

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BETHANIA DIAS BARBOSA

TRATAMENTO DE LESÕES SEMELHANTES A DERMATITE ATÓPICA EM
FORMULAÇÕES CONTENDO CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE VALERATO DE
BETAMETASONA E ALFA-TOCOFEROL EM NANOCARREADORES LIPÍDICOS.

UBERLÂNDIA

2023

BETHANIA DIAS BARBOSA

TRATAMENTO DE LESÕES SEMELHANTES A DERMATITE ATÓPICA EM
FORMULAÇÕES CONTENDO CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE VALERATO DE
BETAMETASONA E ALFA-TOCOFEROL EM NANOCARREADORES LIPÍDICOS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biologia da
Universidade Federal de Uberlândia

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Coorientador: Hellen Dayane Silva Borges

UBERLÂNDIA

2023

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α - Alfa

A-t - Alfa-tocoferol

ANOVA - Análise variância

CS - Corticosteroides

DA - Dermatite Atópica

DNCB - Dinitroclorobenzeno

H & E - Hematoxilina & Eosina

mm - Milímetros

NLCs - Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

REBIR-UFU- Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia

Vb - Valerato de betametasona

μ L - Microlitros

μ m - Micrômetros

NPs - Nanopartículas poliméricas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental do protocolo de indução de Dermatite Atópica em camundongos e tratamento tópico com formulações. -----13

Figura 2. Lesões tipo Dermatite Atópica induzidas com Dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos tratados com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa-tocoferol em nanocarreadores. Camundongos tratados com NLC Vb 0,12%, NLC Vb 0,1%, NLC Vb 0,08%, NLC Vb 0,06%, NLC α 0,5%, NLC α 0,25% e NLC α 0,1%. -----16

Figura 3. Espessura da orelha em camundongos tratados com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa- tocoferol em nanocarreadores no dia 24 do experimento. Os valores de p foram considerados significativos quando * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001. -----17

Figura 4. Score para eritema, edema, escoriação e descamação em orelha de camundongos tratados com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa- tocoferol em nanocarreadores no dia 24 de experimentação. Os valores de p foram considerados significativos quando * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001. -----18

Figura 5. Score clínico total em orelha de camundongos tratados com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa-tocoferol em nanocarreadores. Os valores de p foram considerados significativos quando * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001. -----19

Figura 6. Histopatologia das lesões semelhantes à Dermatite Atópica induzida por DNBCB e tratada com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa- tocoferol em nanocarreadores. -----20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos grupos de tratamento -----	12
Tabela 2. Avaliação dos <i>Scores/ Pontuações</i> dos sinais clínicos de Dermatite Atópica -----	14

RESUMO

A Dermatite Atópica (DA), também conhecida como Eczema Atópico, é uma doença inflamatória crônica da pele, caracterizada por prurido intenso e lesões eczematosas frequentes, que afeta tanto adultos como crianças. Atualmente o tratamento para DA inclui corticosteroides (CS), inibidores de calcineurinas e anti-histamínicos que possuem efeitos colaterais como por exemplo o afinamento da pele e alteração de pigmentação causados pelo uso prolongado de CS tópicos. Terapia com nanotecnologia e o uso de Vitamina E têm sido aplicadas como opção terapêutica e mostraram-se promissoras para o tratamento da DA. Estudos realizados pelo nosso grupo têm demonstrado que o tratamento realizado com a combinação de Valerato de betametasona (Vb) e Alfa-tocoferol (A-t) em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLCs), diminui o *Score* da DA. O presente estudo avaliou o efeito do uso de reduzidas concentrações de Vb ou A-t em NLCs em lesões semelhantes a DA, induzidas por Dinitroclorobenzeno. O emprego NLC Vb em concentrações reduzidas melhorou a gravidade da doença e diminuiu a espessura da lesão. Contudo, não houve melhora nos aspectos clínicos das lesões semelhantes à DA nos animais tratados somente com NLC A-t. Pode-se concluir que, a utilização de nanocarreadores pode ser fundamental para reduzir a concentração de drogas utilizadas no tratamento de DA, para diminuir significativamente os riscos de efeitos colaterais, especialmente aqueles relacionados com o uso prolongado de esteroides tópicos.

Palavras-chave: Dermatite Atópica, Vitamina E, Valerato de betametasona, Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.

ABSTRACT

Atopic Dermatitis (AD), also known as Atopic Eczema, is a chronic inflammatory skin disease, characterized by intense itching and frequent eczematous lesions, and affects both adults and children. Currently the treatment for AD includes corticosteroids (CS), calcineurin inhibitors and antihistamines that have side effects such as skin thinning and pigmentation changes caused by prolonged use of CS. Nanotechnology therapy and the use of Vitamin E have been applied as a therapeutic option and have shown promise for the treatment of AD. Studies carried out by our group demonstrate that the treatment performed with the combination of Betamethasone Valerate (Bv) and Alpha-tocopherol (A-t) in Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) improves the clinical score of AD. The present study evaluated the effects of reducing the concentration of Bv or A-t in NLCs for treating lesions similar to AD, induced by Dinitrochlorobenzene. The use of NLC Bv in reduced concentration of Bv improved disease severity and decreased lesion thickness. However, there was no improvement in the clinical aspects of AD-like lesions in the A-t treated animals. It can be concluded that the use of nanocarriers may be fundamental to reduce the concentration of drugs used in the treatment of AD for, reducing significantly the risks of side effects, especially those related to the prolonged use of topical steroids.

