

AValiação DA EFICÁCIA DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO NO MODELO ANIMAL DE CAMUNDONGOS RHINO

INTRODUÇÃO

O camundongo rhino é um mutante sem pêlo que carrega o gene *rh*, um alelo recessivo para o gene sem pêlo (HOWARD, 1940). Após 4 semanas de vida, a camada de pêlo nos animais recém-nascidos é perdida irreversivelmente, estando associada com a formação dos pseudocomedões, denominados utrículos (DAVIES, 1971; MANN, 1971). Os utrículos originam-se na parte superior da unidade folicular original e são preenchidos com corneócitos e sebo. Após 7 a 8 semanas, esses folículos sebáceos são progressivamente distendidos pela produção e acúmulo do excesso de material da camada córnea, sendo histologicamente semelhantes às lesões acnéicas humanas, tais como os microcomedões (BERNERD *et al.*, 1991a, b; HAYASHI *et al.*, 2006). Assim, os camundongos rhino são extensivamente utilizados como um modelo *in vivo* para a avaliação da ação comedolítica de novos fármacos para o tratamento da acne (ALLEC *et al.*, 1997; ASHTON *et al.*, 1984; BERNERD *et al.*, 1991a,b; HAYASHI *et al.*, 2006; SAKUTA e KANAYAMA, 2005).

Devido ao efeito comedolítico, observado através da redução do número, tamanho e diâmetro dos utrículos, os retinóides constituem os fármacos mais estudados para o tratamento da acne (BERNERD *et al.*, 1991a, b; MEZICK *et al.*, 1984; ZHENG *et al.*, 1993). Ao final do tratamento, em um intervalo que varia do final da aplicação até 72 horas após o término, os animais são sacrificados e as biópsias da pele tratada são avaliadas histologicamente (FORT-LACOSTE *et al.*, 1999; GONZÁLEZ *et al.*, 2000; SAKUTA e KANAYAMA, 2005).

Dentre os retinóides estudados para o tratamento da acne, o ácido retinóico (AR) tem posição de destaque. Porém, a irritação cutânea proveniente da sua utilização, incluindo eritema, queimação e descamação, tem limitado seu uso (ELLIS *et al.*, 1998; WEBSTER, 1998). Uma das formas de minimizar a irritação desse fármaco é a sua encapsulação em sistemas micro e nanoparticulados, como as nanopartículas lipídicas sódicas (NLS). A encapsulação do AR nas NLS, além de melhorar a estabilidade do fármaco, apresenta um potencial para liberação

controlada e direcionamento folicular (LIU *et al.*, 2007; MÜNSTER *et al.*, 2005). Outra vantagem do sistema nanoparticulado é que ele torna o grupamento ácido do AR menos disponível, minimizando seu potencial de irritação (MANDAWAGADE; PATRAVALE, 2008).

Dessa forma, com o intuito de avaliar a eficácia das NLS contendo AR, em comparação com uma formulação comercial, o presente estudo foi conduzido utilizando camundongos rhino como modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Materiais

O AR foi fornecido pela Basf (Ludwigshafen, Alemanha). O álcool cetílico (1-hexadecanol) etoxilado com 20 moles de óxido de etileno (HLB = 15,7, Brij 58) e a estearilamina (octadecilamina, STE) foram obtidos da Sigma/Fluka Chemical Co. (St. Louis, EUA). O Compritol 888 ATO [behenato de glicerila, mistura de mono, di e triglicerídeos do ácido behênico] foi fornecido pela Gattefossé (Saint Priest, França). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2 Métodos

2.1 Preparação e caracterização das NLS

As NLS contendo 0,01% e 0,05% de AR foram preparadas pelo método da homogeneização a quente, conforme descrito no Tópico 2.2 do Capítulo 1. Após a preparação e caracterização, a suspensão das NLS foi gelificada com 0,8% de hidroxietilcelulose, um agente gelificante não iônico. A formulação gelificada foi então acondicionada em frascos de vidro âmbar. As formulações foram preparadas, no máximo, uma semana antes do início do tratamento.

O diâmetro médio das NLS na dispersão foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons utilizando um Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Inglaterra) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25° C, conforme descrito no Tópico 2.3.2 do Capítulo 1. O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das NLS, conforme descrito no Tópico 2.3.3 do Capítulo 1. A eficiência de encapsulação do AR nas NLS foi avaliada conforme descrito no Tópico 2.3.4 do Capítulo 1.

2.2 Avaliação da eficácia das NLS carregadas com AR

2.2.1 Animais

Camundongos rhino sem pêlo (machos e fêmeas), adultos (7-9 semanas) foram utilizados para a avaliação da eficácia das NLS em comparação com um produto comercial. A criação e manutenção dos animais em experimentação foram conduzidas em um gabinete de biotério (Alesco, Brasil), onde os animais recebiam água e ração *ad libitum*. A água, maravalha e ração foram previamente esterilizadas antes de serem submetidas ao contato direto com os camundongos. A temperatura ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) e umidade ($56 \pm 10\%$) foram monitoradas através de um termo-higrômetro e controladas através de ar-condicionado ou aquecedor. O ciclo de luz (12 horas de claro e 12 horas de escuro) foi controlado.

Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG) – Protocolo nº 119/2007.

2.2.2 Formulações

Para a avaliação da eficácia uma NLS contendo 0,01% de AR foi comparada com um gel comercial (Vitanol-A[®], Stiefel) contendo 0,01% de AR. As NLS utilizadas no presente estudo foram preparadas e caracterizadas com relação à EE (%), tamanho e potencial zeta conforme descrito no Tópico 2.1. A formulação comercial contendo 0,01% de AR (Vitanol-A[®], Stiefel) foi adquirida no comércio local.

2.2.3 Tratamento dos animais

Após atingirem 7 a 9 semanas de idade, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais com 4 animais cada (2 machos e 2 fêmeas). No Grupo 1, os animais foram tratados com gel placebo; no grupo 2 com Vitanol-A[®] (gel) contendo 0,01% de AR e no Grupo 3 com NLS (gelificada) contendo 0,01% de AR. Durante o período experimental, os animais foram mantidos nas mesmas condições de criação especificadas acima, sendo as fêmeas e machos de cada grupo mantidos em gaiolas separadas.

