Artigo Original

# Avaliação por biópsias de couro cabeludo da atividade de novo ingrediente ativo natural, o "Cellium® GC", formulado em solução tópica de 210mg/mL

## *Cellium® GC: evaluation of a new natural active ingredient in 210 mg/ml topical solution, through scalp biopsy*

**Autores:**
Luís Carlos Cucé[1]
Consuelo J. Rodrigues[2]
Régia Celli R. Patriota[3]

[1] Professor titular emérito da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.
[2] Professora-associada da FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.
[3] Médica assistente do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

**Correspondência para:**
Dr. Luis Carlos Cucé
Av. Rebouças, 3963 - Pinheiros
05401 450 - São Paulo - SP
E-mail: atendimento@vitalmax.com.br

## RESUMO

**Introdução:** A alopecia androgênica é alteração progressiva do couro cabeludo com poucas opções terapêuticas. Justifica-se, portanto, a pesquisa de novas drogas de uso local ou sistêmico direcionadas ao controle desta patologia. Objetivo: Avaliar a tolerância e identificar o mecanismo de ação do composto Cellium® GC no tratamento da alopecia androgênica.

**Métodos:** Estudo prospectivo e aberto em 20 portadores de alopecia androgênica. O produto foi utilizado no couro cabeludo duas vezes ao dia em regime domiciliar por 12 semanas consecutivas. Foram realizadas biópsias antes e depois do tratamento para avaliar as alterações da resposta imune cutânea, da proliferação celular e da atividade antiapoptose. A avaliação da efetividade e do grau de satisfação dos pacientes foi realizada por meio de questionários.

**Resultados:** Dezenove voluntários do sexo masculino completaram o estudo, com grau médio de satisfação de 8,3/10. Análises imuno-histoquímicas das biópsias de couro cabeludo revelaram aumento significativo da resposta imune cutânea depois do tratamento: 73,9% de aumento de células de Langerhans CD1A+ (p = 0,003, teste t pareado), 41,66% de aumento de Ki-67+, marcador de proliferação celular (p = 0,012), 89% de aumento de proteínas antiapoptóticas BCL-2+ (p = 0,001). O produto também foi bem tolerado e seguro.

**Conclusões:** Cellium® GC melhora as defesas imunológicas da pele e a proliferação dos queratinócitos, e confere satisfação aos voluntários no tratamento da alopecia androgênica.

**Palavras-chave:** alopecia; biópsia;queratinócitos; minoxidil.

## *ABSTRACT*

***Introduction:*** *Androgenic alopecia is a progressive alteration of the scalp with few treatment options, which motivates the search for new local or systemic medications to control this pathology.*

***Objective:*** *To evaluate patient tolerance for and identify the action mechanism of the Cellium® GC compound in the treatment of androgenic alopecia.*

***Methods:*** *Male patients (n = 20) with androgenic alopecia participated in this open prospective study. The compound was used on the scalp twice a day, at home, for 12 consecutive weeks. Biopsies were carried out before and after treatment to evaluate the alterations in the cutaneous immune response, cellular proliferation and anti-apoptosis activity. Questionnaires were administered to evaluate efficacy and patient satisfaction.*

***Results:*** *Nineteen patients completed the study, with an average satisfaction of 8.3 out of 10. Immunohistochemical analyses of scalp biopsies showed a significant increase in the cutaneous immune response after treatment: 73.9% increase in CD1A+ Langerhans cells (p = 0.003, t paired test), 41.7% increase in the cellular proliferation marker Ki-67+ (p = 0.012), and an 89% increase in BCL-2+ anti apoptotic proteins (p = 001). The product was also found to be tolerable and safe. Conclusions: Cellium® GC improved the skin's immune defense and the proliferation of keratinocytes, and produced high levels of patient satisfaction in the treatment of androgenic alopecia.*

***Keywords:*** *alopecia; biopsy; keracinocytes; minoxidil.*

Recebido em 05/01/2011
Aprovado em 20/05/2011

Trabalho realizado no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

Conflitos de Interesses: Doação de medicamentos pelo Leggacy HealthCare Laboratório.
Suporte Financeiro: Doação de medicamentos pelo Leggacy HealthCare Laboratório.