Keywords: Atopic Dermatitis, Vitamin E, Betamethasone Valerate, Nanostructured Lipid Carriers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. HIPÓTESES	10
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivos Gerais	10
3.2. Objetivos Específicos.....	11
4. JUSTIFICATIVA.....	11
5. MATERIAIS E MÉTODOS	11
5.1. Animais.....	11
5.2. Modelo experimental e protocolo de tratamento.....	12
5.3. Score de dermatite atópica	13
5.4. Tratamento	14
5.5 Coleta das amostras	14
5.6 Análise histopatológica	15
5.7. Análise estatística	15
6. RESULTADOS	15
6.1. Análise Clínica	15
6.2. Análise Histológica.....	19
7. DISCUSSÃO	20
8. CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

A Dermatite Atópica (DA), também conhecida como Eczema Atópico, é uma doença inflamatória crônica da pele, desencadeada por uma resposta imune a alérgenos ou substâncias irritantes. É caracterizada por prurido intenso e lesões eczematosas frequentes, além de ser considerada uma doença multifatorial que envolve predisposição genética (presença de pais ou irmãos com DA), fatores ambientais (estilos de vida que das cidades do ocidente que contribuem para maior intensidade de respostas alérgicas), exposição a alérgenos, poluentes, dentre outros. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOLOGIA; RUZICKA et al, 2017; WEIDNGER; NOVAK, 2016). Outros sintomas incluem pele seca, fissurada ou escamosa e manchas vermelhas ou acastanhadas (NUTTEN, 2015).

A DA afeta adultos (1-3%) e crianças (15 a 20%) e em 60% dos casos a doença se manifesta no primeiro ano de vida, mas pode persistir na fase adulta (NUTTEN, 2015; WEIDNGER; NOVAK, 2016). A DA afeta a qualidade de vida dos indivíduos em vários aspectos como o social, familiar, econômico e psicológico, tornando-se um problema mundial de saúde devido ao alto custo à saúde e à qualidade de vida dos pacientes (ABUABARA et al, 2018; TORRES et al, 2019).

Atualmente, o tratamento farmacológico para DA corresponde a 59,95% de corticosteroides, 27,2% de inibidores de calcineurinas, e 5,1% de anti-histamínicos e outros tratamentos (ALEXANDER et al, 2018; SOBRAL et al, 2011). No entanto, o uso prolongado de corticosteroides e inibidores de calcineurina possuem efeitos colaterais como atrofia cutânea, estrias, púrpura e erupção acneiforme (LIMA, 2016). O uso dos corticosteroides (CS), constitui opção terapêutica de primeira linha em pacientes com DA por serem eficientes na redução da inflamação ativa e na profilaxia da doença, uma vez que, os CS que exercem efeitos terapêuticos ao inibir a transcrição de vários mediadores inflamatórios (citocinas e moléculas de adesão) (TANEI, 2020).

A Vitamina E é o nome dado para tocoferóis e tocotrienóis e possui efeito antioxidante e anti-inflamatório (TEO et al, 2021). Eles se diferenciam pela saturação das cadeias laterais e cada uma das variedades possui quatro homólogos (α , β , γ , δ) (SHUN et al, 2004). A suplementação com tocotrienóis reduziu o prurido, espessamento dérmico e níveis de histamina em camundongos com lesões semelhantes a DA (TSUDKI et al, 2013). Em cães esta suplementação melhorou os escores clínicos quanto ao índice de extensão e gravidade da DA canina (PLEVNIK,

2014). Estudos mostram que a suplementação oral de Vitamina E melhora o quadro clínico de pacientes com DA, o qual reduziu 62% dos níveis de IgE sérico, diminuiu o prurido e a extensão da lesão, sugerindo que este é um potencial tratamento para DA (JAFFARY et al, 2015; TSOURELEI-NIKITA et al, 2002). A aplicação tópica é um modo promissor de administração de tocoferóis, uma vez que, não é invasivo e, evita absorção pelo trato gastrointestinal (HARUN; WONG; FONG, 2020).

Terapia com nanotecnologia (incluindo nanocarreadores e nanopartículas) tem sido aplicado como opção terapêutica e mostraram-se promissoras para o tratamento da DA, pois permitem a melhor administração da dosagem, direcionamento ao local da inflamação, difusão da droga, bem como a melhora nos sintomas clínicos e imunológicos (DAMIANI et al, 2019). Estudo com nanopartículas poliméricas (NPs) carregadas com hidrocortisona e hidroxitrisol mostrou que a atuação de NPs foi efetiva na diminuição da gravidade de lesões de DA em camundongos (HUSSAIN et al, 2014). O uso de nanoformulações com Vitamina E aumentou a eficácia da entrega e retenção na pele (MANIAM et al, 2018).

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLCs) são nanopartículas coloidais preparados com micelas poliméricas. Possuem características que ajudam a evitar o vazamento da carga da droga, dessa forma, fornecem maior carga útil do medicamento, podem ser carregados com drogas hidrossolúveis ou hidrofóbicas. Os NLCs são compostos por material biodegradável, apresentam baixa toxicidade, possuem propriedades físicas e químicas estáveis, capacidade de proteger a carga em seu interior e possibilidade de modular a liberação de medicamento (IQBAL et al, 2012; LI et al, 2017). Quando comparado com um creme tradicional, um preparado de NLC demonstrou maior eficiência na absorção trans dérmica do fármaco, com maior eficiência na pele (HANNA; GHORAB; GAD, 2019). Um estudo com uso oral de NLCs em ratos mostrou que os NLCs produziram melhora significativa na biodisponibilidade da droga em comparação com a solução livre (CHEN et al, 2009). KONG et al (2016), mostraram que o uso tópico de pomada preparada com NLC em camundongos, apresenta retenção desejável da droga na pele e não teve irritação na pele de coelhos.

Estudos realizados pelo Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica (LALIC) da Universidade Federal de Uberlândia (dados ainda não publicados), utilizou a combinação de NLCs com Valerato de betametasona e/ ou Alfa-tocoferol no tratamento de lesões semelhantes a DA. Esse estudo mostrou que, o melhor

tratamento ocorreu com a utilização Valerato de betametasona em NLCs. Também teve melhora nas lesões o tratamento combinado de NLCs, Valerato de betametasona e Alfa- tocoferol, no entanto, o uso apenas de Vitamina E no nanocarreador teve ação inflamatória.