As formulações (gel placebo, Vitanol-A[®] 0,01% AR e NLS 0,01% AR) foram aplicadas (100 µL) no dorso dos animais, em uma área de pele de 6 cm², uma vez ao dia, 5 dias por semana, durante 2 semanas, sendo espalhadas suavemente com o auxílio de um bastão de vidro durante dois minutos. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de gel sem AR.

2.2.4 Sacrifício dos animais

A comparação da atividade comedolítica do AR entre a NLS e o gel comercial (Vitanol-A[®]) foi conduzida através de análises histológicas. Decorridas 72 horas após o término do tratamento, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal com uma solução de Tiopental Sódico (50 mg/kg de peso corporal), precedido de heparinização (Heparina Sódica, 70 UI/kg de peso corporal; Liquepine, F.Hoffmann-Roche, Basiléia, Suíça). Em seguida, os animais foram submetidos à perfusão intracardíaca com solução salina de Ringer, seguida de perfusão com solução fixadora de formalina neutra tamponada a 10% (NBF). Durante este procedimento os animais foram mantidos em decúbito ventral para preservar a pele dorsal. Em seguida, a pele dorsal (onde o tratamento foi realizado) foi removida com o auxílio de um bisturi e seccionada em 4 partes de aproximadamente 1 cm², as quais foram conservadas sob refrigeração em um frasco contendo NBF.

2.2.5 Preparações das amostras

2.2.5.1 Amostras para as análises histológicas (segmentos verticais)

Aproximadamente 24 horas após o sacrifício, um dos fragmentos da pele de cada animal foi removido do fixador, lavado com PBS e desidratada pela imersão em concentrações crescentes de etanol (50, 70, 80, 95 e 100%). As amostras foram submetidas a banhos de xilol, seguidos por banhos de parafina, e foram, então, incluídas em parafina. Algumas amostras foram também incluídas em resina a base de glicolmetacrilato (Technovit 7100; Heraeus Kulzer, Alemanha). Após o processo de desidratação, essas amostras foram submetidas a processos de pré-infiltração e infiltração na resina, *overnight*, e posterior inclusão.

Após a inclusão das amostras em parafina ou metacrilato, cortes de 3 μm foram obtidos através da utilização do micrótomo MICROM HM 335E (Microm International GmbH, Alemanha). Esses cortes foram fixados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina-eosina para serem submetidos à avaliação histológica e morfométrica.

2.2.5.2 Amostras para medidas dos utrículos (segmentos horizontais)

Logo após a secção da pele, um dos 04 fragmentos obtidos foi removido do fixador, lavado com salina em tampão fosfato (PBS) para remoção do formaldeído e imersa em ácido acético 1% por aproximadamente 24 horas a 4° C. Em seguida, a derme foi removida da epiderme utilizando espátula e pinça com auxílio de microscópio estereoscópico. A epiderme isolada foi submetida à desidratação gradual pela imersão em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 95 e 100%), seguida por xilol, em cujo solvente permaneceu imersa por 15 dias. Decorridos 15 dias, a epiderme foi montada em lâminas de vidro, com a face dérmica voltada para baixo. O tecido foi recoberto por lamínula de vidro, utilizando-se o Entellan-new® (Merck, Alemanha) como meio de montagem.

2.2.6 Avaliação morfométrica das amostras

2.2.6.1 Avaliação do tamanho dos utrículos

Para a avaliação do tamanho dos utrículos foram obtidas fotografias dos segmentos horizontais das amostras da pele dos camundongos de cada grupo experimental. As fotografias foram obtidas através da câmera digital Nikon Coolpix 995, acoplada ao fotomicroscópio óptico Nikon Eclipse E600 (ambos da Nikon Corp., Melville, NY, EUA), utilizando objetiva de aumento de 10X. Para cada animal foram fotografados 05 campos correspondentes ao centro e aos 04 pontos diagonais ao centro fotografado. Na seqüência, foi realizada a medida de pelo menos 05 utrículos por foto, totalizando 25 avaliações por fragmento de pele. Os utrículos medidos que tocavam as bordas da fotografia não foram avaliados. Para cada utrículo foi medido o menor e o maior raio, sendo o valor considerado a média dessas duas medidas.

2.2.6.2 Avaliação das alterações epidérmicas

Para a avaliação quantitativa das alterações epidérmicas foram obtidas fotografias dos segmentos verticais das amostras da pele dos camundongos de cada grupo. As fotografias foram obtidas através da câmera Nikon Coolpix 995 acoplada ao microscópio óptico Nikon Eclipse E600 (ambos da Nikon Corp., Melville, NY / EUA), utilizando objetiva de aumento de 40X. Para cada animal foram fotografados 03 campos correspondentes ao centro e aos 02 pontos laterais do fragmento de pele. Na seqüência foi realizada a medida da espessura da epiderme e da camada granulosa, bem como a contagem dos grânulos de queratohialina, utilizando o programa Scion Image[®]. Antes de iniciar as medidas o tamanho de cada fotografia foi precisamente dimensionado através de uma régua calibrada.

2.3 Avaliação da toxicidade local

Para a avaliação da toxicidade local uma NLS carregada com 0,05% de AR foi comparada com o Vitanol-A[®] creme contendo 0,05% de AR. As NLS foram preparadas e caracterizadas com relação à EE (%), tamanho e potencial zeta conforme descrito no Tópico 2.1. A formulação comercial foi adquirida no comércio local.

Após atingirem a idade de 7 a 9 semanas de vida, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: placebo (2 machos e 3 fêmeas), Vitanol-A[®] creme (2 machos e 4 fêmeas) e NLS (2 machos e 4 fêmeas). Neste período os animais foram mantidos nas mesmas condições de criação especificadas acima, sendo as fêmeas e machos de cada grupo mantidos em gaiolas separadas.