## INTRODUÇÃO

A alopecia androgênica (AAG) é processo biologicamente natural sem impacto negativo sobre o estado clínico do ser humano sob circunstâncias normais, mas costuma ter impacto negativo sobre a qualidade de vida. Afeta mais de 50% dos homens aos 50 anos de idade[1] e também proporção significativa de mulheres. O desenvolvimento de AAG exige a interação de fatores genéticos e hormonais, tendo sido proposta etiologia multifatorial.[2]

Há duas drogas indicadas para o tratamento dessa condição que possuem evidência científica: minoxidil e finasterida; continua, porém, a pesquisa na busca de novas drogas com igual finalidade.[3]

Foi desenvolvido novo ingrediente ativo (Cellium® GC), combinação ativa extraída de plantas e usada como solução tópica para tratar perda excessiva de cabelos. Cellium® GC, na concentração de 210mg/mL, tem eficácia comprovada em prevenir a perda de cabelos e promover seu crescimento. Estudo clínico prévio comprovou que o Cellium® GC 210mg/mL aumenta significativamente o número de cabelos na fase anágena, diminui significativamente o número de cabelos na fase telógena, levando à normalização da proporção anágeno/telógeno depois de seis semanas de tratamento.[4] Além disso, outro estudo com pacientes do sexo masculino que apresentavam AAG, comprovou que a aplicação tópica de Cellium® GC no couro cabeludo tem sido bem tolerada, com alto grau de satisfação quanto a sua eficácia.[5]

Nesse contexto, tornou-se importante compreender o mecanismo de ação desse novo agente ativo. Quando testado in vitro nas células endoteliais, o Cellium® GC demonstrou estimular resposta de angiogênese6 e, em estudo in vivo, demonstrou aumentar significativamente a concentração de colágeno perifolicular.[5] No entanto, atualmente continua difícil ligar essas duas últimas atividades com a eficácia do medicamento ativo no crescimento dos cabelos e em sua perda, sendo necessárias, portanto, mais investigações.

O objetivo deste estudo foi identificar outros mecanismos de ação que pudessem ser responsáveis pela eficácia do Cellium® GC 210mg/mL no couro cabeludo de portadores de AAG. Investigou-se o efeito local do produto sobre as defesas imunológicas cutâneas, a proliferação de queratinócitos e a atividade antiapoptose.

## MÉTODOS

### Desenho do estudo

Neste estudo aberto prospectivo e monocêntrico de 12 semanas, cada participante foi sua própria testemunha.

### População estudada

Foram recrutados, no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de 14 de janeiro a 20 de junho de 2008, 20 voluntários com diagnóstico clínico de AAG. O estudo foi realizado de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinki, e as análises laboratoriais de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais, definidas pelos regulamentos Inmetro.

Os critérios de inclusão foram: sexo masculino, pele de fototipo II e III de Fitspatrick, idade entre 20 e 40 anos, portadores de AAG, Classificação Norwood-Hamilton modificada de I a VII, sem tratamento corrente com minoxidil ou finasterida ou tratamento com essas drogas suspenso pelo menos cinco meses antes do recrutamento, sem modificações dos costumes capilares e do penteado durante o estudo. Os critérios de exclusão foram: sexo feminino, tratamento corrente com minoxidil ou finasterida ou tratamento suspenso no prazo de cinco meses antes do recrutamento, alopecia iatrogênica ou traumática, uso concomitante de outros tratamentos no couro cabeludo, dermatite seborreica, psoríase ou qualquer dermatite no couro cabeludo.

## MÉTODOS

Cada voluntário assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tendo o estudo sido aprovado pelo Comitê de Ética do serviço. Foram planejadas duas consultas para exame clínico, coleta de dados e biópsia da pele do couro cabeludo: uma antes (S0) e uma 12 semanas (S12) depois do tratamento com Cellium® GC 210mg/mL.Também foram recolhidos, na S12, questionários preenchidos pelo investigador com base nas respostas orais dos voluntários e de suas famílias.