Com base nos resultados obtidos pelo estudo realizado por outros membros da equipe do LALIC e visando diminuir os efeitos colaterais existentes no uso contínuo de esteroides tópicos, utilizar concentrações reduzidas dos medicamentos Valerato de Betametasona e Alfa- tocoferol pode ajudar a reduzir os riscos de efeitos colaterais. A associação do tratamento com anti-inflamatórios em carreadores lipídicos nanoestruturados poderá aumentar a eficácia da entrega das drogas.

2. HIPÓTESES

Em relação à análise clínica, histopatológica, resposta de infiltrados celulares das lesões induzida por Dinitroclorobenzeno e tratados com Valerato de betametasona ou Alfa-tocoferol em carreadores lipídicos nanoestruturados em camundongos, podemos observar as seguintes hipóteses:

H0: O Dinitroclorobenzeno induzirá lesões compatíveis com a Dermatite Atópica em camundongos. Após a aplicação tópica de Valerato de betametasona ou Alfa-tocoferol em carreadores lipídicos nanoestruturados não irá melhorar as lesões.

H1: O Dinitroclorobenzeno induzirá lesões compatíveis com a Dermatite Atópica em camundongos. Após a aplicação tópica de Valerato de betametasona ou Alfa-tocoferol em carreadores lipídicos nanoestruturados irá melhorar as lesões.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Realizar análise clínica e histopatológica da resposta inflamatória *in vivo* das lesões de dermatite atópica, em camundongos, induzidas por Dinitroclorobenzeno

(DNCB) e tratadas com formulações contendo concentrações reduzidas de Valerato de betametasona e Alfa-tocoferol em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs).

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Analisar os parâmetros clínicos e histopatológicos de lesões tipo DA induzidas por DNCB em camundongos tratados com doses reduzidas de Valerato de betametasona (0,1%, 0,08% e 0,06%) em NLCs;

3.2.2 Analisar os parâmetros clínicos e histopatológicos de lesões tipo DA induzidas por DNCB em camundongos tratados com doses reduzidas de Alfa-tocoferol (0,25% e 0,1%) em NLCs.

4. JUSTIFICATIVA

A redução da concentração do Valerato de betametasona pode ser importante para diminuir os riscos de efeitos adversos decorrentes do uso contínuo de corticosteroides tópicos no tratamento de Dermatite Atópica, tais como irritação e afinamento da pele. Além disso, poderá ser uma opção importante para uso em áreas sensíveis (pálpebras, rosto e virilha). A utilização de Alfa-tocoferol em menores concentrações tem grande potencial adjuvante no tratamento da Dermatite Atópica devido aos efeitos antioxidante e anti-inflamatório. A utilização de tratamentos com carreadores lipídicos nanoestruturados poderá aumentar a eficácia da liberação dos fármacos diretamente no local da lesão e fazer com que o medicamento atue apenas na área de interesse.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Camundongos fêmeas da linhagem Balb/c foram obtidos na Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU), com idade de 3- 6 semanas de

vida. Foram mantidos em gaiolas, em ambiente de temperatura controlada e ciclo de 12 horas de claro e escuro, até completarem a idade de experimentação (8 semanas de vida). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob protocolo número: 029/18.

5.2. Modelo experimental e protocolo de tratamento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos com n= 8 animais, conforme mostrado na Tabela 1: Grupo Branco, que não teve indução da DA e nem tratamento com as formulações (Branco); Grupo Controle positivo que recebeu apenas a indução da DA sem tratamento com as formulações (DNCB); Grupo Valerato de betametasona, com a concentração original de 0,12% em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC Vb 0,12%); Grupo tratamento com a formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados com o Valerato de betametasona a 0,1% (NLC Vb 0,1%); Grupo tratamento com a formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados com o Valerato de betametasona a 0,08% (NLC Vb 0,08%); Grupo tratamento com a formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados com Valerato de betametasona a 0,06% (NLC Vb 0,06%); Grupo Vitamina E com a concentração original de 0,5% em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC α 0,5%); Grupo tratamento com a formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados com Vitamina E a 0,25% (NLC α 0,25%) e o Grupo tratamento com a formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados com Vitamina E a 0,10% (NLC α 0,1%).

Tabela 1. Descrição dos grupos de tratamento

Grupo	Tratamento	Sensibilização	Desafio
Branco	-	Não	Não
DNCB	-	Sim	Não
NLC Vb 0,12%	Valerato de betametasona a 0,12%	Sim	Sim
NLC Vb 0,1%	Valerato de betametasona a 0,1%	Sim	Sim
NLC Vb 0,08%	Valerato de betametasona a 0,08%	Sim	Sim
NLC Vb 0,06%	Valerato de betametasona a 0,06%	Sim	Sim
NLC α 0,5%	Vitamina E a 0,5%	Sim	Sim
NLC α 0,25%	Vitamina E a 0,25%	Sim	Sim
NLC α 0,1%	Vitamina E a 0,1%	Sim	Sim

Para a indução da lesão semelhante à Dermatite Atópica foi utilizado o composto Dinitroclorobenzeno (DNCB) a 0,5%. Foram sensibilizados 56 animais, divididos aleatoriamente em 9 grupos de 8 animais nos dias 1, 2 e 3 do experimento com 40µl de DNCB a 0,50%. O grupo Branco não foi sensibilizado (grupo controle negativo).

O desafio e o tratamento com as formulações foram realizados na orelha direita e ocorreu nos dias 14, 16, 18, 20, 22 e 24 de experimentação, nos quais foi realizado o desafio com 20µl de DNCB a 0,5% no período da manhã, e após 6 horas foi feito o tratamento com as formulações. Nos dias 1, 3, 16, 20 e 24 de experimentação foram avaliados clinicamente e atribuídos o Score de dermatite atópica. Nos demais dias os animais não foram manipulados. A eutanásia foi realizada no dia 25. O protocolo do desenho experimental encontra-se esquematizado na figura 1.



