

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO ÁCIDO GRAXO OLEICO (OA) NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO DIABETES EXPERIMENTAL.

Palavras-Chave: [CICATRIZAÇÃO], [DIABETES], [ÁCIDO GRAXO OLEICO]

Autoras:

HELENA ENGELMANN LUNKES [FCA-UNICAMP]

BEATRIZ BURGER (co-autora) [FCA-UNICAMP]

JESSICA RONDONI SILVA (co-autora) [FCA-UNICAMP]

ROBERTA NICOLLI SAGIORATO (co-autora) [FCA-UNICAMP]

Prof^a. Dr^a. HOSANA GOMES RODRIGUES (orientadora) [FCA-UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A pele é um órgão composto por várias camadas celulares que formam uma barreira entre os meios interno (os órgãos) e externo (o ambiente), prevenindo a desidratação e protegendo o corpo da entrada de microrganismos e de outras agressões externas. Dessa forma, é um órgão vulnerável a diversas lesões, como as feridas, o que torna o processo de cicatrização imprescindível para o reparo e restabelecimento do tecido (PEREIRA; BARTOLO, 2016). Apesar de ser um processo evolutivamente conservado, devido a sua essencialidade, fatores como envelhecimento e presença de diabetes podem dificultar a cicatrização predispondo o indivíduo a infecções que podem levar à morte.

Os prejuízos na cicatrização em pacientes diabéticos estão relacionados à hiperglicemia, inflamação crônica, disfunção vascular, neuropatia e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses fatores levam à abundância de neutrófilos, alteração no fenótipo de macrófagos e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias na fase inicial do processo de cicatrização. Além disso, a fase proliferativa é marcada por disfunção endotelial, prejuízos na angiogênese, baixa proliferação, diferenciação e migração de fibroblastos e queratinócitos e redução dos níveis de fatores de crescimento (BALTZIS *et al.*, 2014). Durante o remodelamento do tecido, o desequilíbrio entre a síntese e degradação das metaloproteinases (MMPs) e dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) prejudica a estruturação adequada da matriz extracelular através da degradação excessiva do tecido neoformado (LIMA; ARAÚJO, 2013).

Assim, entender os mecanismos que controlam a cicatrização de feridas cutâneas na presença do diabetes é fundamental para a proposição de novas terapêuticas. Neste sentido, a administração oral de ácidos graxos têm demonstrado efeitos benéficos durante o reparo tecidual. Estudos sugerem que ácidos graxos possuem papel importante na resposta imunológica através de alterações nas membranas lipídicas, modulando a sinalização celular e a capacidade imunológica do organismo (CHOW; BARBUL, 2013), sendo capazes de atuar no processo inflamatório dependendo do seu tipo, dose, concentração e condição. O tratamento com ácido oleico pode atuar no remodelamento do tecido, sendo importante ferramenta no tratamento de feridas cutâneas. Diante disso, torna-se fundamental esclarecer os efeitos de nutrientes

imunomoduladores sobre o processo de cicatrização, a fim de reduzir a exacerbação do processo inflamatório em úlceras diabéticas (CHOW; BARBUL, 2013).

Entretanto, apesar de estudos demonstrarem a importância do ácido oleico durante o reparo tecidual, ainda não é bem descrito os efeitos dessa suplementação na cicatrização de feridas cutâneas em indivíduos diabéticos.

METODOLOGIA:

Indução de diabetes, suplementação oral com ácido oleico e indução da ferida:

Camundongos C57black/6 machos foram divididos em três grupos: (C) controle; (D) animais diabéticos induzido por estreptozotocina (STZ); e (DOA) animais diabéticos que receberam OA (50 µL) por gavagem oral. Para a indução do diabetes, utilizamos protocolo de 5 doses consecutivas de estreptozotocina (45 mg/Kg de peso corporal) (MEYEROVICH et al., 2017; TAN et al., 2019).