Os efeitos colaterais e a tolerância cosmética foram avaliados pelo investigador usando escala de 1 a 3 para intensidade e de 1 a 8 para exame dermatológico.

Foram realizadas biópsias da pele do couro cabeludo do vértice com *punch* de 4mm. As amostras foram fixadas com formalina tamponada com fosfato (pH 7,2) em temperatura ambiente, durante 24 horas, e depois imersas em parafina. Os cortes de parafina foram corados com solução de hematoxilina e eosina para exame histopatológico.

Os cortes longitudinais de 3Ìm das biópsias foram processados seguindo os métodos do complexo avidina-biotina-peroxidase.7 Resumindo, após a desparafinização, os cortes foram hidratados e incubados por 20 minutos em $H_2O_2$ a 0,3% em metanol para reduzir a atividade da peroxidase endógena. Os cortes foram incubados por uma noite a 4°C com os anticorpos primários (Dako, Glostrup, Dinamarca) diluídos em solução salina tritamponada (TBS) contendo 0,5% de solução com albumina sérica bovina. Os anticorpos primários usados para esse estudo foram: CD1A (célula de Langerhans), Ki-67 (proteína proaptótica), HSP-47 (proteína), BCL-2 (marcador proteico de proliferação celular). Os cortes foram então lavados duas vezes em TBS, depois incubados com anticorpo de cabra anticamundongo/coelho biotinilado (dueto Strept AVComplex/HRP, Dako A/S K492, Glostrup, Dinamarca). Depois de incubação de uma hora a 37°C com o segundo anticorpo, os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos) durante 30 minutos em temperatura ambiente, desenvolvidos com diaminobenzidina (Sigma, Barcelona, Espanha) e montados em Entellan (Merck 107961, Darmstadt, Alemanha). Foram em seguida contracorados com hematoxilina de Mayer durante dois

minutos. Todos os cortes histológicos foram processados simultaneamente para cada marcador. Os controles negativos foram cortes sem anticorpo primário. Os controles positivos foram cortes de outros tecidos com reações positivas para o anticorpo específico.

A análise microscópica foi realizada usando câmera Sony CCD ligada a microscópio óptico Zeiss Axioplan, sendo as imagens processadas pelo software Kontron 300 (Zeiss, Feldbach, Suíça). Dez campos diferentes foram aleatoriamente selecionados, e a área da derme foi determinada por análise de imagens (ampliação de 200 x). Foi estabelecido, para cada lâmina, o nível limiar para reações imuno-histoquímicas, depois de realçar o contraste até o ponto em que as células foram facilmente identificadas. A área ocupada pelas células foi determinada por reconhecimento densitométrico digital, ajustando-se o nível limiar de medida até a densidade cinza.

## TRATAMENTO

O investigador forneceu a cada voluntário seu próprio tratamento em sua apresentação comercial (sem randomização, sem rotulação de código). Consistiu em dois frascos de vidro claro com 110mL com sistema de bombeamento contendo solução acastanhada (Legacy HealthCare Laboratory, Epalinges, Suíça). Especialmente, a solução contém 210mg/mL de Cellium® GC, combinação de princípios ativos extraídos de *Allium cepa*, *Citrus Medica Limonum*, *Paullinia Cupana* e *Theobroma Cacao*. O tratamento iniciou-se no dia depois de S0, borrifando em casa, no couro cabeludo seco ou molhado, 1mL da solução tópica duas vezes ao dia aproximadamente em intervalos de 12 horas (dose diária total de 2mL) durante 12 semanas. Ensaios clínicos prévios[4] mostraram que a dose-alvo eficiente é de 1mL duas vezes ao dia. A avaliação da adesão ao tratamento foi feita pelo consumo do produto para cada paciente.

### Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do teste t pareado, análise de variância unidirecional, teste de Kruskal-Wallis e teste de Tukey e o método de Dunnett, usando software SigmaStat (Jandel Corporation, Califórnia, Estados Unidos) para as análises imuno-histoquímicas. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

## RESULTADOS

Foram recrutados 20 participantes no estudo. Sua média de idade foi de 32,5 anos (23 a 40). Cinco participantes recusaram ser biopsiados na S12, um dos quais não respondeu ao questionário de eficácia. Todos os participantes aplicaram a solução tópica duas vezes ao dia, como programado. O consumo diário médio de Cellium® GC foi de 1,45g (0,87 a 1,95g).

As análises dos questionários (n = 19) indicaram boa eficácia no crescimento de cabelos, conforme relatado pelos voluntários, bem como por suas famílias. O grau de satisfação do produto pelos voluntários chegou à média de 8,3/10. A avaliação dos voluntários mostrou boa efetividade e aceitação cosmética, já que:

– 90% dos participantes observaram novo crescimento de cabelos;

– 63% a 73% dos participantes observaram crescimento mais rápido dos cabelos;

– 84% dos participantes observaram mais cabelos;

– 68% dos participantes tiveram sensações agradáveis depois da aplicação;

– 65% dos participantes classificaram o produto como bom ou muito bom.

Com referência à consideração de segurança, os exames dermatológicos do couro cabeludo na S0 e na S12 não mostraram reação adversa.

As biópsias da pele do couro cabeludo mostraram epiderme com espessura normal e infiltrado inflamatório de células mononucleares em tornos dos vasos e anexos (n = 15). Também se observou elastose na derme. São detalhadas a seguir as análises histomorfométricas dos cortes de biópsias, quando processados com os vários biomarcadores estudados, a saber, os anticorpos para a detecção de células de Langerhans CD1a+, de células Ki-67, de células HSP47+ e de células BCL-2+. Os dados apresentados incluem aumento das porcentagens com significância estatística e microfotografia dos cortes das biópsias.

A análise das células de Langerhans CD1A+ tem sido realizada por meio da determinação da fração de células CD1A+ de Langerhans na epiderme. Houve aumento estatisticamente significativo de 73,9% da fração de células de Langerhans CD1A+ na epiderme depois do tratamento com a solução tópica Cellium® GC 210mg/mL ($p = 0,003$, teste t pareado) (Tabela 1 e Figura 1). Esse resultado foi confirmado pelo teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,003$).

A análise das células Ki-67+ foi realizada por meio de determinação da fração de células Ki-67+ na epiderme. Houve aumento estatisticamente significativo de 41,7% da fração de células Ki-67+ na epiderme depois do tratamento com a solução tópica Cellium® GC 210mg/mL ($p = 0,012$, teste t pareado) (Tabela 2 e Figura 2). Esse resultado foi confirmado pelo teste Anova ($p = 0,003$) e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise das células HSP47+ foi realizada por meio da determinação da fração das células HSP47+ na derme. Não se observaram diferenças estatísticas na fração de células HSP47+ na derme antes e depois do tratamento com a solução tópica Cellium® GC 210mg/mL ($p = 0,938$, teste t pareado) (Tabela 3 e Figura 3). Esse resultado foi confirmado pelo teste Anova ($p = 0,942$).

**Tabela 1: Fração de células CD1A+ de Langerhans na epiderme antes e depois do tratamento em 15 participantes**

| Parâmetro | Média (%) | DP |
|---|---|---|
| Fração de Langerhans CD1A+ pré-tratamento | 7,3 | 2,23 |
| Fração de Langerhans CD1A+ pós-tratamento | 12,7 | 5,55 |

