

TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS SEMELHANTES A DERMATITE ATÓPICA EM CAMUNDONGOS COM FILMES DE GELATINA-ALGINATO CONTENDO SeTal

Andressa Baptista Nörnberg¹; Guilherme Teixeira Voss²; Ethel Antunes Wilhelm³; André Ricardo Fajardo⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – andressanornberg@outlook.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – gui_voss@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ethel.wilhelm@ufpel.edu.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – drefajardo@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma doença de pele inflamatória crônica, na qual, os pacientes apresentam prurido intenso e lesões eczematosas recorrentes. A DA é reconhecida como uma condição vitalícia com várias manifestações e expressões clínicas, nas quais defeitos da barreira epidérmica desempenham papéis centrais (WEIDINGER, 2016). Atualmente, os tratamentos da DA concentram-se na restauração da função da barreira epidérmica, com terapias de primeira linha, incluindo corticoides tópicos que são usados como agentes anti-inflamatórios e antipruriginosos, em crises agudas. No entanto, as crescentes preocupações com o uso dessa classe de medicamentos entre pacientes e profissionais médicos estão resultando em diminuição da adesão ao tratamento, o que piora o controle da DA e o bem-estar do paciente (AXON, 2021). Nesse sentido, buscam-se novos agentes para o tratamento e atenuação dos sintomas da DA como alternativas aos corticoides.

Em um estudo anterior, conseguimos demonstrar o potencial do SeTal (1,4-anidro-4-seleno-D-talitol) na redução dos mediadores inflamatórios associados a lesões cutâneas do tipo DA induzidas por 2,4-dinitroclorobenzendo (DNCB) em camundongos (VOSS, 2021). É importante mencionar que SeTal é um composto patenteado para aplicações de reparo de tecidos cutâneos, além de seu poderoso efeito antioxidante. A fim de obter informações sobre o potencial e ampliar nossa compreensão deste composto, investigamos o uso de filmes biopoliméricos compostos de gelatina (Gel) e alginato de sódio (Alg) carregados com SeTal como tratamento local para lesões semelhantes a DA.

Os constituintes do filme (Gel e Alg) foram escolhidos por apresentarem propriedades atrativas para a preparação de biomateriais para a entrega tópica de fármacos à pele. A Gel é um biopolímero solúvel em água derivado do colágeno e é amplamente utilizado em adesivos cutâneos devido às propriedades atrativas como biocompatibilidade, biodegradável, não imunogênico e naturalmente abundante (AHMADY, 2021). A mistura da Gel com o Alg seguida de uma reticulação com baixas quantidades de carbodimimida permite a geração de materiais com maior estabilidade, propriedades mecânicas e bioadesivas a serem preparadas. Alg é um polissacarídeo linear natural, composto por unidades de 1,4- β -D-manurônica (M) e α -L-gulurônica (G) e, é extraído de algas marrons. De forma semelhante a Gel, o Alg também é biocompatível, biodegradável e atóxico, o que motivou seu uso em muitas aplicações médicas e farmacêuticas (DODERO, 2021).

Ainda, examinamos os potenciais efeitos aditivos de SeTal e outros agentes farmacológicos usados para tratar sintomas de DA, avaliando também filmes de Gel-Alg contendo SeTal juntamente com a hidro cortisona (HC) ou

vitamina C (VitC). Neste estudo, todos os filmes preparados foram extensivamente caracterizados usando uma variedade de técnicas analíticas, com experimentos sistemáticos *in vitro/in vivo/ex vivo* usados para avaliar seu desempenho no tratamento e atenuação de sintomas semelhantes aos da DA em um modelo animal.

2. METODOLOGIA

Filmes de Gel-Alg: Os filmes foram preparados pelo método convencional de fundição com solvente, sendo a composição de cada amostra detalhada na **Tabela 1**. Experimentalmente, o Gel foi primeiramente solubilizado em água destilada (50 mL) com agitação magnética a 60 °C por 1 h, após isso, o Alg foi adicionado a esta solução. A relação Gel:Alg foi fixada em 10:1 com base em experimentos anteriores. Após homogenização, o glicerol foi adicionado à solução de Gel/Alg, com agitação contínua a 30 °C por mais 30 min. O EDC foi então adicionado a solução enquanto era agitado vigorosamente por 15 min antes de ser despejado em uma placa Petri (poliestireno, 80x15 mm, redondo padrão). Depois de 24 h na estufa a 40 °C um filme foi obtido.

As amostras de filme carregadas com SeTal, SeTal/HC e SeTal/VitC foram preparadas de forma semelhante, com quantidades pré-determinadas dos compostos do fármaco (**Tabela 1**) adicionadas a solução filmogênica com agitação magnética por 30 min antes da etapa de fundição com o solvente. Com base em experimentos anteriores (não relatados), as quantidades desses compostos foram ajustadas para cerca de 1 m/m% com base na massa total dos biopolímeros.

Tabela 1. Composição de cada amostra de filme preparado.