Figura 1. Desenho experimental do protocolo de indução de Dermatite Atópica em camundongos e tratamento tópico com formulações.

5.3. Score de dermatite atópica

Para avaliação do Score de Dermatite Atópica foram usados os seguintes parâmetros: Peso do animal, Espessura da Orelha, Eritema (hemorragia), Edema, Escoriação (Erosão) e Descamação (secura). A Espessura da Orelha dos animais foi medida utilizando um paquímetro. O Eritema, Escoriação e Descamação foram avaliados por pontuação de 0 a 3, na qual 0 indica ausência, 1 indica presença leve, 2 presença moderada e 3 presenças grave das respectivas lesões. Para o Edema a avaliação foi feita utilizando a espessura da orelha da seguinte forma: pontuação de 0 para espessura menor que 0,23mm, pontuação de 1 para espessura de 0,23mm a 0,25mm, pontuação 2 para espessura de 0,26mm a 0,34mm e pontuação de 3 para

espessura igual ou superior a 0,35 mm. O *Score* total da DA foi realizado pela somatória dos parâmetros anteriormente descritos, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação dos *Scores*/ Pontuações dos sinais clínicos de Dermatite Atópica

Sinais Clínicos	Score			
	0	1	2	3
Eritema/ Escoriação/ Descamação	Ausência de sintomas	Presença Leve	Presença Moderada	Presença Grave
Edema	< 0,23 mm	0,23 mm a 0,25 mm	0,26 mm a 0,34 mm	> 0,34 mm

5.4. Tratamento

No protocolo para o tratamento da DA, foram utilizadas três concentrações diferentes da formulação NLC Vb (0,1%, 0,08% e 0,06%) e duas concentrações de NLC α . (0,1% e 0,25%). Inicialmente as pomadas NLC Vb e NLC α estavam concentradas a 0,12% e 0,5% respectivamente. Para reduzir a concentração das formulações foi feita a diluição com gel diluidor utilizado para o preparo das pomadas originais. O tratamento foi realizado com aplicação tópica das formulações nas orelhas desafiadas. As pomadas originais foram desenvolvidas para estudo realizado por outros membros da equipe do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia (dados ainda não publicados e em processo de patente).

5.5 Coleta das amostras

Todos os animais dos grupos foram eutanasiados no dia 25 de experimentação. Nesse dia, foi realizada a coleta das orelhas para as análises histopatológicas. Para a retirada da orelha, o corpo do animal foi estirado em uma bancada exclusiva da sala cirúrgica do biotério, após antisepsia com álcool 70%. Os cortes foram realizados com tesoura apropriada e pinça anatômica para manusear os tecidos. As orelhas

direitas foram cortadas e divididas de forma longitudinal (ápice até a base da orelha) em duas partes iguais: a primeira parte das orelhas foi processada em homogeneizador rotativo para homogeneização dos tecidos, que logo foram submetidas à uma centrifugação a 1700 g e 23 °C, e o sobrenadante foi coletado e imediatamente armazenado a -80 °C para testes sorológicos futuros. A segunda parte das orelhas foi fixada em formaldeído a 4% por 24 horas para o processamento histológico.

5.6 Análise histopatológica

Após a coleta, as orelhas foram fixadas em parafina para confecção de blocos histológicos, os quais foram cortados no micrótomo (Leica) em finas camadas com 5 µm de espessura. Estes cortes foram “pescados” com lâmina de microscopia identificada com os nomes dos grupos e depois colocadas em uma estufa a 37 °C para secagem durante 24 horas. Após esse processo, foi realizada coloração de Hematoxilina & Eosina (H & E).

5.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com teste One way ANOVA, utilizando o software GraphPad Prisma versão 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Todos os resultados foram considerados significativos a um nível de significância de $p < 0,05$. Os valores de p significativos são representados nas figuras como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

6. RESULTADOS

6.1. Análise Clínica

O emprego de Valerato de betametasona e Alfa-tocoferol em concentrações reduzidas em nanocarreadores, melhoraram os aspectos clínicos da lesão semelhante à Dermatite Atópica conforme ilustrados na figura 2. A análise clínica foi

significativamente melhor em camundongos tratados com NLC Vb 0,06% e NLC α 0,25%.