As formulações foram aplicadas (100 µL) no dorso dos animais (6 cm²) uma vez ao dia, 10 dias consecutivos, sendo espalhadas suavemente com o auxílio de um bastão de vidro durante aproximadamente dois minutos. Os animais do grupo controle receberam o gel sem as NLS-AR.

Diariamente os animais de cada grupo foram avaliados com relação aos sinais de irritação cutânea. A irritação cutânea foi pontuada conforme especificado a seguir:

- 0 = Pele Normal (ausência de eritema, pele branca ou rósea),
- 1 = Eritema Leve (vermelhidão leve, com tonalidade ligeiramente diferente da área controle),
- 2 = Eritema Bem Definido (vermelhidão pronunciada, geralmente em toda a área),
- 3 = Eritema Moderado (vermelhidão intensa e difusa),
- 4 = Eritema Severo (vermelhidão extrema, com leve formação de escara).

2.4 Análises estatística

Para os diversos parâmetros avaliados, a diferença estatística entre os grupos foi determinada através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *pos-hoc* de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Caracterização das NLS

O diâmetro das NLS-AR (0,01% AR) foi de 242 ± 25 nm, o potencial zeta de $+45 \pm 5$ mV e a eficiência de encapsulação do AR foi de $98,1 \pm 1,7\%$. Já as NLS-AR (0,05% AR) apresentaram as seguintes características físico-químicas: diâmetro de 230 ± 7 nm, potencial zeta igual a $+31 \pm 2$ mV e eficiência de encapsulação de $97,7 \pm 0,5\%$. As formulações estão de acordo com as especificações pré-definidas para a formulação otimizada (Tópico 5, Capítulo 1).

2 Avaliação qualitativa e quantitativa da atividade comedolítica das formulações testadas

Inicialmente foi avaliado o potencial comedolítico das duas formulações testadas (NLS e gel comercial Vitanol-A[®]), ambas contendo 0,01% de AR. Nesta etapa uma potente atividade comedolítica do AR foi demonstrada, além de um efeito estimulatório nos elementos celulares e fibrosos da pele, promovendo um espessamento das paredes dos utrículos, da epiderme e da derme (FIG. 29A-C). Esses dados são similares àqueles previamente publicados, nos quais a eficácia do AR no modelo animal de camundongos rhino foi relatada (NAKANO *et al.*, 2007; SAKUTA e KANAYAMA, 2005; VARANI *et al.*, 2003).

Na FIG. 29, obtida de cortes verticais das biópsias da pele dos camundongos, observa-se que o grupo placebo apresenta a maioria dos utrículos abertos para a superfície e freqüentemente contêm queratina em seu interior (FIG. 29A). Nos grupos tratados ocorre a remoção desses tampões foliculares dos utrículos, fazendo com que os mesmos apresentem-se mais alongados, assemelhando-se à UPS normal (FIG. 29B e 29C).

Nos animais tratados com o placebo (FIG. 29A) pode-se observar que a epiderme é fina, enquanto naqueles tratados com o gel comercial e a NLS (FIG. 29B-C e FIG. 30) esta camada é claramente mais espessa e menos ondulada, e os utrículos estão reduzidos em

número e tamanho. As mudanças observadas são mais visíveis ainda na camada granulosa (FIG. 30). Comparada com o controle, as glândulas sebáceas parecem mais evidentes após o tratamento, provavelmente devido à redução no tamanho dos utrículos (FIG. 29).

A presença de cistos dérmicos na derme profunda é evidente tanto no grupo controle quanto nos tratados (FIG. 29). Esses cistos, característicos dos camundongos rhino, correspondem às células diferenciadas em glândulas pseudo-sebáceas com características morfológicas de sebócitos e células da bainha epitelial externa. A análise das queratinas e lipídeos dessas estruturas confirma sua natureza epitelial, conforme descrito por Bernerd *et al.* (1996). Outro aspecto relevante que pode ser observado nas características morfológicas das amostras é a presença de infiltrados inflamatórios na derme dos animais tratados com o AR (FIG. 29E-F). Nesses infiltrados predominam eosinófilos, neutrófilos e leucócitos mononucleares. Estes infiltrados foram claramente observados na derme dos animais tratados com o AR (FIG. 29E-F), mas ausentes naqueles tratados com o placebo (FIG. 29D). Pode-se observar claramente também que a reação inflamatória foi mais intensa nos animais tratados com o gel comercial (FIG. 29 E) do que naqueles que receberam as NLS (FIG. 29F).

A FIG. 31, obtida de cortes horizontais das biópsias da pele dos camundongos, apresenta, sob outro ângulo, o efeito comedolítico do AR na pele dos camundongos rhino. Novamente é visível que o tratamento dos camundongos rhino com as formulações contendo AR propiciou uma redução significativa do diâmetro dos utrículos (FIG. 31). O efeito comedolítico foi ainda analisado através da medida dos utrículos previamente fotografados de biópsias da pele dos animais de cada grupo. Os valores encontrados para o diâmetro médio dos utrículos foram estatisticamente diferentes entre os grupos tratados com AR (NLS e Vitanol-A[®]) e placebo ($P < 0,05$). O diâmetro dos utrículos foi de $116 \pm 15 \mu\text{m}$ no grupo placebo, enquanto os grupos tratados apresentaram utrículos com diâmetro médio de $64 \pm 6 \mu\text{m}$ e $64 \pm 5 \mu\text{m}$ para a NLS e produto comercial, respectivamente. Portanto, a eficácia da NLS carregada com AR, avaliada através da redução do diâmetro médio dos utrículos, foi similar àquela observada para o gel comercial Vitanol-A[®]. Pode-se observar também uma diminuição não uniforme do diâmetro utricular e esses achados estão em consonância com dados previamente publicados (NAKANO *et al.*, 2007).

