



EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE ÁCIDO GRAXO LINOLEICO (LA) NA FASE INFLAMATÓRIA INICIAL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO DIABETES EXPERIMENTAL

Palavras-Chave: Cicatrização, Diabetes *mellitus*, Inflamação.

Autoras:

Maria Clara Fortes Vitale, FCA – UNICAMP

Roberta Nicolli Sagiorato, FCA-UNICAMP

Jéssica Rondoni Silva Fernandes (co-orientadora), FCA-UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Hosana Gomes Rodrigues (orientadora), FCA- UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A cicatrização de feridas é um processo vital que consiste em uma sequência de eventos coordenados que se iniciam a partir do rompimento das barreiras epiteliais (RODRIGUES et al., 2012; BOWDEN et al., 2016). Didaticamente, esse processo pode ser dividido em três etapas: fase inflamatória, fase proliferativa e de remodelamento (SILVA et al., 2018).

A fase inflamatória caracteriza-se por um mecanismo de defesa natural do organismo, com intuito de combater os agentes infecciosos, além de restaurar a homeostase (SILVA, et al., 2018). Nessa fase, ocorre o recrutamento de células imunológicas, como leucócitos, além da produção de mediadores inflamatórios, as citocinas, ampliando a resposta inflamatória no tecido danificado (ABBAS; LICHTMAN, 2008). Esses mediadores são secretados pelas células após o dano de algum tecido, e tem por função regular diversas respostas inflamatórias a partir do estímulo de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, bem como a reparação da matriz extracelular (RODRIGUES, et al., 2012).

Ainda que seja um processo evolutivamente conservado, existem doenças como a diabetes mellitus (DM) que dificultam ou impedem o completo desenvolvimento desse processo. Em feridas diabéticas, observa-se produção exacerbada de mediadores pró inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1-beta (IL- β) dificultando o processo de cicatrização adequado. Além disso, há alteração nas concentrações de citocina pró-inflamatórias na fase inicial da cicatrização, que está associado ao aumento dos níveis de neutrófilos, além da alteração do fenótipo de macrófagos (RODRIGUES, 2016).

Um estudo realizado por RODRIGUES et al. (2012) analisou os efeitos da administração oral de ácido linoleico em animais saudáveis, observando um aumento na circulação de células inflamatórias, de neutrófilos induzidos por citocinas, além da ativação do fator de transcrição AP-1 na ferida após 1 hora. A partir disso, observa-se a importância das primeiras horas que sucedem a lesão tecidual para o saudável decorrer do processo de cicatrização.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos imunomoduladores da administração oral do ácido graxo linoleico (LA) em 1 e 4 horas após a indução da ferida, em camundongos submetidos ao diabetes experimental.

METODOLOGIA: O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA:) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Animais: Camundongos machos C57BL/6 (CEMIB-UNICAMP; CEUA: 5466-1/2020) divididos em 3 grupos: (C) controles, (D) diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) e (DLA) animais diabéticos suplementados com linoleico (LA) durante 5 dias.

Indução de diabetes: Após jejum de 4 horas, os animais foram submetidos à indução de diabetes através da administração intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma Aldrich, Alemanha) (45 mg/kg) em doses diárias durante cinco dias consecutivos (MEYEROVICH et al., 2017; TAN et al., 2019). Os animais do grupo controle receberam injeção diárias de tampão de citrato de sódio. Dez dias após a última dose de estreptozotocina, confirmou-se a glicemia dos animais. Os animais foram considerados diabéticos quando os níveis glicêmicos eram superiores a 240 mg/dL (FIDLER, 2019).

Administração de ácido linoleico: Logo após a confirmação de diabetes, os animais foram suplementados com água (grupos C e D) ou ácido linoleico (grupo DLA) em dose de 0,22 g/kg por gavagem durante 5 dias.

Indução de ferida e análise de fechamento: Após 5 dias da suplementação oral de ácido graxo linoleico, os animais foram anestesiados e removeu-se cirurgicamente uma área de aproximadamente 1 cm² de pele da região dorsal dos camundongos. Os animais foram eutanasiados em 1 e 4 horas após a indução de ferida e uma área de aproximadamente 2 cm² foi removida cirurgicamente da pele do dorso, coletada e armazenada para posterior processamento.

Determinação da concentração de citocinas no tecido cicatricial: As amostras de pele foram homogeneizadas em solução com inibidor de protease e a produção de ligante de quimiocina 1 (CXCL-1), ligante de quimiocina 2 (CXCL-2), IL-1 β , TNF- α , interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento endotelial vascular (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 presente nas amostras determinada pelo método de Bradford (BRADFORD et al., 1976).

Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO): Após a coleta, os tecidos foram homogeneizados com Polytron PT 1200 (Kinematica, Lucerne, Suíça) em tampão de fosfato à 50mM com HTAB (hexadeciltrimetilamônio) à 0,5% e centrifugado a 4 °C por 10 min a 12000 rpm, coletando o sobrenadante. Em placa de 96 wells foi pipetado 10 μ L de homogenato e adicionado tampão de substrato (orto-dianisidina, peróxido de hidrogênio 0,1% e tampão de fosfato) e incubados no escuro por 5 minutos. Foi adicionado 50 μ L de azida e a leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Os valores foram normalizados pela quantidade de proteínas nas amostras, determinada pelo método de Bradford (BRADFORD et al., 1976).

Análises estatísticas: Os resultados foram apresentados como média \pm desvio ou erro padrão da média. Comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste One-Way ANOVA ou Two-Way ANOVA com pós teste de Bonferroni. Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significantes para $p \leq 0,05$. (*) Indica diferença estatística de C em relação ao D; (#) Indica diferença estatística entre D e DLA; (&) Indica diferença estatística entre C e DLA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Análise da coleta de pele de tempos curtos (1 e 4 h) dos animais e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

A análise da concentração de mediadores inflamatórios no tecido cicatricial de 1 e 4 horas demonstrou que apenas a IL-6 sofreu alteração. No grupo diabético, houve redução nas concentrações de IL-6 em relação aos animais controle, no tecido cicatricial coletado 4 horas após a indução da lesão. A suplementação com o ácido graxo linoleico não alterou nenhum dos mediadores avaliados nestes tempos (Figura 1).

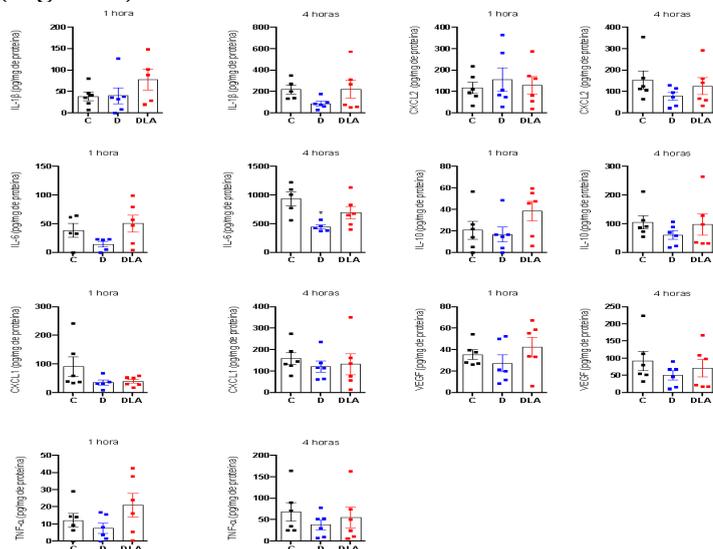


Figura 1. Quantificação de citocinas nos tecidos cicatriciais coletados 1 e 4 horas após a lesão nos grupos C (n=6) D (n=6) e DLA (n=6). Concentrações teciduais de interleucina-1-beta (IL- β), ligante de quimiocina 2 (CXCL-2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), ligante de quimiocina 1 (CXCL-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). * indica diferença entre C e D.

Esses resultados, sugerem que a IL-6 pode ter um papel importante durante o processo de cicatrização em animais diabéticos. Dados preliminares do nosso grupo já indicavam o envolvimento dessa citocina no processo.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que exerce diversos efeitos fisiopatológicos. Devido a sua complexidade de transdução de sinal, ela pode ter uma grande variedade de impactos. A partir da ativação dos receptores, a IL-6 pode apresentar atividades regenerativas e anti-inflamatórias, como também promover vias pró-inflamatórias e perda de tecido (FORCINA, et al. 2022).

Além disso, estudos anteriores já demonstraram que feridas em camundongos sem a IL-6 mostraram atrasos na infiltração dos macrófagos, além de um retardo significativo na cicatrização de feridas, demonstrando um importante papel desse mediador para a cicatrização (MCFARLAND-MANCINI, et al. 2010).

Dessa forma, a redução estatística de IL-6 em animais diabéticos se mostrou importante para a observação da capacidade anti-inflamatória dessa citocina em situações de alterações do controle da cicatrização, como ocorre no Diabetes mellitus.

