



XXXI Congresso de
Iniciação Científica
Unicamp

2023



Revisão Sistemática Integrativa sobre os Modelos Experimentais *in vitro* utilizados na Pesquisa de Produtos Naturais com Potencial Uso no Tratamento de Ceratose Actínica

Palavras chaves: ceratose actínica, plantas medicinais e teste *in vitro*.

Autoras:

Rafaela Callipo Palmeira- PUCAMP

Orientadora: Profa Dra Ana Lucia Tasca Gois Ruiz (FCF/Unicamp)

INTRODUÇÃO:

A ceratose actínica é uma doença de pele extremamente importante, sendo um dos tipos de neoplasia benigna mais comum. Ela está muito associada à exposição da pele aos raios UV. Apesar de não demonstrar graves sintomas no paciente, caso ela não seja tratada da forma correta e se houver a continuidade da exposição crônica aos raios UV, ela pode evoluir para um carcinoma espinocelular. Sendo assim, o diagnóstico é de extrema importância, tanto para definir um tratamento adequado, quanto para melhorar a qualidade de vida do paciente (Krutmann et al. 2015; Steeb et al. 2021).

Dentre as variedades de tratamento para a ceratose actínica, a primeira escolha é a cirurgias de remoção da lesão. Também existem os tratamentos tópicos com 5-fluorouracila, associado ou não ao ácido acetilsalicílico, tirbanibulina, imiquimode ou diclofenaco, além da terapia fotodinâmica com aminolevulinato e metil-aminolevulinato como agentes fotossensibilizantes (Steeb et al. 2021). Porém, o tratamento para a ceratose actínica é extenso, e muitas vezes causam efeitos adversos desagradáveis aos pacientes, fazendo com que diminua a aderência a esses tratamentos.

Portanto, na tentativa de aumentar a aceitabilidade do longo tratamento e com o intuito de diminuir os efeitos adversos nos pacientes, o uso de plantas medicinais como terapia vem sendo estudado. Diversas pesquisas demonstram os resultados promissores dos produtos naturais, que apresentam efeitos antioxidantes, atividade anti-proliferativa, controlando a proliferação de queratinócitos, e efeitos anti-inflamatórios, modulando produção de citocinas (Maddheshiya et al. 2022).

Para a comprovação de eficiência e segurança, essas novas opções de tratamento precisam ser avaliadas nas fases pré-clínicas, passando por estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, antes de serem utilizadas pela população. Modelos *in vitro* bem fundamentados são essenciais para uma triagem adequada de potenciais novos fármacos e para a redução do uso de animais de laboratório (Jaroch et al. 2018).

Neste contexto, e buscando contribuir para otimização da pesquisa de novas opções terapêuticas para o tratamento de doenças de pele, este projeto de revisão bibliográfica integrativa teve por objetivo fazer um panorama dos modelos experimentais em cultura de células que estão sendo utilizados para evidenciar atividades farmacológicas de produtos naturais que possam ser utilizados no futuro no tratamento da ceratose actínica.

METODOLOGIA:

A pergunta a ser respondida por esta revisão sistemática integrativa foi “Quais métodos em cultura de células (População/Problema) estão sendo utilizados para avaliar produtos naturais e plantas medicinais (Fenômeno de Interesse) para o tratamento de ceratose actínica (Contexto)?”. Para isso foram consultadas as bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Web of Science, SCOPUS, PubMed e Embase. Os descritores foram definidos usando Descritores em Ciência da Saúde (DeCS) e Medical Subject Headings (MeSH) para a grafia correta dos termos. Os descritores selecionados, em função da pergunta estruturada, foram “Actinic Keratosis” (#1), “keratinocytes” (#2), “plants, medicinal”(#3), e “natural products” (#4). As estratégias de busca foram “(#1) and (#2) and (#3)”, “(#1) and (#2) and (#4)”; “((#1) and (#2)) and ((#3) or (#4))”.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A partir da estratégia de busca definida, foram encontrados 46 artigos científicos. Concluída a busca, realizou-se a leitura crítica dos títulos e dos resumos dos artigos, atentando-se para a presença dos descritores selecionados em pelo menos um deles (título e/ou resumo), com a exclusão de artigos de revisão e resumos de congresso, artigos escritos

em outros idiomas que não Inglês ou Português, duplicatas e aqueles que não estivessem disponíveis para leitura na íntegra. Esta abordagem resultou em 6 artigos para leitura detalhada.

Considerando os seis artigos selecionados, as linhagens celulares mais utilizadas nos experimentos foram HaCat (queratinócitos humanos imortalizados) e/ou A431 (célula tumoral de epiderme humana), cultivadas em meio DMEM low glucose suplementado com soro fetal bovino (10%) e mistura de antibióticos (Laszczykn et al. 2006; Hur et al. 2008; Zalesinska et al. 2015; Kim et al. 2018; Yin et al. 2019). Para os experimentos, alguns artigos descreveram a utilização de agentes agressores a fim de simular alguns aspectos da patologia em estudo (ceratose actínica), para então avaliar o efeito dos produtos naturais frente a essas condições (Hur et al. 2008; Kim et al. 2018; Yin et al. 2019). Os agentes utilizados foram a exposição à luz UV ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Os protocolos encontrados expuseram as células a esses agentes antes (efeito curativo) ou depois (efeito preventivo) do tratamento com os produtos naturais em estudo. Como todos reportaram uma única exposição ao agente agressor, pode-se concluir que os experimentos buscavam simular uma inflamação aguda, para avaliação de possível efeito anti-inflamatório dos produtos naturais em estudo. Quanto aos produtos naturais, os estudos avaliaram principalmente triterpenos (ácido betulínico, betulina e seus derivados) e polifenólicos, como por exemplo derivados de quercetina.