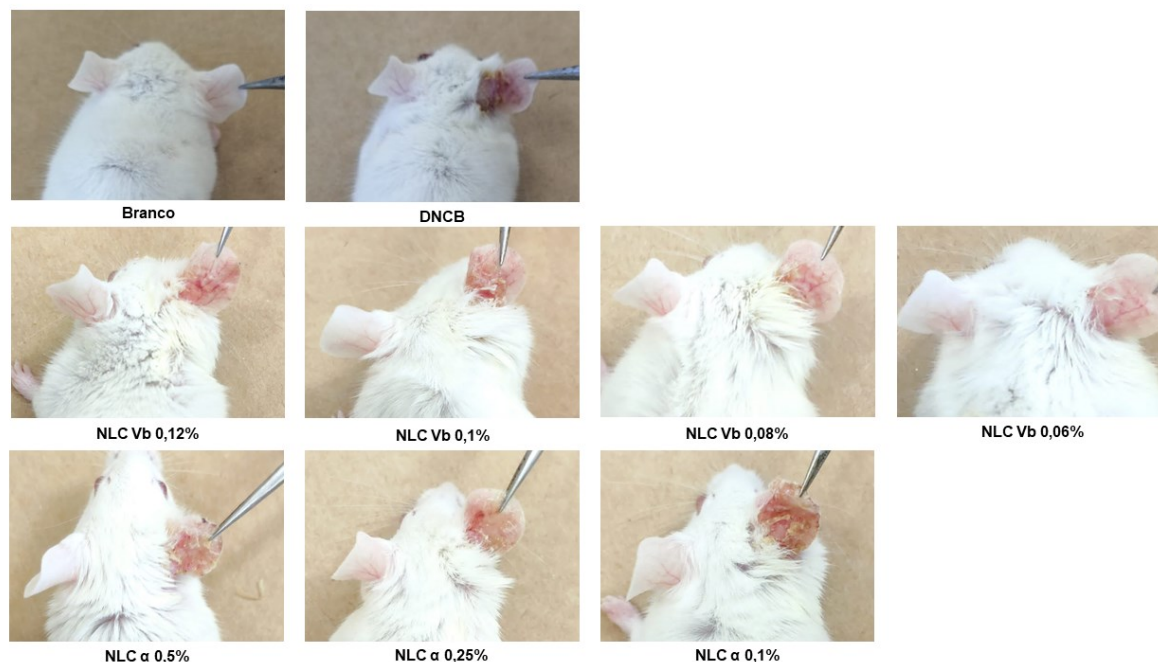


Figura 2. Lesões tipo Dermatite Atópica induzidas com Dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos tratados com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa-tocoferol em nanocarreadores. Camundongos tratados com NLC Vb 0,12%, NLC Vb 0,1%, NLC Vb 0,08%, NLC Vb 0,06%, NLC α 0,5%, NLC α 0,25% e NLC α 0,1%.

A análise da espessura das orelhas mostrou uma melhora nos animais tratados com as formulações de Valerato de betametasona e em nanocarreadores (Figura 3). A espessura das orelhas dos animais melhorou em todos os grupos tratados com a concentração reduzida de Valerato de betametasona (NLC Vb 0,1% $p < 0,01$; NLC Vb 0,08% $p < 0,001$; NLC Vb 0,06% $p < 0,0001$). Não houve melhora nas formulações de NLC α em todas as concentrações utilizadas.

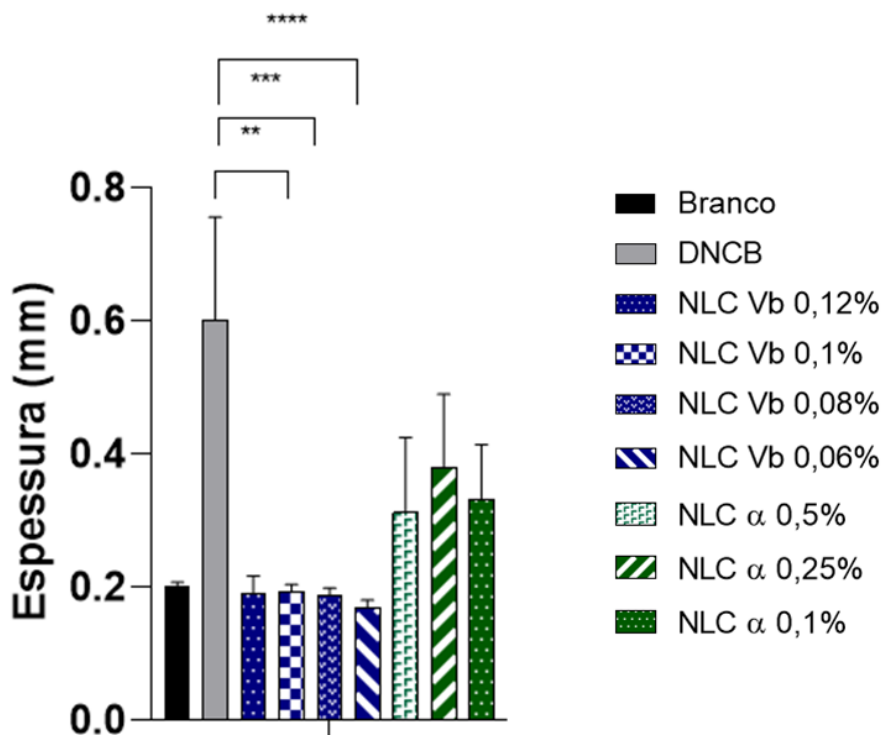


Figura 3. Espessura da orelha em camundongos tratados com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa-tocoferol em nanocarreadores no dia 24 do experimento. Os valores de p foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

A figura 4 mostra a análise da pontuação dos *Scores* das lesões em orelhas nos animais tratados com as formulações de Valerato de betametasona e Alfa-tocoferol em nanocarreadores. O eritema das orelhas dos animais melhorou nos grupos com a redução da concentração do medicamento quando comparados com o grupo NLC Vb 0,12%, tendo maior redução nos animais tratados com NLC Vb 0,08% ($p < 0,0001$) e NLC Vb 0,06% ($p < 0,01$). Já os grupos tratados com NLC α não teve diferença estatística entre os grupos e o controle.

Nos animais tratados com NLC Vb em concentrações menores a espessura das orelhas dos animais foi inferior a 0,23mm, e, portanto, o *Score* para o edema foi de 0 (zero). Além disso, houve ausência de sintomas na avaliação da escoriação desses animais. Não houve melhora no edema dos camundongos tratados com a redução da concentração de Alfa-tocoferol. A análise da pontuação mostrou que a escoriação nos animais tratados com Alfa-tocoferol no dia 24 foi significativamente menor nos animais do grupo NLC α 0,1% ($p < 0,01$).

No dia 24 a descamação foi reduzida nos grupos tratados com NLC Vb 0,1% ($p < 0,1$), NLC Vb 0,08% ($p < 0,01$) e NLC Vb 0,06% ($p < 0,001$), quando comparados com o grupo DNCB. Não houve melhora na descamação dos grupos tratados com NLC α .