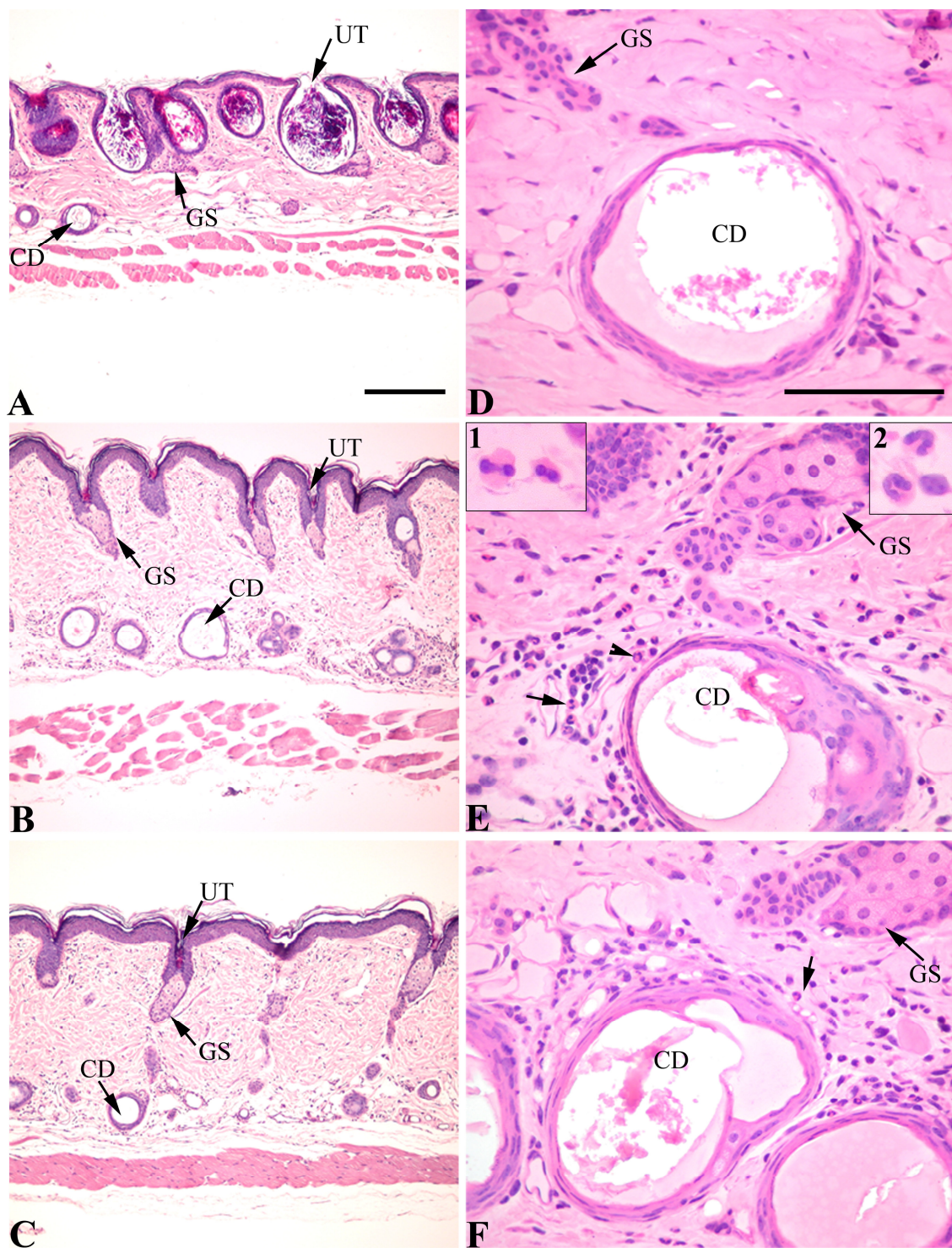


FIGURA 29 - Avaliação das características morfológicas das amostras de pele oriundas de animais dos grupos placebo (A, D), gel comercial (B, E) e NLS (C, F), ambos contendo 0,01% de AR. Amostras coradas com hematoxilina-eosina. Barra de escala = 100 μ m; CD = cisto dérmico; UT = utrículo; GS = glândula sebácea, Seta = eosinófilo; cabeça de seta = neutrófilo.

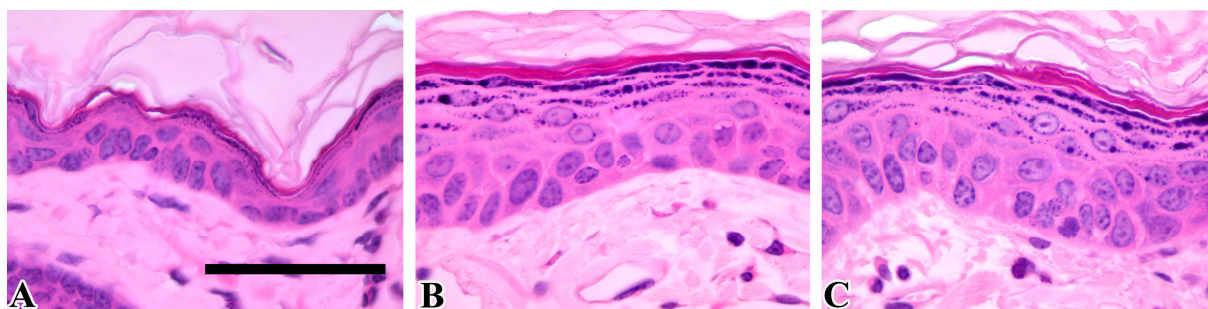


FIGURA 30 - Avaliação das características morfológicas das amostras epidérmicas em cortes verticais de pele oriunda de animais dos grupos placebo (A), gel comercial (B) e NLS (C), ambos contendo 0,01% de AR. Amostras coradas com hematoxilina-eosina. Barra de escala = 50 μm .