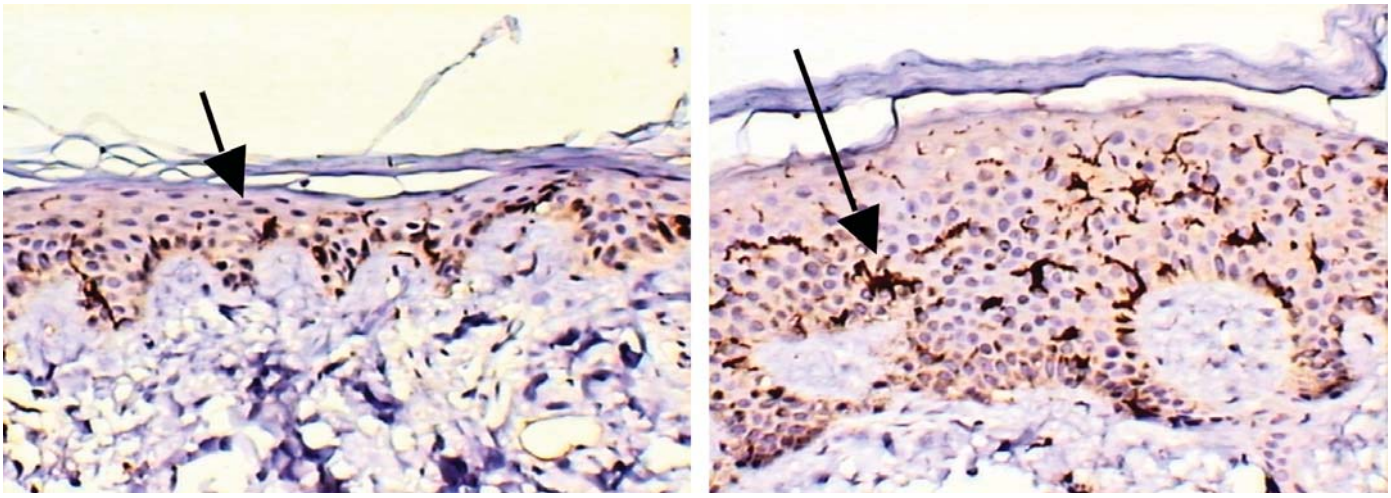

**Figura 1:** Fração de células CD1A+ de Langerhans (setas) na epiderme do paciente 9 antes e depois do tratamento

**Tabela 2: Fração de células Ki-67+ na epiderme antes e depois do tratamento em 15 participantes**

| Parâmetro | Média (%) | DP |
|---|---|---|
| Fração de células Ki-67+ pré-tratamento | 12 | 4,17 |
| Fração de células Ki-67+ pós-tratamento | 17,8 | 5,69 |

A análise das células BCL-2+ foi realizada por meio da determinação da fração de células BCL-2+ na epiderme. Houve aumento estatisticamente significativo de 89% da fração de células BCL-2+ na epiderme antes e depois do tratamento com a solução tópica Cellium® GC 210mg/mL ($p = 0,001$, teste t pareado) (Tabela 4 e Figura 4). Esse resultado foi confirmado pelo teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,006$), bem como pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

## DISCUSSÃO

A aplicação da solução tópica com Cellium® GC 210mg/mL duas vezes por dia ao longo de 12 semanas não foi seguida de aumento da resposta das proteínas do choque térmico ou da chaperona do procolágeno HSP47. Sabe-se que esta última proteína é expressa em células inflamatórias. Foram observadas apenas poucas células inflamatórias na derme durante o estudo. Esse resultado também foi observado por Keagle et al.[8] Isto é consistente com resposta de células inflamatórias observada no transcorrer do estudo com localização difusa de células HSP47+ na derme, principalmente em torno dos vasos. Os resultados do estudo também demonstraram que uma aplicação de 12 semanas da solução tópica de Cellium® GC 210mg/mL foi seguida de aumento das células de Langerhans que pertencem ao sistema de defesa das células da pele. Além disso,

