

# SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO RICO EM EPA NÃO ALTERA PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS

Palavras-Chave: ÔMEGA-3, CICATRIZAÇÃO, NUTRIÇÃO

Autores/as:

Iara Olinda dos Reis (Autor/a) [UNICAMP]

Beatriz Burger (coautor/a) [UNICAMP]

Jéssica Rondoni Silva (coautor/a) [UNICAMP]

Roberta Nicolli Sagiorato (coautor/a) [UNICAMP]

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hosana Gomes Rodrigues (orientador/a) [UNICAMP]

---

## INTRODUÇÃO:

A suspensão das atividades presenciais devido à pandemia causada pelo novo coronavírus, (Sars-Cov-2), refletiu em uma série de desafios. Além da suspensão das aulas, nos deparamos com a impossibilidade de iniciar as práticas laboratoriais deste projeto de pesquisa. Assim, optamos por apresentar dados de um projeto antecedente a pandemia, onde tive participação, o projeto tem como título: *Efeitos da suplementação com ácido graxo ômega-3 eicosapentaenoico (EPA) na cicatrização de feridas em camundongos diabéticos*.

O processo de cicatrização, embora seja essencial para a vida, pode vir a ser atrasado devido algumas condições patológicas, podendo gerar feridas crônicas, ou seja, que não evoluam para a restauração anatômica e funcional do tecido dentro do prazo esperado e também, podem apresentar agravos, como processos infecciosos (LAZARUS, et al. 1994). Dentre essas condições patológicas, encontram-se os indivíduos com *Diabetes Mellitus*, cuja prevalência tem aumentado a cada ano (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, et al. 2010). Essa doença metabólica já afeta cerca de 340 milhões de pessoas no mundo todo, e cerca de 20% desses indivíduos desenvolvem feridas diabéticas, que podem evoluir para a amputação (PATEL, et al. 2019).

Atualmente, têm crescido as investigações do efeito de nutrientes imunoreguladores no reparo tecidual, capazes de reduzir os riscos de complicações e os custos clínicos associados aos cuidados (CHOW,; BARBUL, 2014). Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) são exemplos de imunonutrientes que têm sido estudados no contexto da cicatrização de feridas, principalmente ômega-3 e 6.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou artigos sobre os efeitos dos ácidos graxos docosaheptaenoico (DHA; 22:6) e eicosapentaenoico (EPA, 20:5), principais

componentes do ômega-3, e seus efeitos na cicatrização de feridas em camundongos saudáveis (BURGER et al, 2019 e CANDREVA et al, 2019). Porém, os efeitos da suplementação na presença do diabetes, doença caracterizada por uma piora do reparo tecidual, são escassos. Tendo em vista a importância da otimização da cicatrização, na presença do diabetes, estudos sobre os efeitos da suplementação com ômega-3 são importantes.

## **METODOLOGIA:**

### **Animais**

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP.

### **Indução do diabetes**

Após jejum de 4 horas, o diabetes foi induzido nos camundongos, com 8 semanas de idade, através da administração intraperitoneal de 5 doses (45 mg/kg) diárias e consecutivas de estreptozotocina (STZ, Sigma Aldrich®, San Luis, Missouri, EUA) diluída em tampão citrato de sódio (pH 4.2) (MEYEROVICH, et al. 2017 e FIDLER, et al. 2019). Os animais controles receberam injeções diárias de tampão citrato de sódio. Os animais foram considerados diabéticos com níveis glicêmicos acima de 240 mg/dL. Dez dias após a indução do diabetes, iniciamos a suplementação com óleo rico em EPA.

### **Administração de óleo rico em EPA**

Durante 4 semanas os animais receberam, diariamente, suplementação oral com óleo rico em EPA (2g/Kg de peso corporal, 50 µL de óleo) no mesmo horário por pseudogavagem utilizando pipeta monocanal mecânica (10-100 µL, Eppendorf®).

### **Determinação de parâmetros bioquímicos e nutricionais**

A glicemia inicial foi aferida 10 dias após o início da indução do diabetes (no mesmo dia do início da suplementação), no dia da realização da ferida, nos dias das fotos (1, 3, 7, 10 e 16 dias após a indução da ferida) e no dia do sacrifício do animal. A partir do primeiro dia de suplementação, o consumo de ração e água foi medido 3 vezes na semana e o peso corporal foi medido uma vez na semana, sempre no mesmo horário.