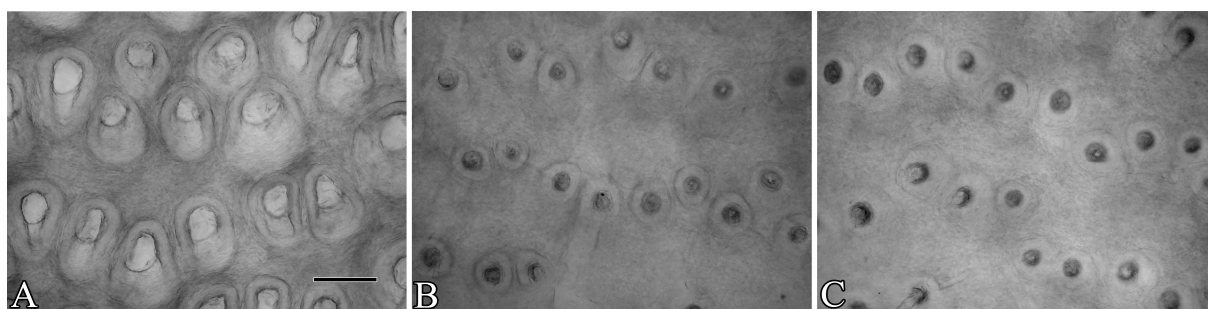


FIGURA 31 - Avaliação das amostras epidérmicas em cortes horizontais, oriundas das amostras de pele dos animais dos grupos placebo (A), gel comercial (B) e NLS (C), ambos contendo 0,01% de AR. Barra de escala = 100 μm .

3 Avaliação quantitativa da influência das formulações testadas na epiderme

A influência das formulações (NLS e Vitanol-A[®]) nas características morfológicas das amostras epidérmicas foi também investigada. As formulações avaliadas promoveram o espessamento da epiderme, com aumento do número de camadas celulares, especialmente da camada granulosa (FIG. 30). A FIG. 32 mostra a avaliação da espessura da epiderme e da camada granulosa nos grupos controle (Placebo) e tratados com NLS ou gel comercial (Vitanol-A[®]), ambos contendo 0,01% de AR.

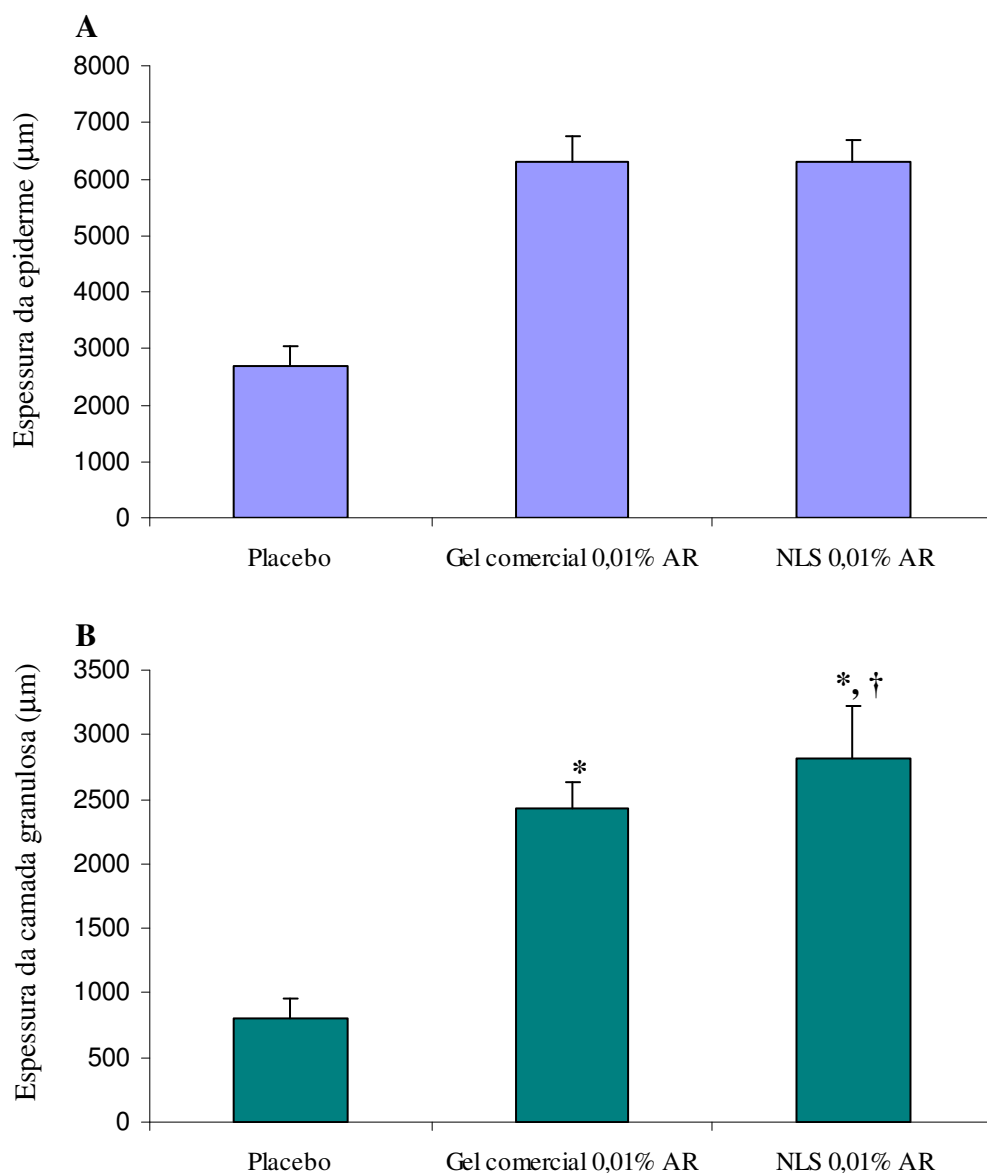


FIGURA 32 - Avaliação da espessura da epiderme (FIG. 32A) e da camada granulosa (FIG. 32B) nos grupos controle (Placebo) e tratados com NLS ou gel comercial (Vitanol-A[®]), ambos contendo 0,01% de AR. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão. *P < 0,05 em relação ao placebo. † P < 0,05 em relação ao gel comercial.