Uma vez determinado o desenho experimental (concentrações das amostras, tempo de exposição, tipo de agente agressor), as células foram avaliadas por diferentes métodos dependendo do parâmetro a ser analisado. Para avaliação de viabilidade, o teste mais utilizado foi o de MTT (Hur et al. 2008; Zalesińska et al. 2015), que indica indiretamente se as células estão viáveis através da atividade das enzimas mitocondriais. A quantificação de ATP através da técnica de luminescência também foi empregada para quantificação de células viáveis (Laszczykn et al. 2006). Outra forma de avaliar a viabilidade foi através da perda de integridade de membrana plasmática através da atividade de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura (Laszczykn et al. 2006) ou através da incorporação de iodeto de propídeo (Hur et al. 2008). O aumento da atividade de LDH no meio extracelular é avaliado por colorimetria, enquanto a marcação de DNA por iodeto de propídeo é medida por fluorescência, podendo ser aplicado na técnica de citometria de fluxo. A interação dos produtos naturais com o DNA foi evidenciada pelo teste COMETA (Zalesińska et al. 2015) e pelo teste Tunel (Hur et al. 2008; Zalesińska et al. 2015). Além do efeito sobre a viabilidade celular, outros aspectos importantes foram a proliferação celular, avaliada pela incorporação de BrdU (Laszczykn et al. 2006) e a migração celular, analisada através do *scratch assay*

(teste de ranhura), com acompanhamento da migração por microscopia ótica (Kim et al. 2018; Yin et al. 2019).

Com relação ao processo inflamatório, as análises tiveram por objetivo a quantificação de quimiocinas e citocinas inflamatórias, seja por técnicas de fluorescência e de Western Blotting (Hur et al. 2008; Kim et al. 2018; Yin et al. 2019), como também através da avaliação da expressão dos genes correspondentes pela técnica de PCR (Yin et al. 2019).

Por fim, um artigo (Hur et al. 2008) avaliou o efeito da combinação de fototerapia e produtos naturais (ácido sargaquinoico e sargacromenol) no tratamento de ceratose actínica. Neste caso, a luz UV foi aplicada juntamente com o tratamento com os produtos naturais e os aspectos de viabilidade celular e ativação de processo inflamatório foram analisados como já descrito.

CONCLUSÕES:

Considerando os resultados obtidos, foram encontrados relativamente poucos estudos sobre produtos naturais tendo como objetivo o tratamento de ceratose actínica. Em parte, isso pode ser atribuído à alta porcentagem de auto-resolução da ceratose actínica.

Com base na análise crítica dos artigos selecionados sobre ceratose actínica, foi possível evidenciar uma sequência de experimentos em cultura de células que permite a triagem de produtos naturais promissores para as etapas seguintes de pesquisa. Principalmente com o uso de agentes indutores de danos que mais se assemelham à realidade da doença.

Finalmente, a leitura crítica dos artigos evidenciou a importância da descrição adequada dos métodos e dos resultados para a repetibilidade dos estudos. A ausência de parâmetros experimentais claramente reportados dificultou em vários momentos a interpretação dos resultados obtidos. Além disso, sem protocolos experimentais bem descritos, a reprodução dos experimentos e a comparação entre diferentes estudos em células para a seleção dos produtos naturais mais promissores para os estudos em animais e em humanos ficam prejudicadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

STEEB, Theresa et al. How to assess the efficacy of interventions for actinic keratosis? A review with a focus on long-term results. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, p 4736, 2021 2021;10 :4736.

JAROCH Karol, et al. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 297-312, 2018.

KRUTMANN J, et al. New strategies in the prevention of actinic keratosis: a critical review. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 28, p. 281-289, 2014.

MADDHESHIYA Sunita, et al. Essential oils for the treatment of skin anomalies: Scope and potential. *South African Journal of Botany*, v. 151, p. 187-197, 2022.

HAMMADI, Reham, et al. A. Ingot and Ingenol-Type Diterpenes from *Euphorbia trigona* Miller with Keratinocyte Inhibitory Activity, *Plants*, v. 10, p. 1206, 2021.

MALGORZATA Drag-Zalesińska, et al. The new esters derivatives of betulin and betulinic acid in epidermoid squamous carcinoma treatment – In vitro studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 72, p. 91-97, 2015.

MELAINE Laszczyk, et al. Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*Betulae Cortex*). *Planta Medica*, v. 72, p 1389-1395, 2006.

KIM, You Ah, et al. Anti-Inflammatory and skin-moisturizing effects of a flavonoid glycoside extracted from the aquatic plant *Nymphoides indica* in human keratinocytes. *Molecules*, v. 31, p. 2342, 2018.

SEULGI Hur, et al. Sargaquinoic acid and sargachromenol, extracts of *Sargassum sagamianum*, induce apoptosis in HaCaT cells and mice skin: Its potentiation of UVB-induced apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, v. 582, p. 1-11, 2008.

YIN, Jun, et al. Anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from *Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb. on UVB-irradiated human skin cells. *Molecules*, v. 24, p. 3094, 2019.