação de melanina total produzida por melanócitos utilizando método colorimétrico (A_{405}) e monitoramento simultâneo das células por microscópio de alta resolução, plataforma Cytation (Biotek).

Os resultados obtidos mostraram a superioridade de ação do Drone® GreyOver na indução de produção de melanina quando comparado a solução benchmark de mercado. Drone® GreyOver é capaz de induzir a síntese de melanina +33% e +15%, nas concentrações de 0,005% e 0,05%, respectivamente, a mais que a solução benchmark de mercado nas mesmas concentrações. Drone® GreyOver da Glia Innovation, é capaz de induzir a produção de melanina de maneira segura e biocompatível (Figura 7). Pode-se notar nas imagens de alta resolução o grande número de grânulos contendo melanina (indicados pela seta lilás) nos melanócitos tratados com Drone® GreyOver. Em contraste, a solução benchmark de mercado, se mostrou inferior na capacidade de indução de produção de



melanina, induzindo claro desgaste celular.

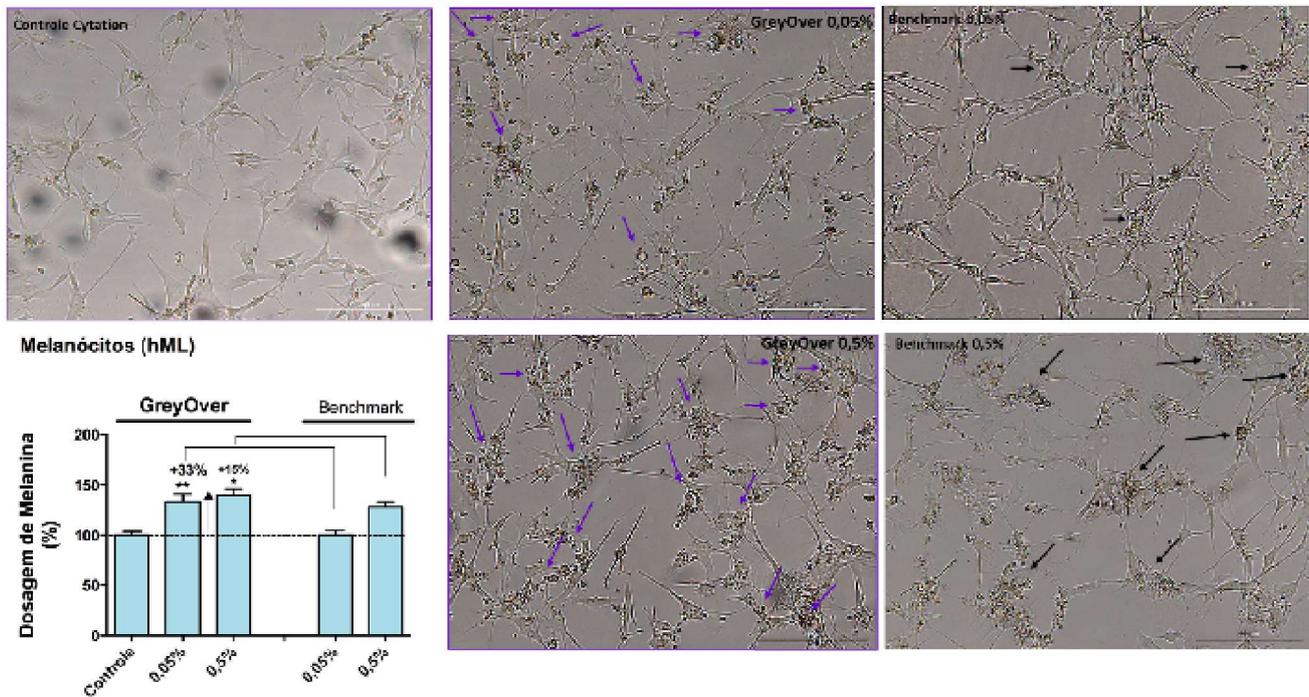


Figura 7: Drone® GreyOver estimula a produção de melanina em melanócitos de pele humana, de maneira superior que a solução benchmark de mercado. As análises de imagem foram realizadas na plataforma Cytation (Biotek). E a quantificação da produção de melanina total, seguiu-se por método colorimétrico, com o uso de NaOH a 1M, para extração de melanina. A atividade dos produtos testados em relação à ativação de α -MSH foi avaliada por espectrofotometria em $\lambda = 405$ nm. O teor de melanina foi expresso como a porcentagem de produção de melanina, em comparação com o número de células. Experimentos realizados em triplicata. O teste estatístico utilizado t-test ($*\leq 0.001$, $**\leq 0.0001$) GraphPad PRISM5.0 (La Jolla, CA).