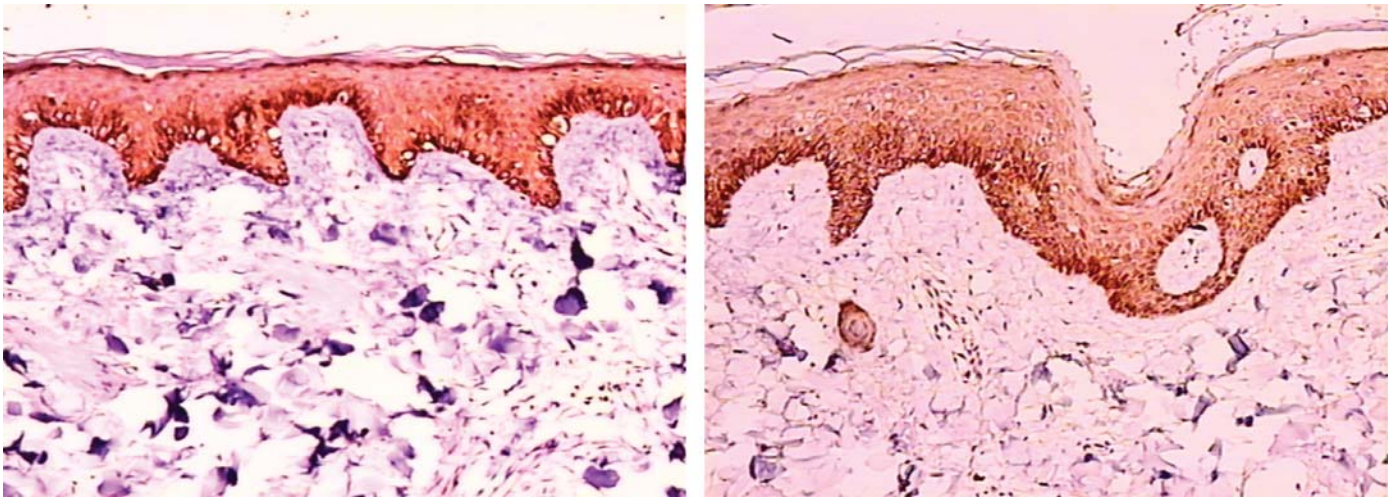

**Figura 2:** Fração de células Ki-67+ na epiderme (marrom) do paciente 19 antes e depois do tratamento

**Tabela 3: Fração de células HSP47+ na derme antes e depois do tratamento em 15 participantes**

| Parâmetro | Média (%) | DP |
|---|---|---|
| Fração de células HSP47+ pré-tratamento | 6,6 | 1,77 |
| Fração de células HSP47+ pós-tratamento | 6,7 | 2,08 |

**Tabela 4: Fração de células BCL-2+ na epiderme antes e depois do tratamento em 15 participantes**

| Parâmetro | Média (%) | DP |
|---|---|---|
| Fração de células BCL-2+ pré-tratamento | 1,722 | 0,786 |
| Fração de células BCL-2+ pós-tratamento | 3,235 | 1,62 |

observou-se aumento das células Ki-67+, que representa índice proliferativo. As células Ki-67+ da epiderme normal humana se restringem principalmente às camadas de células suprabasais. Neste estudo, observou-se que tais células se dispersavam por todas as camadas de células suprabasais ou se aglomeravam em áreas específicas, como também mencionado por Tilli et al.[9]

Sabe-se que a BCL-2 é proteína citoplasmática fundamental como reguladora da apoptose. A BCL-2 promove sobrevida das células por inibição dos mediadores necessários para ativação das proteases (caspases).[10] A BCL-2 pode representar mecanismo de sobrevida essencial para melanócitos normais, em correlação