Após a confirmação do diabetes (glicemia > 240mg/dL), os animais foram suplementados oralmente com OA puro (50µL) durante 5 dias. Após o período de suplementação, os animais foram submetidos à cirurgia de indução da ferida na região dorsal. Foram avaliados o fechamento macroscópico das feridas por fotos, bem como a qualidade do tecido cicatrizado por análises de Sirius Red. Paralelamente, avaliamos a produção temporal de mediadores inflamatórios no tecido cicatricial, por ELISA. Os dados advindos deste projeto poderão influenciar a proposição de novas terapêuticas para o tratamento de feridas de difícil cicatrização, principalmente em indivíduos diabéticos.

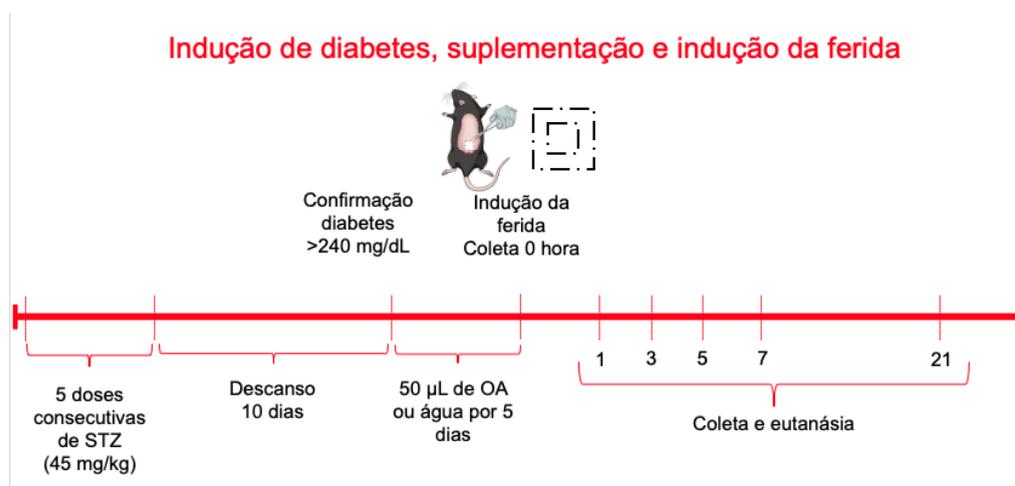


Figura 1: Desenho experimental. Animais dos grupos D e DOA foram submetidos à indução de diabetes com 5 doses consecutivas de STZ (45mg/kg) durante 5 dias. Após 10 dias do fim da aplicação de STZ, a presença de diabetes foi confirmada nos animais com glicemia > 240mg/dL. Em seguida, os animais foram suplementados com 50µL de AO (DOA) ou água (D e C) durante 5 dias. No 5º dia, foi realizada a coleta de tecido de 0 hora e, em seguida, coletas de 3 dias, 5 dias, 7 dias e 21 dias.

Análise do fechamento da ferida

A fim de avaliar macroscopicamente o fechamento das feridas, elas foram fotografadas nos diferentes tempos de seguimento (0 hora e 1, 3, 7, 10, 14 dias) após a lesão. Para a análise, a área da ferida foi medida através do *software Image J (National Institute of Mental Health -NIH)*, no qual os resultados foram expressos em porcentagem (%) em relação à área inicial da ferida (0 hora).

Análise histológica

O tecido cicatricial de 7 dias foi coletado, fixado em formaldeído 4% em solução tampão de fosfato 0,1M (pH 7,4), durante 24 horas à 8°C, desidratado em bateria de álcool de concentração crescente (50 ao 100%), clarificado em xilol e incluído em parafina (Paraplast-Sigma®). Secções de 5 µm em parafina foram então reidratadas em bateria de álcool de concentração decrescente (100 ao 70%) e coradas com Sirius Red para avaliar a organização das fibras colágenas. Os materiais foram documentados em microscópio estereoscópico Leica® (MZ10F) acoplado a câmera Leica® (DFC310 FX) e Microscópio Olympus® ((U-LH100HG) com imagens representativas das estruturas histológicas registradas no sistema de captura e análise de imagens digitais (Câmera: Olympus® / U-TVO.63XC / T2).