### **Realização da ferida**

Após 4 semanas de administração do óleo rico em EPA, os animais foram anestesiados com ketamina (139,2 mg/Kg de peso corporal) e xilazina (18,4 mg/Kg de peso corporal) e uma área de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e 5 mm de profundidade da pele, foi removida cirurgicamente, da região dorsal. Camundongos de cada grupo foram eutanasiados nos tempos 1, 3, 10 e 16 dias após a realização das feridas. O tecido coletado no momento da realização da ferida é nomeado de pele sem lesão (0 hora).

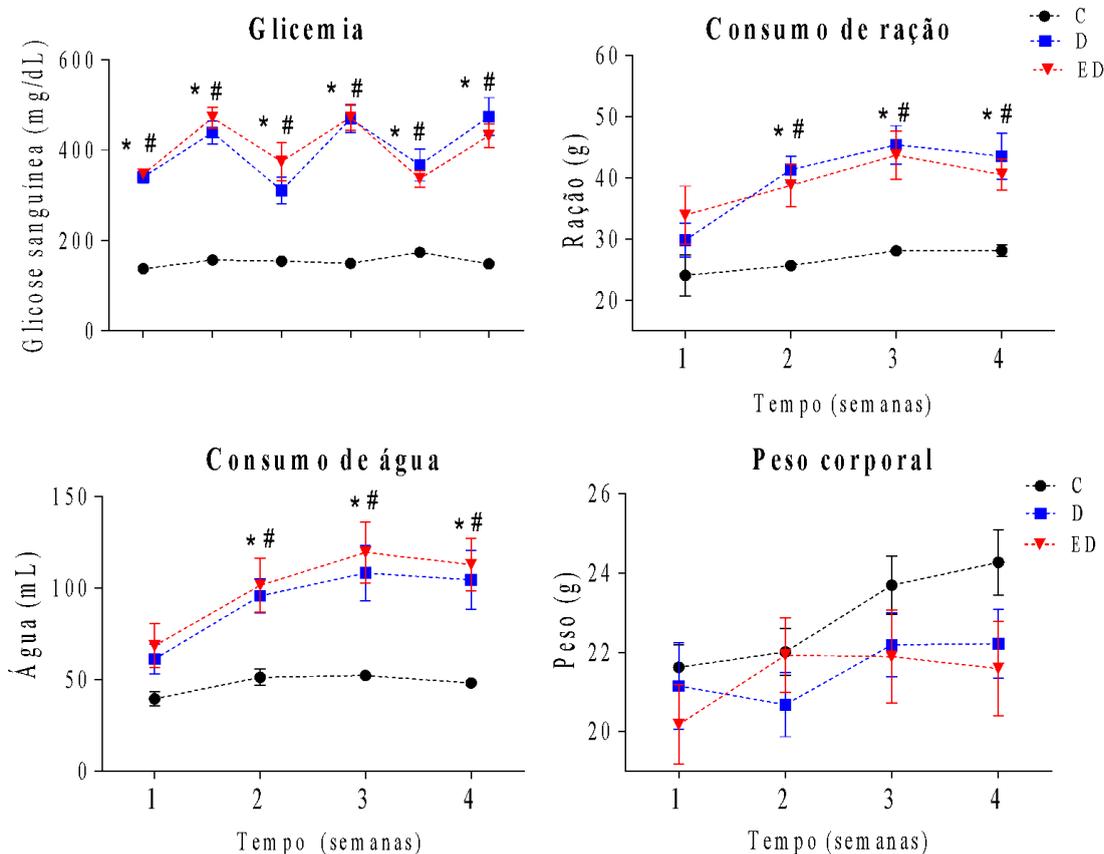
## Análise macroscópica

Para avaliar o fechamento das feridas, as mesmas foram fotografadas diariamente com câmera digital Sony® cyber-shot (DSC-S950S 4X 10MP com zoom ótico) pelo mesmo examinador. Após a digitalização, a área da ferida foi medida utilizando o *software Image J* (National Institute of Mental Health -NIH) de maneira cega, ou seja, o avaliador não sabia quem eram os grupos. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) da área da ferida original (0 hora).