Drone® GreyOver Intensifica a Atividade da catalase *in vitro* por dosagem enzimática, com consequente combate ao Estresse Oxidativo com a redução de H_2O_2 – Efeito de re-pigmentação dos cabelos grisalhos

É fundamental que nossos sistemas celulares funcionem em equilíbrio, uma vez que reações bioquímicas acontecem de maneira dinâmica, simultânea e quase que inesgotavelmente. Dentre os inúmeros processos celulares que são estritamente controlados e governados por sistemas precisos de vias bioquímicas, o sistema redox se destaca por ser um processo de alto controle. O sistema redox é essencial na manutenção da homeostase celular. Sob condições fisiológicas, as células mantêm o equilíbrio redox através da geração e eliminação de espécies reativas



de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN), que incluem espécies radicais como superóxido (O_2^-) e radical hidroxila ($HO\cdot$), e óxido nítrico ($NO\cdot$), juntamente com espécies não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As células são equipadas com sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para eliminar ERO e manter a homeostase redox. Em se tratando do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sua conversão de H_2O_2 em $H_2O + O_2$ ocorre pela ação da catalase, uma enzima que normalmente está localizada no peroxissomo. Curiosamente, a catalase tem taxas de renovação de substrato extremamente altas, eliminando cerca de 6 milhões de moléculas de H_2O_2 por minuto, um sistema extremamente eficiente (Ref. 13-16).

No contexto capilar, o H_2O_2 é uma das ERO mais atuante no processo danoso de despigmentação do folículo piloso, essa ERO leva a formação de um ambiente de estresse oxidativo nos melanócitos localizados nos bulbos capilares, devido a uma falha no controle de sua eliminação pela ação down-regulada da catalase no processo de envelhecimento, como consequência há alterações na viabilidade dos melanócitos, que se tornam incapazes de produzir melanina (Ref. 2, 13). Desta forma, a equipe da Glia Innovation, investigou a capacidade do Drone® GreyOver de atuar na intensificação da atividade da catalase para garantir a conversão do H_2O_2 em $H_2O + O_2$, proporcionando equilíbrio redox. Utilizando método colorimétrico de dosagem direta da atividade da catalase *in vitro* (seguindo todas as recomendações do fabricante, kit Megazyme), o Drone® GreyOver (0,5%) foi adicionado e incubado por 10 min em placa de 96 poços contendo uma solução de 5,0 mU de catalase a temperatura ambiente. Subsequentemente, foi adicionado uma solução de H_2O_2 (20 μM) e a mistura foi incubada por mais 30 minutos à temperatura ambiente no escuro, para posterior detecção do corante quinoneimina resultante medido a 520 nm. Os resultados indicaram que o Drone® GreyOver (0,5%) foi capaz de melhorar a atividade da catalase *in vitro* em 10%, o



que tem relação direta com a retomada do equilíbrio redox no microambiente capilar, levando a re-pigmentação de estruturas foliculares grisalhas (Figura 8).

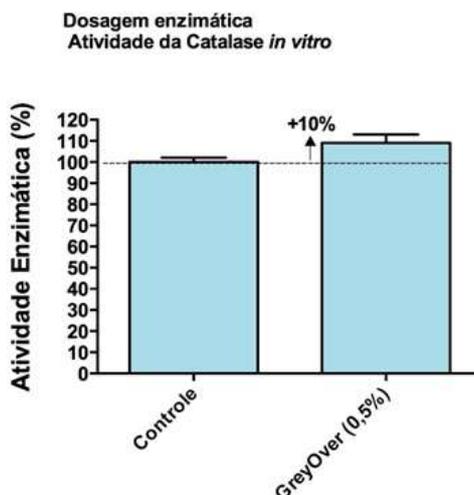


Figura 8: Drone® GreyOver (0,5%) intensifica a atividade da catalase em ensaio de dosagem enzimática *in vitro*. Teste colorimétrico (A_{520}) para detecção do corante quinoneimina resultante. Ensaio realizado em triplicata. O teste estatístico utilizado t-test (Drone® GreyOver 0,5% - $\xi \leq 0.1$) GraphPad PRISM5.0 (La Jolla, CA).