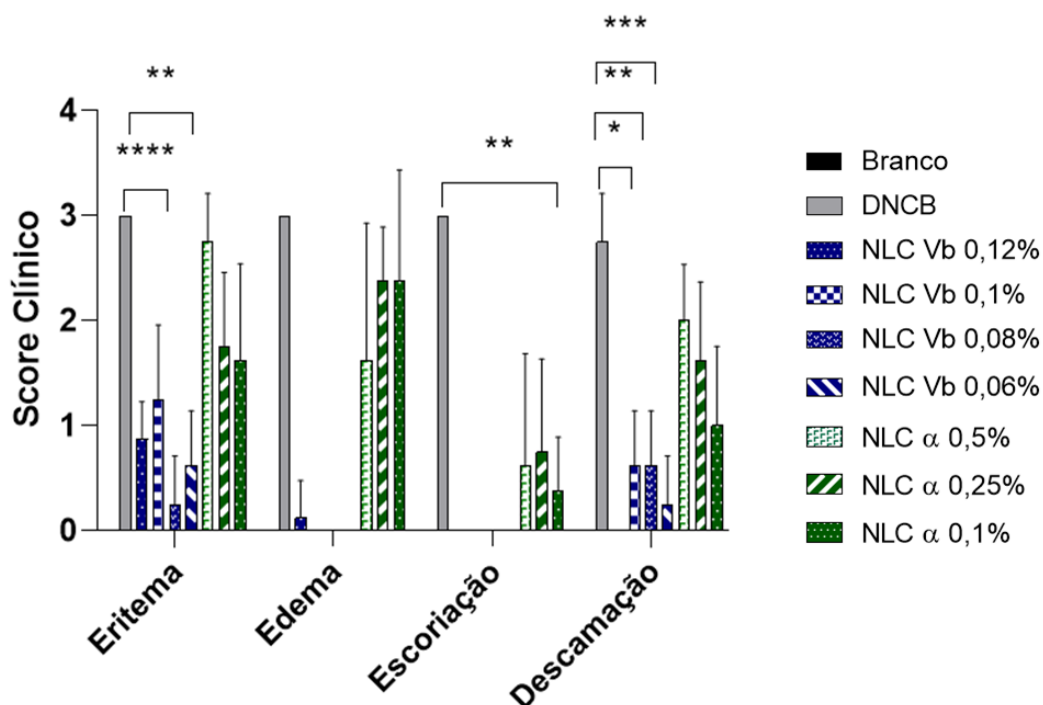


Figura 4. Scores para eritema, edema, escoriação e descamação em orelha de camundongos tratados com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa-tocoferol em nanocarreadores no dia 24 de experimentação. Os valores de p foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

A análise da pontuação do *Score* total das orelhas mostrou uma melhora nos animais tratados com as formulações de Valerato de betametasona e em nanocarreadores (Figura 5). O *Score* das orelhas dos animais melhorou nos grupos com a redução da concentração do Vb quando comparados com os grupos DNCB, tendo maior redução nos animais tratados com NLC Vb 0,08% e NLC Vb 0,06% ($p < 0,001$). A pontuação do *Score* total das orelhas dos animais dos grupos NLC α 0,25% e NLC α 0,01% não mostra redução.

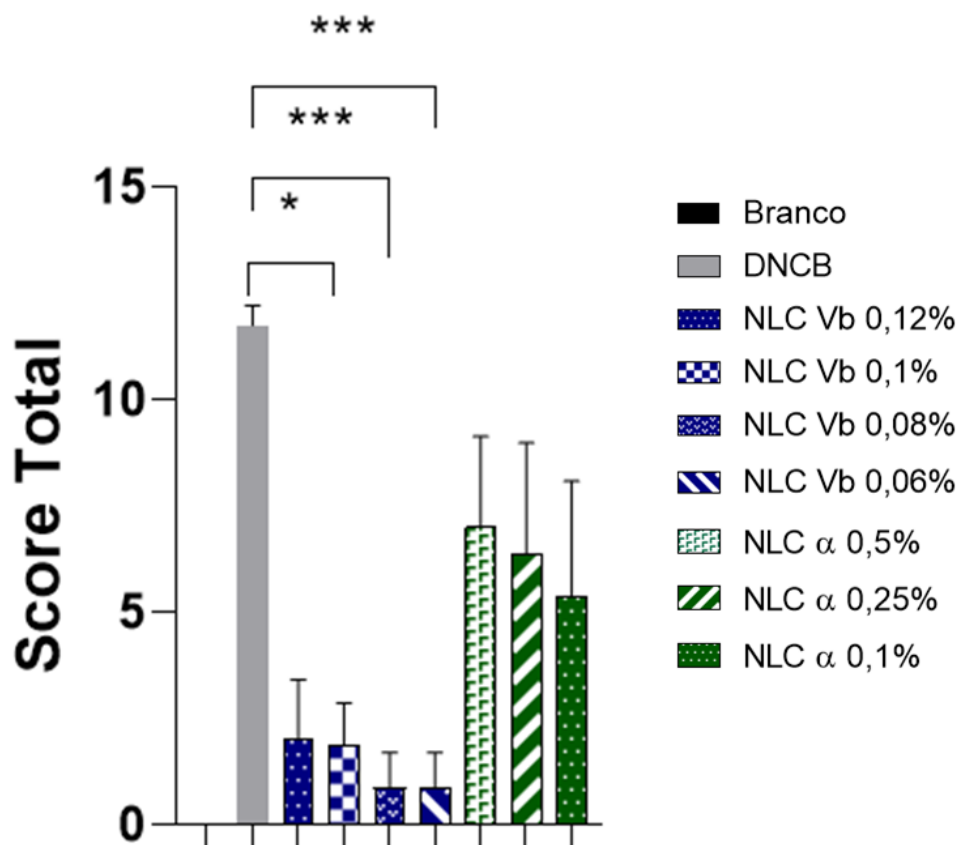


Figura 5. Score clínico total em orelha de camundongos tratados com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa-tocoferol em nanocarreadores. Os valores de p foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

6.2. Análise Histológica

Cortes histopatológicos das orelhas corados com Hematoxilina & Eosina mostraram um espessamento epidérmico reduzido e poucos infiltrados de células inflamatórias (Figura 6). Nos animais tratados com NLC Vb 0,08% ou NLC Vb 0,06% observou-se um espessamento menor da camada epidérmica na seção histológica das lesões semelhantes à DA quando comparado ao grupo NLC Vb 0,1%, que evidencia uma camada espessa da epiderme. Quando comparados com o grupo NLC Vb 0,12% os animais tratados com concentrações reduzidas de Vb não houve redução no espessamento da camada epidérmica. Além disso, os animais tratados com NLC Vb 0,08% ou NLC Vb 0,06% tiveram redução de infiltrados inflamatórios quando comparados com NLC Vb 0,1%. No entanto, para os animais NLC α 0,25% e NLC α

0,1% houve maior hiperplasia epidérmica, espessura e infiltrados inflamatórios quando comparados com os animais tratados com NLC α 0,5%.