Homogeneização dos tecidos cicatriciais para determinação de citocinas:

Os tecidos coletados nos períodos de 3, 5 e 7 dias após a indução das feridas foram imediatamente acondicionados em gelo seco e mantidos no freezer (-80°C) até serem homogeneizados. Para homogeneização, foi preparado tampão PBS com inibidores de proteinases (Complete Cocktail protease inhibitor, Roche, Mannheim, Germany). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C. A produção de citocinas (CXCL-1, CXCL-2, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 e VEGF) foi avaliada através do método de ELISA utilizando o Kit Duo Set (R&D System, Mineapolis, MN, USA). Os valores foram normalizados pela quantidade de proteínas nas amostras, determinada pelo método de Bradford (1976).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na **Figura 2**, pode-se observar que o fechamento das feridas foi prejudicado no grupo D quando comparado ao grupo C nos dias 3, 5 e 7, confirmando as condições já conhecidas de atraso na cicatrização das feridas diabéticas. Contudo, quando se compara os grupos D e DOA, observa-se que a suplementação com ácido oleico (OA) melhorou o fechamento das feridas em animais diabéticos, com redução significativa da área nos tempos de 3, 5 e 7 dias.

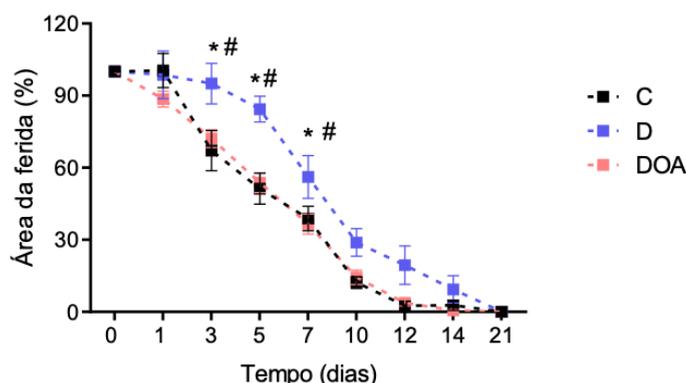


Figura 2: Área das feridas (%) em relação à área inicial da ferida (0 hora) nos tempos 0 hora, 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias, 14 dias e 21 dias. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média, considerando-se diferença significativa com $p < 0,05$, por two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. (*) indica diferença significativa entre C e D; (#) indica diferença significativa entre D e DOA.

Na **Figura 3**, observa-se os aspectos macroscópicos das feridas apresentadas na **Figura 2**. Pode-se observar menor área de ferida nos grupos C e DOA em relação ao grupo D nos tempos 3, 5 e 10 dias. No 14º dia, as feridas estavam completamente fechadas nos grupos C e DOA, o que não ocorreu no grupo D. Desta forma, concluímos que a suplementação oral com ácido oleico melhorou o processo de cicatrização em animais diabéticos.

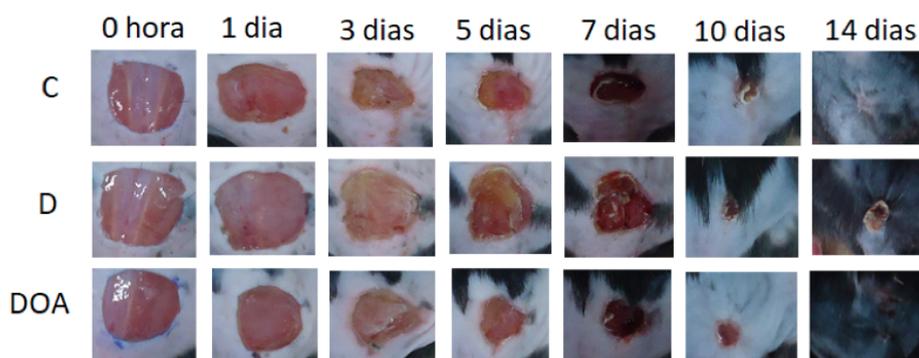


Figura 3: Imagens representativas do fechamento das feridas dos grupos C, D e DOA nos tempos 0 hora, 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias, 10 dias e 14 dias.