INTERAÇÃO DE ALTA AFINIDADE ENTRE DRONE® GreyOver E RECEPTOR MCI-R PARA A ATIVAÇÃO DA MELANOGÊNESE – TESTES SISTEMA BIACORE

A fim de confirmar a atuação do Drone® GreyOver (um peptídeo biomimético derivado do α -MSH) como agonista do receptor MCI-R - interação responsável pela ação biológica e eficácia do ativo - foram executadas análises por ressonância plasmônica de superfície, em sistema BIACore 3000 instrument* (Biacore International AB, Uppsala, Sweden) utilizando chips de sensor de ouro revestidos com matriz de dextrana (CM5, grau de pesquisa, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala). O receptor MCI-R, proteína a ser imobilizada na matriz do sensor do chip, foi exposto ao ligante Drone® GreyOver com o objetivo central de confirmar a sua afinidade como agonista do receptor MCI-R. Especificamente, as análises por sistema BiaCore permitiram identificar e medir as taxas de ligação/ interação do Drone® GreyOver e MCI-R, estabelecendo limites para interações de ligação e não ligação. A Figura 9 ilustra a tecnologia do sistema BIACore, interação



peptídeo/Drone® GreyOver – receptor MC1-R com afinidade transitória, porém efetiva.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS Drone® GreyOver – TÉCNICA DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (sistema BIACore)

A tecnologia biacore* afere interações biomoleculares, incluindo interações proteína-proteína, como ligante/receptor, interações molécula pequena/fragmento-proteína, etc. sua tecnologia é frequentemente usada para medir não apenas afinidades de ligação, mas também constantes de taxa cinética e termodinâmica. A tecnologia é baseada na ressonância plasmônica* de superfície, um fenômeno óptico que permite a detecção de sítios de interação for afinidade de identificação estrutural.

Os chips foram customizados pelo fabricante (Cytiva, da GE) onde as proteínas alvo – como o receptor MC1 do hormônio alpha-MSH – são imobilizadas/ fixadas em uma matriz de carboximetilado de dextran e partículas de ouro (GE health care biosciences), para posterior análise no equipamento *Biacore t200 (GE health care bio-sciences, UPPSALA, SWEDEN).



GlialInnovation



Surface plasmon resonance

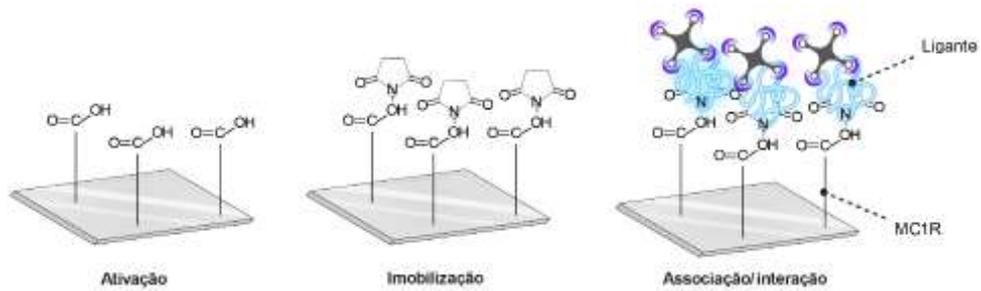
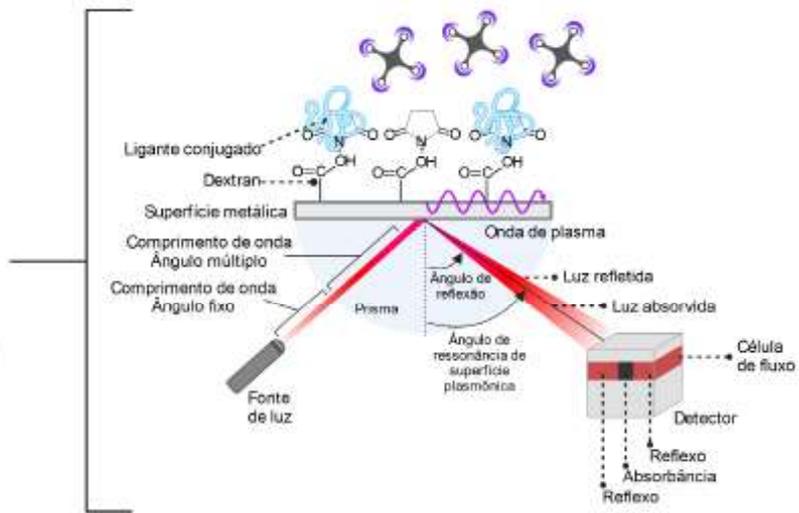


Figura 9: Esquema do sistema Biacore para detecção de interação do Drone GreyOver com o receptor MC1 do hormônio alpha-MSH.



Linha DRONE® peptídeos biomiméticos é BioSafe

CMR-free (Carcinogenic-free, Mutagenic-free, Reprotoxic-free)

Síntese de peptídeo finalizada com contra íon de acetato

Purificação: Pureza $\geq 98\%$ em Sistema HPLC

Confirmação de identidade: Sistema HPLC e Análise por Espectrometria de Massas

Além do controle de qualidade da síntese da linha DRONE® peptídeos biomiméticos, nossos testes BioSafe atestam a segurança em ensaios celulares in vitro. Utilizamos marcadores estratégicos para garantir um efeito celular controlado, coordenado e coeso em tempo e espaço (célula alvo). Para tal, utilizamos os marcadores clássicos de índice de proliferação e saúde celular (ciclo celular), as proteínas Ki-67 e p53, respectivamente. A não positividade para ki67 e a expressão normal/basal de p53 garantam a segurança no tratamento das células de pele, como: melanócitos primários humanos, HaCat (queratinócitos humanos da epiderme) e HFF-1 (fibroblastos humanos da derme).