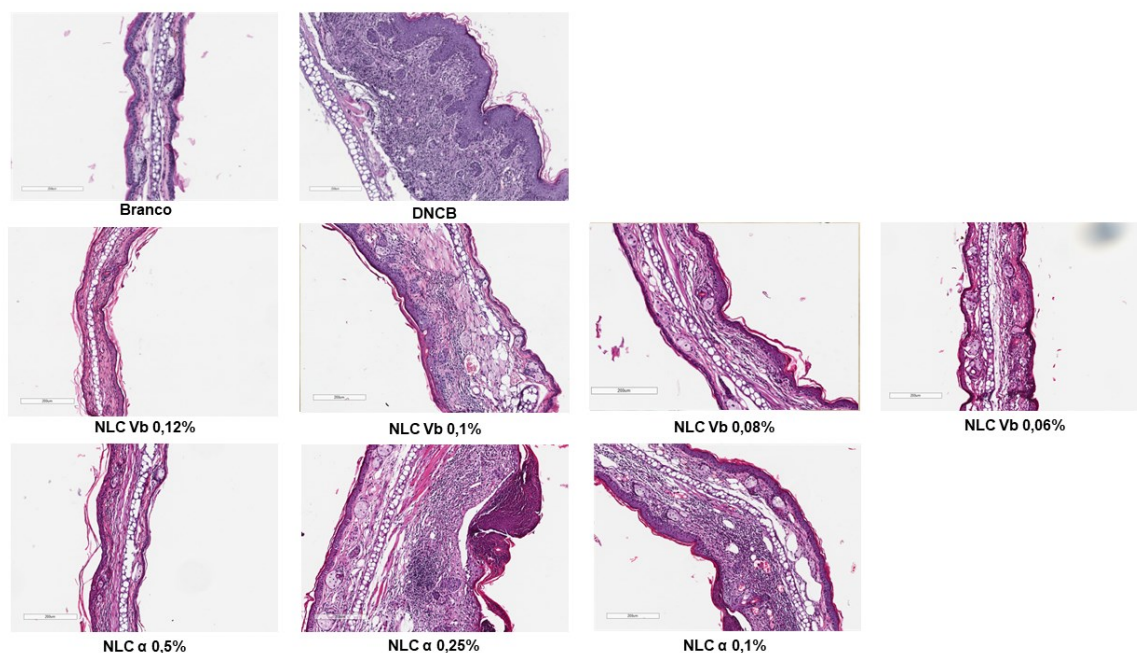


Figura 6. Histopatologia das lesões semelhantes à DA induzida por DNCB e tratadas com diferentes concentrações de Valerato de betametasona e Alfa- tocoferol em nanocarreadores.

7. DISCUSSÃO

A base dos tratamentos para a DA na maioria das vezes é o uso de esteroides tópicos. Entretanto, devido aos efeitos colaterais do uso de esteroides há uma grande preocupação por parte dos pais, o que provoca uma baixa adesão do tratamento em crianças. Além disso, o efeito de adelgaçar a pele limita a utilização em áreas sensíveis como pálpebras, face e virilha. Como segunda opção de tratamento existe o uso de inibidores tópicos de calcineurina, que, no entanto, não são livres de efeitos colaterais (atrofia cutânea, estrias, púrpura e erupção acneiforme) e provocam uma grande preocupação com a possível carcinogenicidade (SHAMS et al 2011). Neste estudo mostramos que a redução da metade da concentração de Valerato de betametasona de 0,12% para 0,08 e 0,06% melhorou a gravidade da doença e não teve o efeito de adelgaçamento da epiderme.

Nanopartículas poliméricas (NPs) são utilizadas como técnica não invasiva de entrega de agentes terapêuticos na pele, além de não serem prejudiciais para o estrato córneo. NPs combinados com formulações de cremes tópicos melhoraram a

gravidade da DA e reduziram a espessura da pele em camundongos com lesões semelhantes a DA (HUSSAIN et al, 2014). Nosso estudo atual mostrou que a utilização de concentrações reduzidas de Valerato de betametasona em NLCs teve capacidade de induzir melhora nas características clínicas da DA, reduzindo a descamação e o eritema e melhorando totalmente o edema (score 0).

Estudo realizado por Nagaich e Neha (2018) mostrou que NLCs carregados com Valerato de Betametasona possuem um perfil de penetração 2,59 vezes maior que o gel comercial de Valerato de betametasona. Neste contexto, com a redução da concentração de Valerato de betametasona os animais dos grupos NLC Vb 0,08% e NLC Vb 0,06% tiveram melhora na gravidade da doença e no nível dos Scores clínicos, bem como redução dos infiltrados inflamatórios. Acreditamos que esta melhora clínica e histopatológica das lesões tipo DA se deve ao potencial de entrega de droga do NLC. No entanto, em todos os grupos dos animais tratados somente com Vitamina E (NLC α 0,5%, NLC α 0,25% e NLC α 0,1%) não houveram melhora nos aspectos clínicos da lesão semelhante à DA. Esses dados vão contra o estudo realizado por Hayashi, D et al., (2012), que mostraram que o uso de Vitamina E melhora os índices bioquímicos associados às lesões de DA. Acreditamos que esse achado se deve ao fato de o NLC ter um perfil maior de entrega da droga, fazendo com que a Vitamina E seja entregue em grande quantidade ocasionando, dessa forma, um perfil mais inflamatório do que anti-inflamatório.