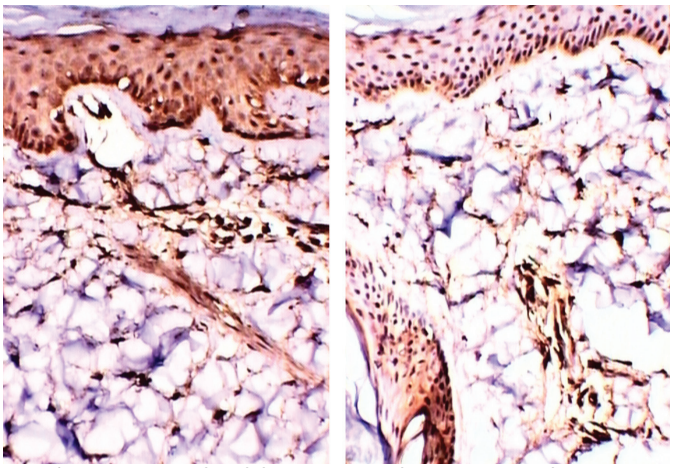

**Figura 3:** Fração de células HSP47+ na derme em torno dos vasos sanguíneos do paciente 16 antes e depois do tratamento

com sua derivação da crista neural.[11] A regulação da sobrevida e da morte das células, em vários tipos celulares, incluídos os melanócitos, poderia envolver interação dinâmica entre os aceleradores da apoptose, como Bax, e os repressores da apoptose, como BCL-2.[12] A expressão exagerada de BCL-2 se associa à parada acelerada em G1 ou retardo da transição G1/S.[13] Na condição do estudo, observou-se aumento significativo da expressão de BCL-2 na epiderme, provavelmente envolvendo a atividade dos melanócitos. Esse resultado pode ser estendido às células dos folículos pilosos, de modo que o aumento da atividade proliferativa, juntamente com a atividade antiapoptótica, pode promover o crescimento dos cabelos. No entanto, em condições de pele normal, verificou-se que o marcador de proliferação Ki-67 se associa significativamente ao marcador proapoptótico p53. Em pele com alta radiação solar UV, porém, Ki-67 se associa ao marcador antiapoptótico BCL-2. Esse desequilíbrio de sinalização proliferativa/apoptótica pode levar a epiderme disfuncional que permita proliferação aberrante. Em resposta aos agentes genotóxicos, p53 do tipo selvagem se acu-

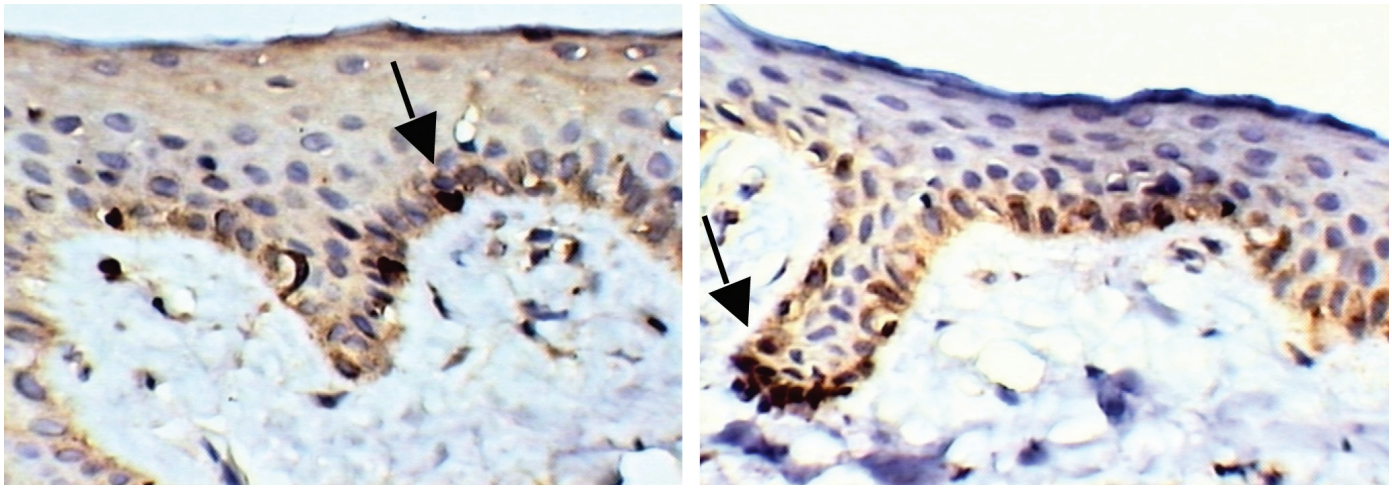

**Figura 4:** Fração de células BCL-2+ (seta) na epiderme do paciente 5 antes e depois do tratamento

mula e induz apoptose. Sugere-se então investigar a expressão do marcador proapoptótico p53 quando for aplicado o tratamento com a solução tópica com Cellium® GC 210mg/mL.