## RESULTADOS:

### Suplementação com óleo rico em EPA não alterou a glicemia, ingestão de ração, água e o peso dos animais diabéticos

Os animais dos grupos diabético (D) e diabético tratado com óleo rico em EPA (ED) apresentaram glicemia, consumo de ração e água maiores que os animais do grupo controle (C). Entretanto, não houve diferença no peso dos animais (**Figura 1**).



**Figura 1. Glicemia (mg/dL), consumo de ração (g), água (mL) e peso corporal (g) de animais controle (C, linha preta); diabéticos (D, linha azul); diabéticos suplementados com óleo rico em EPA (ED, linha vermelha).** A glicemia inicial corresponde à glicemia aferida 10 dias após a indução do diabetes com STZ. A glicemia 0 hora (0h) corresponde à glicemia no momento da indução da ferida. As demais glicemias foram aferidas nos dias das fotos das feridas, ou seja, 1, 3, 7 e 10 dias após a indução da ferida. A ração e a água foram medidas 3 vezes na semana, sendo que no gráfico é apresentado uma média semanal durante as 4 semanas de suplementação. O peso foi medido semanalmente e no gráfico temos a média do peso dos grupos durante as 4 semanas de suplementação (n: 4-8 C, 4-7 D, 5-9 ED). Valores são expressos como

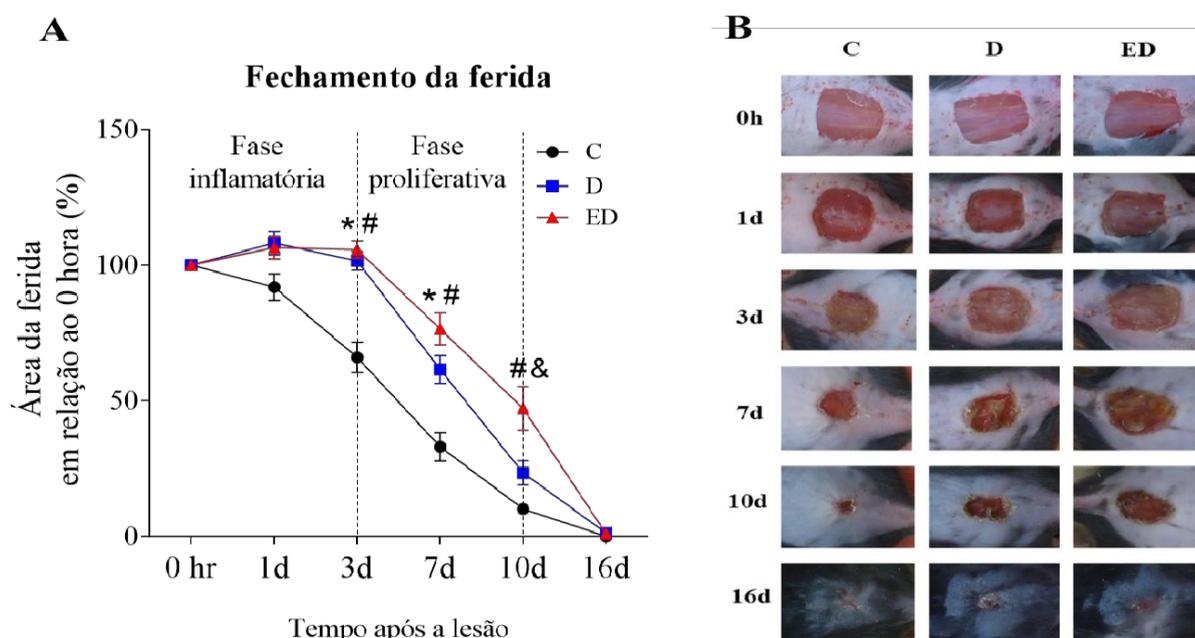
média  $\pm$  erro padrão da média, sendo considerados significativos valores de  $p < 0.05$ , (\*) C versus D; (#) C versus ED, por Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

## Óleo rico em EPA prejudica o processo de cicatrização em camundongos diabéticos

Os animais diabéticos apresentaram atraso no fechamento da ferida 3 e 7 dias após a lesão tecidual, quando comparados aos animais controle (**Figura 2A**).

No 3°, 7° e 10° dia após a indução das feridas, o grupo ED apresentou percentual da área da ferida maior do que os animais C. Por outro lado, o grupo ED atrasou o fechamento da ferida no 10° dia em comparação ao grupo D (**Figura 2A-B**). No 16° dia após a indução da ferida, todos os animais tinham fechado a ferida, macroscopicamente (**Figura 2A-B**).