A espessura da epiderme aumentou em aproximadamente 134% para os grupos tratados com AR (NLS e Vitanol-A[®]) em relação ao grupo controle (FIG. 32A). A diferença entre as NLS e o Vitanol-A[®] não foi estatisticamente significativa. Considerando especificamente a espessura da camada granulosa da epiderme, a atividade da NLS foi significativamente maior ($2.814 \pm$

406 μm) do que a observada para a formulação comercial ($2.432 \pm 197 \mu\text{m}$) ($P < 0,05$). Em relação ao grupo placebo houve um aumento de 200 e 248% na espessura dessa camada para os animais tratados com o Vitanol-A[®] e as NLS, respectivamente (FIG. 32B).

Este perfil de proliferação celular aumentado, observado no grupo tratado com as NLS, pode ser atribuído à maior penetração do AR nas camadas superiores da pele após a aplicação dessas nanopartículas em comparação com o gel comercial Vitanol-A[®]. Alguns autores têm sugerido que as NLS mostram potencial para promover maior penetração epidérmica em comparação com formulações convencionais (LIU *et al.*, 2007; MÜNSTER *et al.*, 2005; STECOVÁ *et al.*, 2007).

4 Avaliação da toxicidade local das formulações

Embora o AR apresente os efeitos benéficos mostrados acima, sua aplicação tópica é acompanhada de irritação cutânea (eritema, ressecamento, descamação), o que não raramente ocasiona a descontinuação do tratamento. Assim, o potencial de irritação cutânea das formulações estudadas foi avaliado durante e após o tratamento.

Durante os experimentos prévios, quando os camundongos rhino foram tratados com as formulações contendo 0,01% de AR, a presença de eritema foi claramente mais freqüente nos animais tratados com a formulação comercial do que naqueles que receberam a NLS (dados não mostrados). Após o tratamento, quando as biópsias foram avaliadas morfológicamente, pôde-se observar infiltrados inflamatórios onde predominavam eosinófilos, neutrófilos e leucócitos mononucleares na derme dos animais tratados com o Vitanol-A[®]. Tais infiltrados foram mais freqüentes na derme profunda, especialmente nas proximidades dos cistos dérmicos. A infiltração de células inflamatórias foi menos intensa nos animais tratados com as NLS (FIG. 29E e 29F).

Com o objetivo de confirmar ou não tais observações, um segundo estudo foi conduzido com formulações contendo uma concentração maior de AR. Para este estudo a concentração igual a 0,05% foi selecionada, uma vez que o AR é freqüentemente disponível comercialmente nesta concentração. O aumento da concentração aumenta a eficácia, mas também a incidência

de reações adversas e, conseqüentemente, as eventuais diferenças entre as duas formulações (NLS e Vitanol-A[®]) seriam mais facilmente detectadas.

A FIG. 33 ilustra os índices de irritação observados nas fêmeas (FIG. 33A) e machos (FIG. 33B) dos grupos tratados com a formulação comercial e as NLS. Para ambos os sexos os índices de irritação observados nos animais tratados com as NLS foi menor do que aquele observado para o creme Vitanol-A[®] em diversos intervalos de tempo durante o ensaio.

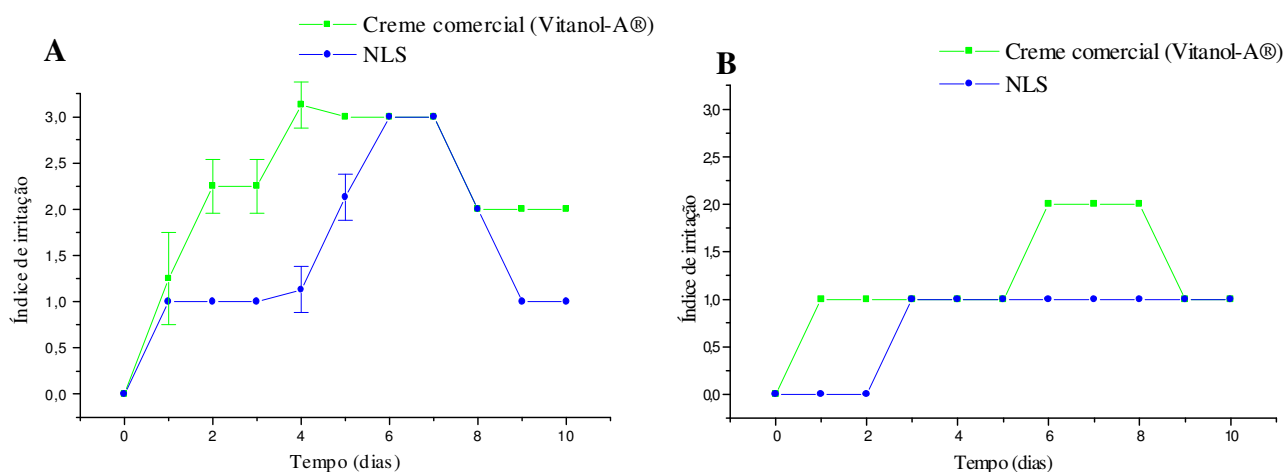


FIGURA 33- Irritação cutânea induzida pelo AR em camundongos rhino fêmeas (FIG. 33A) e machos (FIG. 33B) durante o tratamento com o gel de NLS e o creme comercial, ambos contendo AR (Vitanol-A[®]) a 0,05%. Cada animal foi pontuado de 1 a 4 com relação ao nível de irritação apresentado, tendo-se como base de comparação o grupo placebo. Os valores apresentados correspondem à média \pm dp.

O índice de irritação foi significativamente menor ($P < 0,05$) para as fêmeas tratadas com as NLS ($n = 4$ animais) em comparação com aquelas tratadas com o creme comercial nos dias 2, 3, 4, 5, 9 e 10 (FIG. 33A). Em relação aos machos, a realização da análise estatística não foi possível devido ao pequeno número de animais ($n = 2$), embora a tendência tenha sido a mesma observada anteriormente: maior irritação nos animais tratados com a formulação comercial em comparação com a NLS (FIG. 33B). É interessante mencionar que, ao compararmos as FIG. 33 A e B, é possível observar uma maior sensibilidade das fêmeas à

ação do AR em relação aos machos. Porém, em ambos os grupos, os animais (machos e fêmeas) tratados com a formulação comercial apresentaram um nível de irritação maior, e permaneceram por mais tempo nesse nível, que os animais tratados com as NLS.