Análise da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Para a análise de inflamação da pele dos animais coletada em tempos curtos, foi avaliado a atividade de MPO, uma forma indireta que indica inflamação de tecidos (KHAN, ALSAHLI, RAHMANI, 2018). A partir dos resultados obtidos, não houve alteração estatística na atividade dessa enzima. (Figura 2)

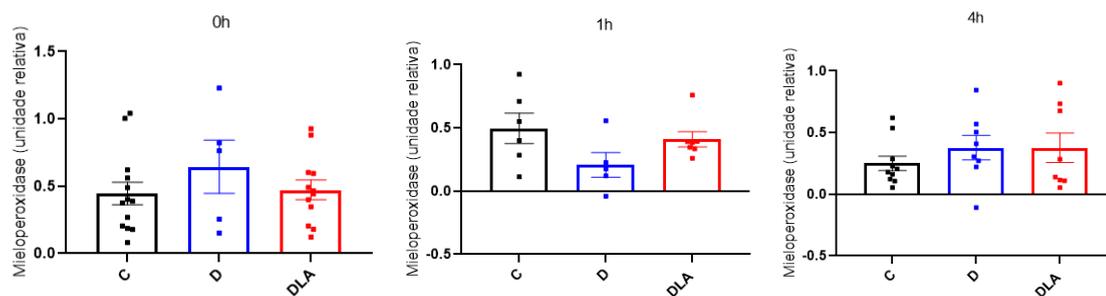


Figura 2. Análise da atividade de mieloperoxidase (MPO) na pele dos animais em 0, 1 e 4 horas após a lesão nos grupos C (n=6) D (n=6) e DLA (n=6).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de espécies reativas oxidantes. Além de integrantes da resposta imune inata, evidências têm comprovado a contribuição desses oxidantes para o dano tecidual durante inflamação (NICHOLLS & HAZEN, 2005).

Estudos prévios, usando modelos animais de algumas doenças inflamatórias, encontraram que a deficiência de MPO gera um exagero da resposta inflamatória, além de afetar as funções de neutrófilos (ARATANI, 2018).

Dessa forma, a análise possibilita a observação indireta da presença de células imunes na ferida, sendo de extrema importância para a análise da inflamação principalmente em tempos curtos.

CONCLUSÕES:

No modelo de indução de diabetes, a suplementação oral de ácido graxo linoleico não alterou a concentração de citocinas na análise de tempos curtos (0, 1 e 4h), em contraste com a redução de IL-6 no grupo diabéticos em 4 horas. Esses resultados sugerem um importante papel dessa citocina pleiotrópica nas fases iniciais do processo de inflamação.

A suplementação oral de LA não levou a uma alteração da inflamação nas amostras de pele em tempos curtos, analisados através da atividade de mieloperoxidase.

BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 640, p. 47–52, 2018.

BOWDEN LG, Byrne HM, Maini PK, Moulton DE. A morphoelastic model for dermal wound closure. **Biomech Model Mechanobiol.** (2016) 15(3):663-81.

FIDLER TP, MARTI A, GERTH K, MIDDLETON EA, CAMPBELL RA, RONDINA MT, WEYRICH AS, ABEL D. Glucose metabolism is required for platelet hyperactivation in a murine model of type 1. **Diabetes** (2019) May;68(5):932-938.

FORCINA, L.; FRANCESCHI, C.; MUSARÒ, A. The hormetic and hermetic role of IL-6. **Ageing research reviews**, v. 80, n. 101697, p. 101697, 2022.

KHAN, A; ALSAHLI, M; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. **Medical Sciences (Basel)**, v. 33, n. 6, p. 01-21, 2018. DOI: 10.3390/medsci6020033.

MCFARLAND-MANCINI, M. M. et al. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. **The journal of immunology**, v. 184, n. 12, p. 7219–7228, 2010.

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

NICHOLLS SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2005; 25: 1102-11.

RODRIGUES, H. G. et al. Oral Administration of Oleic or Linoleic Acid Accelerates the Inflammatory Phase of Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 1, p. 208–215, 2012.

RODRIGUES, H.G, Vinolo M.A, Sato F.T, et al. Oral Administration of Linoleic Acid Induces New Vessel Formation and Improves Skin Wound Healing in Diabetic Rats [published correction appears in **PLoS One**. 2017 May 31;12 (5):e0179071]. **PLoS One**. 2016;11(10):e0165115. Published 2016 Oct 20. doi:10.1371/journal.pone.0165115.

SILVA, Jéssica R. et al. Wound Healing and Omega-6 Fatty Acids: from inflammation to repair.: From Inflammation to Repair. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1-17, 2018.

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

ZHANG XN, Ma ZJ, Wang, Y, Sun B, Guo X, Pan CQ, Chen LM. Angelica Dahurica ethanolic extract improves impaired wound healing by activating angiogenesis in diabetes. ***PloS one*** (2017) 12.