Filme	Gel (mg)	Alg (mg)	Glicerol (μL)	EDC (mg)	SeTal (mg)	HC (mg)	VitC (mg)
Gel-Alg	900	90	100	5	-	-	-
Gel-Alg/SeTal	900	90	100	5	10	-	-
Gel-Alg/SeTal/HC	900	90	100	5	10	10	-
Gel-Alg/SeTal/VitC	900	90	100	5	10	-	10

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A natureza química dos filmes foi analisada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), como pode ser observado na **Figura 1**. Os espectros dos filmes de Gel-Alg exibiram bandas importantes associadas aos biopolímeros utilizados para prepará-los, destacando-se as bandas referentes à Gel, por estar presente em excesso nos filmes. A banda alargada entre 3600 e 3000 cm⁻¹ reflete a grande quantidade de grupos hidroxila e amina, bem como a grande quantidade de ligações de hidrogênio entre os grupos funcionais da Gel, Alg e do glicerol (o plastificante). A banda do tipo ombro em 1689 cm⁻¹ é atribuída ao grupo amida (C=O) formado pelo processo de reticulação. Conforme relatado por Staroszczyk *et al.*, o EDC favorece a formação de ligações isopeptídicas entre grupos amino e grupos carboxílicos presentes nos resíduos de ácido glutâmico ou aspártico da Gel (STAROSZCZYK, 2014). Uma vez que grupos carboxílicos também estão disponíveis na cadeia Alg, propomos que ligações amidas também são formadas entre as cadeias de Gel e Alg. O

espectro do filme contendo SeTal (Gel-Alg/SeTal) é semelhante ao do filme Gel-Alg, o que indica interações fracas entre essa molécula e a matriz polimérica. Apesar disso, as bandas associadas aos modos de vibração das ligações C-H, C-O e C-C foram mais intensas no espectro de Gel-Alg/SeTal em comparação com Gel-Alg, sendo estas atribuídas a contribuições dos grupos funcionais de SeTal. O espectro de Gel-Alg/SeTal/HC exibiu uma pequena banda a 1742 cm^{-1} e uma faixa tipo ombro a 1625 cm^{-1} atribuído às vibrações de estiramento C=O e C=C do HC. As bandas mais intensas em torno de $1500\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ também são atribuídos à HC, confirmando a presença desse composto no filme. Finalmente, o espectro do filme contendo VitC exibiu as bandas características do filme Gel-Alg/SeTal com as bandas adicionais observadas em 3528 , 1741 e 863 cm^{-1} atribuídas às vibrações das ligações O-H, C=O e C-C de VitC. Com isso, é possível confirmar que a VitC foi encapsulada de forma estável no filme. Além disso, esses dados espectroscópicos indicam que tanto o SeTal quanto o VitC nos filmes Gel-Alg/SeTal/VitC estão fisicamente aprisionados na matriz polimérica, sem evidência de quaisquer interações químicas.

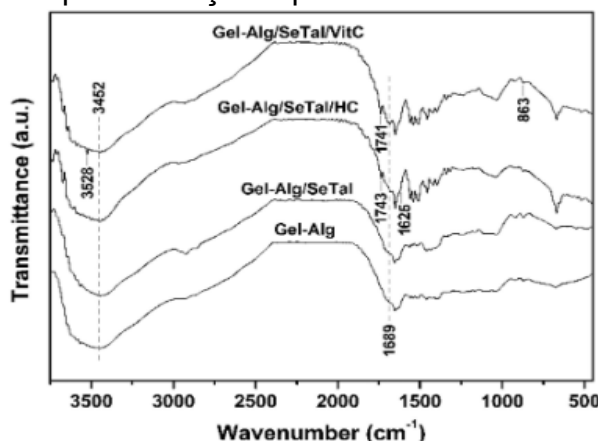


Figura 1. Espectros de FTIR Gel-Alg, Gel-Alg/SeTal, Gel-Alg/SeTal/HC e Gel-Alg/SeTal/VitC.

Além disso, testes *in vivo* foram realizados com o dinitroclorobenzendo (DNCB) que foi usado para induzir condições cutâneas semelhantes a DA em camundongos. Esta molécula penetra na barreira cutânea da epiderme intacta e, inicialmente, causa uma resposta imune na superfície da pele do animal. A exposição repetida leva ao desenvolvimento de um estado semelhante ao da DA em camundongos.

Por esse motivo a região dorsal de cada camundongo foi tricotomizada com uma solução de DNCB, durante os primeiros três dias do protocolo experimental. Em seguida, esse mesmo protocolo foi repetido nos dias 14, 17, 20, 23, 26 e 29. Os animais foram divididos aleatoriamente em sete grupos experimentais, cada um contendo 7 animais: grupo 1 eram camundongos normais, sem indução da DA (não receberam tratamento); grupo 2 foi induzido com DNCB (não receberam tratamento); grupo 3 foram sensibilizados com DNCB e tratados com filmes Gel-Alg; grupo 4 Gel-Alg/SeTal; Grupo 5 Gel-Alg/SeTal/HC; grupo 6 Gel-Alg/SeTal/VitC; e grupo 7 foram tratados apenas com HC. Ao final do trigésimo dia os efeitos da aplicação tópica foram avaliados na gravidade da lesão cutânea, no comportamento de coçar e na espessura do dorso da pele, como são mostrados na **Figura 2**.