8. CONCLUSÃO

Após a análise de todos os resultados, é possível concluir que devido ao potencial de entrega de drogas em NLCs, o tratamento com redução da concentração do fármaco nos nanocarreadores promoveu melhora na gravidade das lesões semelhantes à Dermatite Atópica. Este estudo mostra que com a associação de nanocarreadores pode-se reduzir a quantidade de drogas utilizada no tratamento de Dermatite Atópica diminuindo os riscos de efeitos colaterais devido ao uso de esteroides. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esses achados em grupo amostral maior, com parâmetros laboratoriais adicionais, avaliando-se os efeitos colaterais do Valerato de betametasona e do Alfa-tocoferol, bem como planejar um estudo clínico placebo controlado em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUABARA, K. et al. The prevalence of atopic dermatitis beyond childhood: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **Allergy** v. 73, n. 3, p. 696–704, 2018.

ALEXANDER, T. et al. Prescriptions for atopic dermatitis: oral corticosteroids remain commonplace. **Journal of Dermatological Treatment** v. 29, n. 3, p. 238–240, 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOLOGIA (ASBAI). Guia Prático para o Manejo de Dermatite Atópica. **Revista Brasileira de Alergia e Imunologia**. [S.l.], 2006. 15 p.

CHEN, C.-C. et al. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 474–482, 2010.

DAMIANI, G. et al. Nanotechnology meets atopic dermatitis: Current solutions, challenges and future prospects. Insights and implications from a systematic review of the literature. **Bioactive Materials** v. 4, p. 380–386, 2019.

HANNA, P.; GHORAB, M. M.; GAD, S. Development of Betamethasone Dipropionate-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical and Transdermal Delivery. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 26–44, 31, 2019.

HARUN, M.; WONG, T; FONG, C. Advancing skin delivery of α -tocopherol and γ -tocotrienol for dermatitis treatment via nanotechnology and microwave technology. **International Journal of Pharmaceutics** v. 593, p. 120099–120099, 2021.

HAYASH, I D al. Vitamin E Improves Biochemical Indices Associated with Symptoms of Atopic Dermatitis-Like Inflammation in NC/Nga Mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 58, n. 3, p. 161–168, 2012.

HUSSAIN, Z. et al. Efficient Immuno-Modulation of TH1/TH2 Biomarkers in 2,4-Dinitrofluorobenzene-Induced Atopic Dermatitis: Nanocarrier-Mediated Transcutaneous Co-Delivery of Anti-Inflammatory and Antioxidant Drugs. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113143–e113143, 2014.

IQBAL, A. et al. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 10, p. 813–830, 2012.

JAFFARY, F et al. Effects of oral vitamin E on treatment of atopic dermatitis: A randomized controlled trial. **Journal of Research in Medical Sciences** v. 20, n. 11, p. 1053–1053, 2015.

KONG, X et al. Development of a topical ointment of betamethasone dipropionate loaded nanostructured lipid carrier. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 248–254, 2016.

LI, Q. et al. A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, v. 7, n. 6, p. 122–122, 2017.

LIMA, R. Corticosteroides tópicos no tratamento de dermatites. 2016. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de Rio Verde, 2016.

MANIAM et al. Challenges and Opportunities of Nanotechnology as Delivery Platform for Tocotrienols in Cancer Therapy. **The Frontiers**, v. 9, 2018.

NAGAICH, U; GULATI, N. Preclinical Assessment of Steroidal Nanostructured Lipid Carriers Based Gels for Atopic Dermatitis: Optimization and Product Development. **Current Drug Delivery**, v. 15, n. 5, p. 641–651, 2018.

NUTTEN, S. Atopic Dermatitis: Global Epidemiology and Risk Factors. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 66, n. Suppl. 1, p. 8–16, 2015.

PLEVNIK, A et al. Vitamin E supplementation in canine atopic dermatitis: improvement of clinical signs and effects on oxidative stress markers. **Veterinary Record** v. 175, n. 22, p. 560–560, 2014.

RUZICKA, T. et al. Anti–Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 9, p. 826–835, 2017.

SHAMS, K. et al. What's new in atopic eczema? An analysis of systematic reviews published in 2009-2010. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 36, n. 6, p. 573–578, 2011.

SHUN, C et al. Pro-apoptotic Mechanisms of Action of a Novel Vitamin E Analog (α -TEA) and a Naturally Occurring Form of Vitamin E (δ -Tocotrienol) in MDA-MB-435 Human Breast Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 48, n. 1, p. 95–105, 2004.

SOBRAL, A. et al. Seborrheic dermatitis **EDUCAÇÃO MÉDICA CONTINUADA. An Bras Dermatol**, v. 86, n. 6, p. 1061–74, 2011.

TANEI, R. Atopic Dermatitis in Older Adults: A Review of Treatment Options. **Drugs & Aging**, v. 37, n. 3, p. 149–160, 2020.

TEO, C. et al. Vitamin E in Atopic Dermatitis: From Preclinical to Clinical Studies. **Dermatology**, v. 237, n. 4, p. 553–564, 2021.

TORRES, T. et al. Update on Atopic Dermatitis. **Acta Médica Portuguesa**, v. 32, n. 9, p. 606–613, 2019.

TSUDUKI et al. Tocotrienol (Unsaturated Vitamin E) Suppresses Degranulation of Mast Cells and Reduces Allergic Dermatitis in Mice. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 10, p. 825–834, 2013.

TSOURELI-NIKITA, E et al. Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of the immunoglobulin E serum levels. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 3, p. 146–150, 2002.

WEIDINGER, S.; NOVAK, N. Atopic dermatitis. **The Lancet** , v. 387, n. 10023, p. 1109–1122, 2016.