Através da coloração histológica com Sirius Red, observou-se menor deposição de colágeno nos grupos D e DOA em relação ao controle. Além disso, as fibras colágenas dos animais dos grupos D e DOA eram menos espessas, indicando menor maturação do tecido neoformado em animais diabéticos.

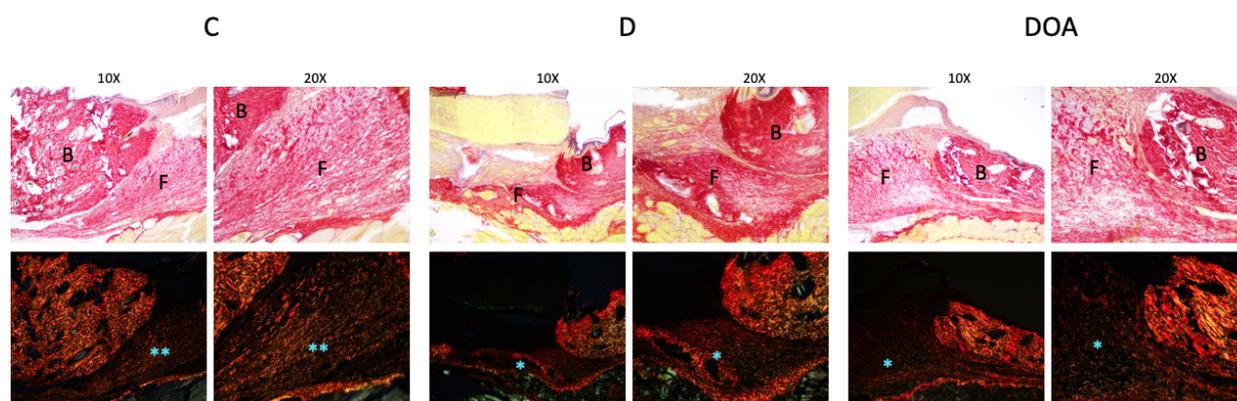


Figura 4: Imagens representativas da região da ferida e borda da ferida dos grupos C, D e DOA no tempo de 7 dias com coloração Sirius Red. (F) indica a região da ferida; (B) indica a borda da ferida; (**) indica maior deposição de colágeno; (*) indica menor deposição de colágeno.

Na **Figura 5**, a análise temporal da concentração de mediadores inflamatórios permitiu identificar diferenças significativas nas concentrações de CXCL-1, aumentadas no grupo DOA em comparação aos grupos C e D em 3 e 5 dias, e em comparação ao grupo C em 7 dias. Além disso, observou-se maior concentração de CXCL-2 no grupo DOA quando comparado aos grupos C e D em 3 dias, e maior concentração no grupo D quando comparado aos grupos C e DOA em 5 dias. Não foram observadas alterações nos outros mediadores inflamatórios avaliados (dados não apresentados).

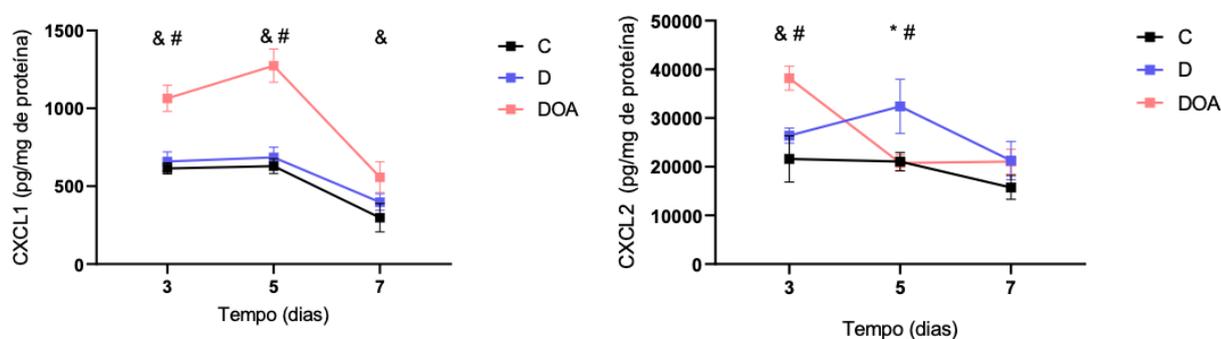


Figura 5: Análise temporal da concentração de citocinas CXCL-1 e CXCL-2 em pg/mg de proteína nos grupos C, D e DOA nos tempos 3 dias, 5 dias e 7 dias. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média, considerando-se diferença significativa quando $p < 0,05$, por two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. (*) indica diferença significativa entre C e D; (&) indica diferença significativa entre C e DOA; (#) indica diferença significativa entre D e DOA.