A análise ANOVA one-way seguida pelo teste post-hoc de Tukey revelou que o DNCB aumentou significativamente os escores de gravidade da pele [$F_{6,42} =$

45,79, $p < 0,0001$], comportamento de coçar [$F_{6,42} = 420,3$, $p < 0,0001$] e espessamento do dorso [$F_{6,42} = 32,76$, $p < 0,0001$] em comparação com o grupo controle, consistente com DNCB induzindo um fenótipo semelhante ao da DA em camundongos. O tratamento tópico de camundongos com filme carregado com Gel-Alg ($p < 0,0001$), Gel-Alg/SeTal ($p < 0,0001$), Gel-Alg/SeTal/Hc ($p < 0,0001$) e Gel-Alg/SeTal/VitC ($p < 0,0001$) reduziu a gravidade da lesão cutânea induzida por DNCB, o comportamento de arranhões e o espessamento das costas. Os filmes Gel-Alg/SeTal, Gel-Alg/SeTal/Hc e Gel-Alg/SeTal/VitC também melhoraram significativamente os parâmetros clínicos e comportamentais em comparação com aqueles detectados com o creme HC. A estimulação induzida pelo DNCB resultou em respostas alérgicas típicas, incluindo prurido, eritema, espessamento cutâneo, edema, escoriação e descamação típicas da DA, e os filmes melhoraram esses sintomas e prurido em camundongos.

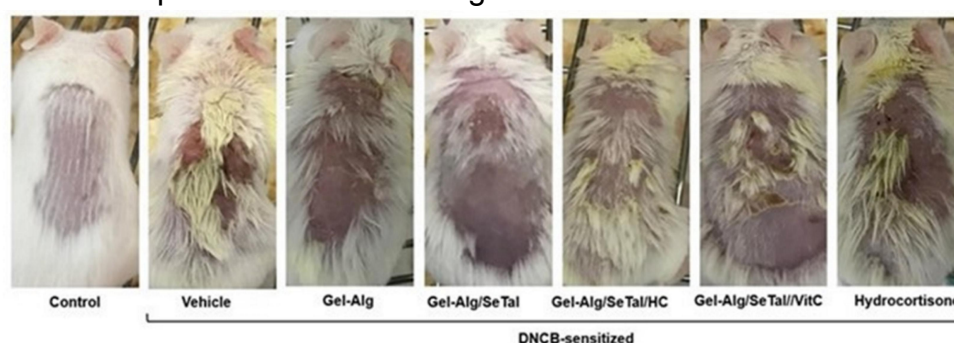


Figura 2. Imagem da pele dorsal dos camundongos após 30 dias de tratamento tópico com os filmes e HC.

4. CONCLUSÃO

Os filmes biopoliméricos de Gel e Alg foram preparados e carregados com diferentes compostos (SeTal, HC e/ou VitC) para serem utilizados como biomateriais no tratamento e atenuação de sintomas de DA em camundongos. As análises de caracterização confirmaram a presença dos compostos nas matrizes do filme. Uma série de estudos *in vivo* mostrou que filmes carregados com SeTal, HC e/ou VitC têm efeitos benéficos sobre múltiplos parâmetros usados para avaliar a DA em um modelo induzido por DNCB em camundongos. Esses filmes foram mais eficientes no tratamento ou atenuação de parâmetros-chave da doença em comparação com o controle positivo (HC creme). Portanto, a incorporação de SeTal com HC e/ou VitC em um filme de biopolímero de Gel-Alg parece ser uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento a longo prazo da DA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WEIDINGER, S.; NOVAK, N. Atopic dermatitis. **The Lancet**, v. 387, p. 1109, 2016.
- AXON, E.; CHALMERS, J. R.; SANTER, M.; RIDD, M. J.; LAWTON, S.; LANGAN, S. M.; GRINDLAY, D. J.; MULLER, I.; ROBERTS, A.; AHMED, A.; WILLIAMS, H.; THOMAS, K. S. Safety of topical corticosteroids in atopic eczema: an umbrella review. **BMJ OPEN**, v. 11, p. e046476, 2021.
- VOSS, G. T.; DE OLIVEIRA, R. L.; DAVIES, M. J.; DOMINGUES, W. B.; CAMPOS, V. F.; SOARES, M. P.; LUCHESE, C. L.; SCHIESSER, C. H.; WILHELM, E. A. Suppressive effect of 1,4-anhydro-4-seleno-D-talitol (SeTal) on atopic dermatitis-like skin lesions in mice through regulation of inflammatory mediators. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 114, p. 111074, 2020.
- AHMADY, A.; SAMAH, N. H. A. A review: Gelatine as a bioadhesive material for medical and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 608, p. 121037, 2021.