Desta forma, a suplementação de óleo rico em EPA atrasou o processo de cicatrização até o 10° dia nos animais diabéticos.



**Figura 2. Fechamento macroscópico da ferida e fotos representativas. (A)** Percentual da área de ferida em relação ao 0 hora (%) e fotos representativas nos tempos 1, 3, 7, 10 e 16 dias (n: 4-8 C, 10 D, 6-11 ED). **(B)** Fotos representativas. Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo considerados significativos valores de  $p < 0.05$ , (\*) C versus D; (#) C versus ED; (&) D versus ED por One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

## DISCUSSÃO:

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com óleo rico em EPA sobre o processo de cicatrização em camundongos diabéticos. Os resultados demonstraram que houve um atraso maior do processo cicatricial até o 10° dia após a lesão nos animais diabéticos suplementados com óleo rico em EPA quando comparados aos animais controles e diabéticos, sugerindo assim um efeito prejudicial do EPA sobre o processo de cicatrização em animais diabéticos.

Esses efeitos observados na cicatrização de feridas podem estar relacionados aos diversos mecanismos de ação dos ácidos graxos ômega-3, como: alteração da composição dos fosfolípidios de membrana, e consequente modificação da fluidez; alteração da sinalização celular; produção de mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio e produção de citocinas. Tais mecanismos podem influenciar desde a pele em seu estado basal, até qualquer etapa do processo de cicatrização, da inflamação ao remodelamento (MCDANIEL,; MASSEY,; NICOLAOU, 2011).

Entretanto, sabe-se também que a proliferação e migração de queratinócitos na pele diabética são atenuadas em ambientes com alto teor de glicose, indicando que o fechamento da ferida é desacelerado na pele diabética (NGUYEN,; SOULIKA, 2019). Porém, ainda é necessário mais estudos sobre as vias moleculares que interrompem a fase inflamatória fisiológica durante o reparo, assim como, mais pesquisas com o intuito de esclarecer os efeitos dos imunonutrientes no processo de cicatrização em diabéticos.

## CONCLUSÕES:

A suplementação de óleo rico em EPA prejudicou o processo de reparo da pele, em animais diabéticos. Sendo que a suplementação com óleo rico em EPA não afetou parâmetros nutricionais de camundongos diabéticos.

## BIBLIOGRAFIA:

- \*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 33, n. Supplement 1, p. S62-S69, 2010.
- \*BURGER, B. et al. Oral administration of EPA-rich oil impairs collagen reorganization due to elevated production of IL-10 during skin wound healing in mice. **Sci. Rep.** 9, 1–13, 2019.
- \*CANDREVA, Thamiris et al. O ácido docosahexaenóico retarda a resolução da inflamação e prejudica a qualidade do tecido cutâneo cicatrizado. **Clinical Science** , v. 133, n. 22, pág. 2345-2360, 2019.
- \*CHOW, Oliver; BARBUL, Adrian. Immunonutrition: role in wound healing and tissue regeneration. **Adv. Wound Care**, v. 3, n. 1, pág. 46-53, 2014.
- \*FIDLER, T. P. et al. Glucose Metabolism Is Required for Platelet Hyperactivation in a Murine Model of Type 1 Diabetes. **Diabetes**. 68, 932–938, 2019.
- \*KABASHIMA, Kenji et al. The immunological anatomy of the skin. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 1, p. 19-30, 2019.
- \*LAZARUS, Gerald S. et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Wound repair and regeneration**, v. 2, n. 3, p. 165-170, 1994.
- \*MCDANIEL, Jodi C.; MASSEY, Karen; NICOLAOU, Anna. Fish oil supplementation alters levels of lipid mediators of inflammation in microenvironment of acute human wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 2, p. 189-200, 2011.
- \*MEYEROVICH, K. et al. MCL-1 is a key antiapoptotic protein in human and rodent pancreatic  $\beta$ -cells. **Diabetes** 66, 2446–2458, 2017.
- \*NGUYEN, Alan V .; SOULIKA, Athena M. A dinâmica do sistema imunológico da pele. **Jornal internacional de ciências moleculares** , v. 20, n. 8, pág. 1811, 2019.
- \*PATEL, Satish et al. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108615, 2019. MCDANIEL, Jodi C.; MASSEY, Karen; NICOLAOU,