A resposta inflamatória apropriada é fundamental para garantir o recrutamento de células durante o processo de reparo tecidual. As quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 atuam no recrutamento de neutrófilos, na migração de queratinócitos e na angiogênese durante o reparo tecidual (ZAJA-MILATOVIC *et al.*, 2008; RAJARATHNAM *et al.*, 2019).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local da lesão e contribuem para iniciação, modulação e resolução da inflamação, e interagem com outras células imunológicas (METZEMAEKERS *et al.*, 2020). Essas células fagocitam debris e liberam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que contribuem para a quimiotaxia de outras células imunológicas. Dessa forma, os neutrófilos estimulam o início da fase inflamatória da cicatrização e também contribuem para a resolução da inflamação.

Contudo, a inflamação exacerbada leva ao atraso na cicatrização de feridas em condições patológicas, como o diabetes (SONG *et al.*, 2020). Portanto, a desregulação da liberação de CXCL-1 e CXCL-2 pode contribuir para o atraso na cicatrização de feridas através da descompensação no número e ativação de neutrófilos (RAJARATHNAM *et al.*, 2019). Assim, a regulação de citocinas inflamatórias é um alvo importante no tratamento de feridas diabéticas, com o objetivo de atenuar a resposta inflamatória inicial, uma vez que é exacerbada, e permitir o correto seguimento da cascata de eventos envolvidos na cicatrização (SONG *et al.*, 2020).

CONCLUSÃO:

A suplementação com ácido oleico foi capaz de exacerbar a inflamação, principalmente via CXCL-1 e CXCL-2, o que torna necessário entender a relevância dessas quimiocinas no processo de cicatrização e como o ácido oleico pode aumentar sua síntese.

BIBLIOGRAFIA

BALTZIS, Dimitrios *et al.* Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insight. **Advances In Therapy**, v. 31, p. 817-836, jul. 2014.

BRADFORD, M. M. *et al.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, 248-254, 1976.

CHOW, O; BARBUL, A. Immunonutrition: role in wound healing and tissue regeneration. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 1, p.46-53, 1 jan. 2014.

LIMA, Maria Helena de Melo; ARAUJO, Eliana Pereira. DIABETES MELLITUS E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA. **Cogitare Enfermagem**, v. 18, n. 1, p. 170-172, 2013.

METZEMAEKERS, Mieke *et al.* Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, n. 5, p. 433-450, 1 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

MEYEROVICH, K. *et al.* MCL-1 is a key antiapoptotic protein in human and rodent pancreatic β -cells. **Diabetes**, v. 66, n. 9, p. 2446-2458, 2017.

PEREIRA, Rúben F.; BÁRTOLO, Paulo J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v.5, n.5, p. 208-229, maio 2016.

RAJARATHNAM, Krishna *et al.* How do chemokines navigate neutrophils to the target site: dissecting the structural mechanisms and signaling pathways. **Cellular Signalling**, v. 54, p. 69-80, fev. 2019. Elsevier BV.

SONG, Min *et al.* Cryptotanshinone enhances wound healing in type 2 diabetes with modulatory effects on inflammation, angiogenesis and extracellular matrix remodelling. **Pharmaceutical Biology**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 845-853, 1 jan. 2020. Informa UK Limited.

TAN, X. *et al.* Role of CCR2 in the development of streptozotocin-treated diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 11, n. 68, p. 2063-2073, 2019.

ZAJA-MILATOVIC, Snjezana *et al.* CXC chemokines and their receptors: a case for a significant biological role in cutaneous wound healing. **Histology And Histopathology**, n. 23, p. 1399-1407, 10 set. 2008.