A fim de ilustrar melhor a irritação cutânea observada durante o tratamento com o AR, a FIG. 34 apresenta as fotos de um animal representativo de cada um dos três diferentes grupos avaliados (placebo, creme comercial e NLS, ambos contendo 0,05% de AR) no 2º, 4º, 8º e 10º dias de tratamento. Pode-se observar claramente que a aplicação das formulações contendo AR promoveu o aparecimento de irritação cutânea, sendo observados eritema, ressecamento e descamação na pele dos animais tratados quando comparados ao grupo placebo. Estes fenômenos são comumente observados após a aplicação tópica de retinóides em diferentes modelos animais (MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008; SHAH *et al.*, 2007; VARANI *et al.*, 2003, 2008).

Durante todo o tratamento, o eritema e a descamação foram mais intensos nos animais tratados com a formulação comercial em comparação com o placebo e as NLS. Após 2 aplicações, os animais tratados com o Vitanol-A[®] apresentaram eritema bem definido (vermelhidão pronunciada), enquanto que naqueles tratados com as NLS somente um eritema leve foi observado no mesmo intervalo de tempo (FIG. 34B e C). A evolução dessa irritação também foi diferente para ambos os grupos. Os animais tratados (fêmeas) com o creme comercial apresentaram eritema moderado (vermelhidão intensa) e muita descamação após 4 aplicações (FIG. 34E), quadro que permaneceu constante até o 7º dia de tratamento, quando começou a regredir (FIG. 34 H e L). Nos animais tratados com as NLS o eritema moderado foi observado somente após 6 aplicações, regredindo após a 7ª aplicação. A intensidade da descamação foi menor nesses animais durante todo o tratamento em comparação com aqueles tratados com o Vitanol-A[®] (FIG. 34 F, I e M). Durante o tratamento também foi possível observar uma relação entre a irritação cutânea e o comportamento dos animais. Os animais tratados com a formulação comercial apresentavam uma nítida mudança comportamental (inquietos e resistência à aplicação do produto) quando comparados aos outros grupos (NLS e placebo). Nos animais do grupo placebo não foi observado nenhum nível de irritação cutânea ou comportamental.

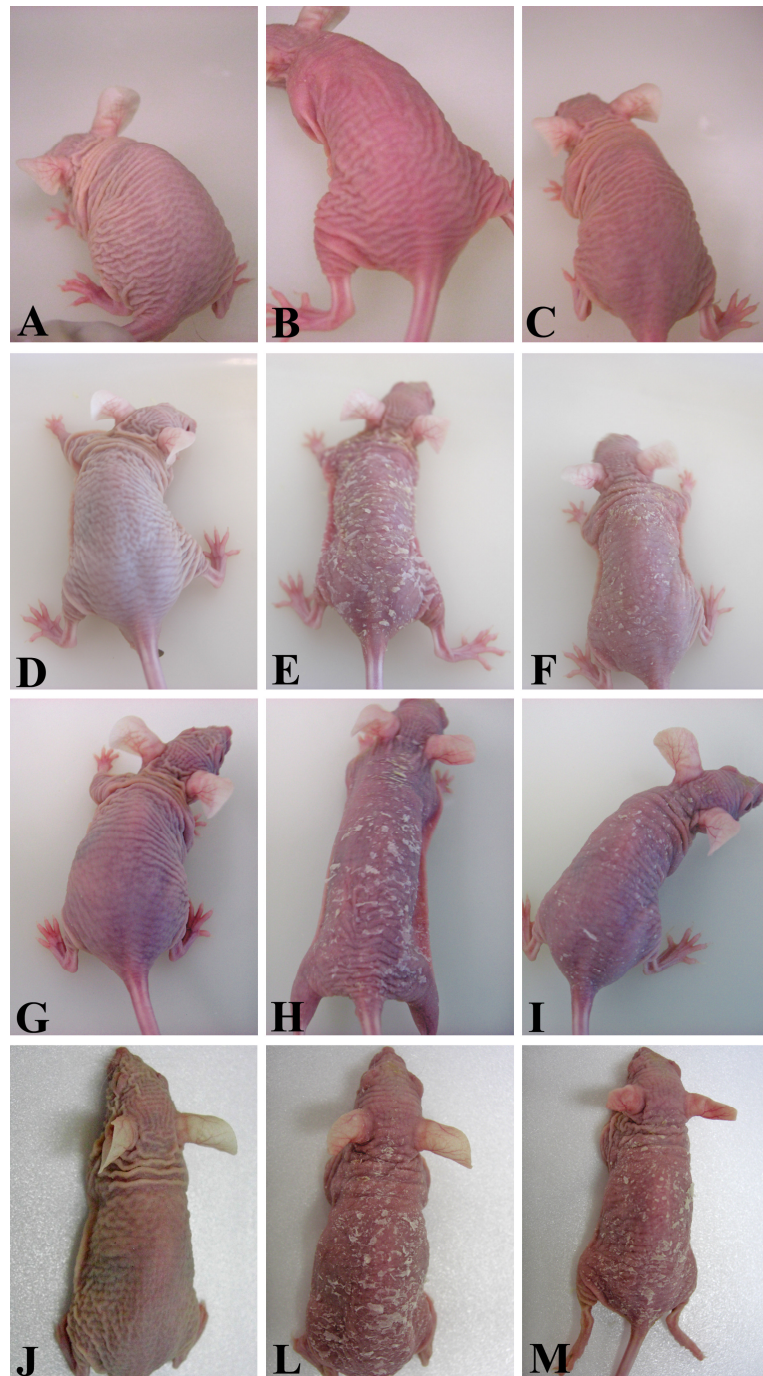


FIGURA 34 - Irritação cutânea induzida pelo AR em camundongos rhino fêmeas durante o tratamento com o gel placebo (FIG. A, D, G e J), o creme comercial contendo 0,05% de AR (FIG. B, E, H e L) e a NLS gelificada contendo 0,05% de AR (FIG. C, F, I e M). O conjunto das figuras A, B e C; D, E e F; G, H e I e J, L e M ilustram o aspecto da pele após duas, quatro, oito e dez aplicações, respectivamente.