Tônico Anti Grisalho **Drone Grey Over**

PRODUTOS	INCI NAME	%
FASE A		
ÁGUA		QSP
EDTA DISSÓDICO	EDTA	0.10%
GLICERINA BIDEDESTILADA	GLYCERIN	5.00%
FASE B		
SEPIMAX ZEN	POLYACRYLATE CROSSPOLYMER-6	0.30%
FASE C		
DRONE GREYOVER	PHOSPHATE BUFFERED SALINE CAPRYLYL GLYCOL PHENOXYETHANOL GLYCERIN PALMITOYL TETRAPEPTIDE-20 AMIDE POLOXAMER 407	2.00%
TYROSILANE C	METHYLSILANOL ACETYLTYSOSINE	2.00%
FASE D		
FRAGRÂNCIA HIDROSSOLÚVEL	PARFUM	0.30%
FASE E		
CONSERVANTE (SHAROMIX 706)	BENZYL ALCOHOL BENZOIC ACID DEHYDROACETIC ACID	0.60%



Procedimento

Em um sistema de homogeneização de hélice, solubilize o todo o EDTA e a glicerina da fase A na água. Em seguida ajuste a viscosidade do produto com a adição do polímero sepimax zen. Adicione os ativos presentes na fase C item a item aguardando a completa dispersão de cada insumo individual. Finalize o produto com a incorporação da fragrância presente na fase D e o conservante da fase E.

Referências

- 1 Slominski, A. et al. Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol* 124, 13–21 (2005).
- 2 O'Sullivan JDB, Nicu C, Picard M, Chéret J, Bedogni B, Tobin DJ, Paus R. The biology of human hair greying. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2021;96(1):107-128. doi: 10.1111/brv.12648.
- 3 Rabbani P, Takeo M, Chou W, Myung P, Bosenberg M, Chin L, Taketo MM, Ito M. Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration. *Cell.* 2011 Jun 10;145(6):941-955. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.004.
- 4 Shi, Y., Luo, L., Liu, X.M., Zhou, Q., XU, S.-Z. & LEI, T.-C. (2014). Premature graying as a consequence of compromised antioxidant activity in hair bulb melanocytes and their precursors. *PLoS ONE* 9, e93589.
- 5 Bossche, V. D. et al. The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 7, 769–778 (2006).
- 6 Nishimura, E. K. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24, 401–410 (2011).
- 7 Andrade, S.A.; Faria, A.V.S.; Fuhler, G.M.; Peppelenbosch, M.P.; Ferreira-Halder, C.V. Biotech-educated Platelets: beyond tissue regeneration 2.0. *IJMS.* 2020.
- 8 Adrian C Williams. *Transdermal an Meeting, Boston, 1-6, 2019.*
- 10 Commo, S. & Bernard, B.A. (2000). Melanocyte subpopulation turnover during the human hair cycle: an immunohistochemical study. *Pigment Cell Research* 13, 253–259.
- 11 Commo, S., Gaillard, O. & Bernard, B.A. (2004). Human hair greying is linked to a specific depletion of hair follicle melanocytes affecting both the bulb and the outer root sheath. *British Journal of Dermatology* 150, 435–443.
- 12 Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P.M., Schallreuter, K.U., Paus, R. & Tobin, D.J. (2005). Hair follicle pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology* 124, 13–21.
- 13 Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Aug;10(8):1343-74. doi: 10.1089/ars.2007.1957.
- 14 Slominski, A., Pisarchik, A., Tobin, D. J., Mazurkiewicz, J. E. & Wortsman, J. (2004a). Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 145, 941–950.
- 15 Slominski, A., Pisarchik, A., Tobin, D. J., Mazurkiewicz, J. E. & Wortsman, J. (2004b). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews* 84, 1155–1228.
- 16 Rabbani, P., Takeo, M., Chou, W., Myung, P., Bosenberg, M., Chin, L., Taketo, M. M. & Ito, M. (2011). Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration. *Cell* 145, 941–955.



-  +55 62 9 9202-1036
-  contato@gliai.com.br
-  @gliainnovation
-  /gliainnovation
-  /company/gliainnovation

Av. Maria Elias Lisboa Santos, Qd 05, Lt 10 e 11, Pq. Industrial, Aparecida de
Goiânia, CEP 74.993-530.