## CONCLUSÃO

Em vista dos resultados obtidos nas condições do estudo, a aplicação da solução tópica com Cellium® GC 210mg/mL duas vezes ao dia no couro cabeludo por 12 semanas consecutivas por 19 voluntários do sexo masculino com AAG, correspondendo ao estádio I a VII da Classificação de Norwood-Hamilton modificada, mostrou dar satisfação aos participantes quanto ao crescimento dos cabelos, com grau médio de satisfação de 8,3/10. Além da avaliação subjetiva, análises imuno-histopatológicas de biópsias da pele do couro cabeludo revelaram aumento das defesas imunológicas da pele, da proliferação e das atividades anti-apoptose dos queratinócitos na derme e na epiderme. A análise completa das avaliações clínicas e subjetivas permite considerar bem tolerada, segura e eficiente essa combinação de ingredientes ativos extraídos de plantas e apresentada na forma de solução. Consequentemente, considera-se essa solução tópica com Cellium® GC 210mg/mL boa alternativa aos tratamentos da AAG. ●

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao laboratório Legacy HealthCare pela contribuição com medicamentos para o estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Hamilton JB. Patterned loss of hair in man: types and incidence. Ann NY Acad Sci. 1951; 53(3):708-728.
2. Küster W and Happle R. The inheritance of common baldness: two B or not two B?. J Am Acad Dermatol. 1984; 11(5):921-6.
3. Blume-Peytavi U, Tosti A, Whiting DA. Male androgenetic alopecia. In: Blume-Peytavi U, Tosti A, Whiting DA, editors. Hair growth and disorders. Berlin: Springer; 2008. p. 159-70.
4. Casoli A. AMANA™ Cellium® GC Clinical Efficacy by Phototrichogram on Alopecia male patients, 3 months - "ACEPA 3". Assessment of effectiveness of a capillary treatment for hair loss used under normal conditions for 12 consecutive weeks, by the phototrichogram method. Clinical report AMANA™ Cellium® GC 210 mg/mL No. "ACEPA 3". Martillac, France: Institut Dermatologique d'Aquitaine (IDEA); 2007 June 29.
5. Cucé LC, Rodrigues CJ and Patriota RCR. Clinical Efficacy by Biopsies on Alopecia male patients, 4 months - "CEBA 4". Clinical report No. "CEBA 4". São Paulo, Brazil: Departamento de Dermatologia e Serviço de Inestética – LIM 02 – HC-FMUSP; 204 Dec 13.
6. Matheson HB. Cellium® GC In Vitro Angiogenic Response - "CIVAR". Evaluation of the angiogenic activity of test compounds in AngioKit assays performed for Kasan by TCS Cellworks, Ltd. Study report No. TCS06-0110. Buckingham: TCS Cellworks; 2006 Jul 05.
7. HSU SM, Raine L and Fanger H. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem. 1981; 29(4):557-80.
8. Keagle JN, Welch WJ and Young DM. Expression of heat shock proteins in a linear rodent wound. Wound Repair Regen. 2001; 9(5):378-85.
9. Tilli C, Ramaekers FCS, Broers JLV. Lamin expression in normal human skin; actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. Br J Dermatol. 2003; 148(1):102-9.
10. Adams JM and Cory S. The Bcl-2 family: arbiters of cell survival. Science. 1998; 281(5381):1322-6.
11. Soengas MS and Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. Oncogene. 2003; 22(20):3138-51.
12. Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 1993; 74(4):609-19.
13. Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C et al. Control of proliferation by Bcl-2 family members. Biochim Biophys Acta. 2003; 1644(2-3):159-68.