Varani *et al.* (2008) relatam a seguinte evolução das reações adversas durante a aplicação tópica de uma solução de AR (0,1%) em camundongos (machos e fêmeas): eritema, ressecamento e descamação. Os autores observaram que a irritação cutânea foi evidente após 4 dias do início do tratamento, máxima nos 7º e 8º dias e menor no final do tratamento (14 dias). Nossos dados estão em consonância com estas observações e uma evolução da irritação similar foi observada. No entanto, o número de aplicações necessárias para aumentar o nível de irritação cutânea variou em função das formulações avaliadas. Os animais (machos e fêmeas) tratados com a formulação comercial evoluíram mais rapidamente para um eritema e descamação mais intensos, e permaneceram por mais tempo nesse nível de irritação. Em contrapartida, para aqueles tratados com as NLS, foram necessárias mais aplicações e o tempo que permaneceram em um nível mais elevado de eritema e descamação foi menor que o observado para os animais tratados com a formulação comercial. Ademais, diferentemente do observado por Varani *et al.* (2003), uma vez que a concentração de AR utilizada em nosso estudo foi menor (0,05%), nenhum dos animais tratados atingiu um nível de irritação grau 4 (eritema severo com formação de escara). Portanto, durante todo o estudo nenhum animal necessitou ser removido do grupo de tratamento.

Recentemente, dois trabalhos mostraram o interesse das NLS como sistemas carreadores para aplicação tópica do AR (MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008; SHAH *et al.*, 2007). No primeiro (SHAH *et al.*, 2007), os autores mostraram que as NLS carregadas com AR induziram menor irritação cutânea em coelhos albinos (teste de Draize) quando comparadas com um creme comercial. No entanto, não foi possível identificar se as formulações foram aplicadas uma só vez ou se foram aplicações múltiplas. No segundo, os dados obtidos confirmam o menor potencial irritante das NLS carregadas com AR em comparação com um creme comercial após aplicações múltiplas. Porém, as análises estatísticas não foram fornecidas em nenhum dos trabalhos, e a atividade das formulações não foi investigada. Portanto, se a menor incidência de reações adversas foi associada com atividade similar, menor ou maior do que a do creme convencional permaneceu como uma questão em aberto.

O conjunto dos nossos dados mostrou que a eficácia comedolítica das NLS carregadas com AR foi similar àquela observada para uma formulação convencional. Portanto, a formação do par iônico, fundamental para garantir a produção de NLS-AR com alta eficiência de encapsulação, não comprometeu a atividade do AR. Adicionalmente, a irritação cutânea induzida pelo AR carreado nas NLS foi menor do que aquela observada com um creme

convencional contendo o fármaco livre. A menor irritação cutânea, avaliada como eritema e descamação, induzida pelas NLS carregadas com AR pode ser atribuída a diversos fatores, como liberação controlada, direcionamento folicular e direcionamento epidérmico.

As NLS têm mostrado potencial para liberação controlada, o que pode ter contribuído, em virtude da distribuição gradual do fármaco na pele, para a diminuição da irritação cutânea observada nos animais tratados com as NLS-AR sem comprometer a eficácia. Outra hipótese alternativa pode ser atribuída à penetração folicular das NLS carregadas com AR, diminuindo sua penetração nas demais camadas da pele (epiderme e derme). Por outro lado, ainda que a penetração folicular tenha que ser descartada, em função da barreira proporcionada pelo comedão, as NLS podem ter favorecido a penetração epidérmica do AR, diminuindo a sua absorção nas camadas profundas do tecido. Isto contribui para a diminuição da irritação cutânea e menor presença de infiltrado inflamatório na derme. Recentemente, alguns estudos mostraram que as NLS favorecem a penetração epidérmica de fármacos encapsulados em detrimento da permeação transdérmica (LIU *et al.*, 2007; MÜNSTER *et al.*, 2005; STECOVÁ *et al.*, 2007).

Segundo Yamaguchi *et al.* (2005), a menor incidência de eritema e descamação nos animais tratados com o AR encapsulado nas NLS pode ser devido ao menor contato do grupamento ácido do fármaco com a pele em virtude da encapsulação. No caso da formulação comercial convencional (gel ou creme), os cristais de AR encontram-se livres na matriz e completamente disponíveis após a aplicação na pele, proporcionando uma liberação massiva do fármaco e acarretando, conseqüentemente, uma maior irritação cutânea, como observado no presente estudo e em relatos da literatura (MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008; SHAH *et al.*, 2007).

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a eficácia do AR encapsulado em sistemas carreadores baseados em NLS foi similar àquela observada para uma formulação comercial contendo o fármaco livre, induzindo redução do tamanho do comedão, espessamento da epiderme e da derme. Por outro lado, a irritação cutânea induzida pelo AR (eritema e descamação) foi menor para as NLS em comparação com o creme comercial. O menor potencial para induzir toxicidade cutânea das NLS carregadas com AR também pôde ser confirmado através da avaliação dos infiltrados inflamatórios na derme dos animais tratados. A infiltração de células inflamatórias foi menos intensa naqueles tratados com as NLS.

Adicionalmente, as NLS carregadas com AR induziram um aumento significativamente maior da espessura da camada granulosa da epiderme em comparação com a formulação comercial. Esse achado, embora não esteja diretamente relacionado com o tratamento da acne, pode ser relevante para o uso do AR como agente antienvelhecimento. Além disso, este fenômeno pode ser uma evidência do direcionamento epidérmico das NLS, favorecendo a penetração do fármaco nas camadas superiores da pele, com menor absorção nas estruturas profundas do tecido. Isto pode ter contribuído para redução do índice de irritação e a menor presença de infiltrado inflamatório na derme.

Em suma, nossos dados mostraram que as NLS carregadas com AR representam uma alternativa inovadora para diminuição da incidência de reações adversas locais (irritação cutânea) induzidas pelo AR, principalmente eritema e descamação, sem comprometer sua eficácia no contexto do tratamento tópico da acne.