



EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE ÁCIDO GRAXO OLEICO NO 5º DIA DE PSORÍASE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Palavras-Chave: PSORÍASE, ÁCIDOS GRAXOS, INFLAMAÇÃO

Autores(as):

ISABELA BUQUIO BACCARIN, FCA– UNICAMP

Ms^a. BEATRIZ BURGER (co-orientadora), FCA– UNICAMP

Ms^a. ROBERTA NICOLLI SAGIORATO (co-orientadora), FCA– UNICAMP

Prof^a. Dr^a. HOSANA GOMES RODRIGUES (orientadora), FCA– UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como uma barreira física e imunológica para o organismo. Do ponto de vista imunológico, possui um sistema complexo, incluindo neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células de *Langerhans*, protagonistas na produção de uma grande variedade de mediadores inflamatórios como citocinas, tais como interleucina (IL)-17 e 22, quimiocinas como ligantes de quimiocina 1 e 20 (CXCL1 e CXCL20) e peptídeos antimicrobianos, como os que atuam majoritariamente em queratinócitos (S100a8, S100a9) (ABDALLAH *et al.*, 2018). A interação entre esses componentes é essencial para a manutenção da homeostase imunológica desse órgão. Assim, quando desreguladas, podem causar doenças inflamatórias, sendo uma dessas a psoríase.

A psoríase é uma desordem dermatológica de caráter recorrente-remitente caracterizada por processos autoimunes e inflamação crônica (GOMES *et al.*, 2023). O mecanismo exato da patogênese da doença permanece não elucidado, contudo, sabe-se que um dos fatores críticos é a interação entre células imunes e as citocinas, com destaque para a ativação exacerbada do eixo do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)/IL-23/IL-17, resultando em maior ativação de células T, com destaque para as Th17 (LIANG *et al.*, 2017; KANDA *et al.*, 2020). Outro fator crítico da doença é a presença aumentada de genes ligados à hiperproliferação de queratinócitos, como a queratina 17 (Krt17) (JIN; WANG, 2014; SHI *et al.*, 2011). Esse aumento, juntamente com outras interações do sistema imune, resulta em hiperproliferação e diferenciação de queratinócitos, gerando hiperplasia epitelial acompanhada de paraqueratose, vasodilatação, angiogênese e infiltração de leucócitos na derme (DENG *et al.*, 2016; TASHIRO; SAWADA, 2022).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 60 milhões de pessoas são afetadas pela psoríase. Esta doença não tem cura e o tratamento é escasso, com muitos efeitos colaterais, já que os protagonistas são os imunossupressores que amenizam os sintomas (RENDON; SCHÄKEL, 2019; MASCARENHAS-MELO *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, a nutrição, especialmente por meio de imunonutrientes, como os ácidos graxos, pode representar uma abordagem eficaz para aliviar ou reduzir os sintomas sem causar efeitos colaterais indesejáveis (KANDA *et al.*, 2020). Estudos prévios, como o de Silva, *et al.* (2021) demonstram que a dieta mediterrânea, naturalmente rica em ômega-9 devido ao consumo de azeite de oliva, tem a capacidade de modular a produção de citocinas, interferir na expressão de moléculas de adesão celular e influenciar a função das células imunológicas, o que sugere seu potencial como modulador imunológico (SILVA *et al.*, 2020). Concomitantemente, autores como Farag, M e Gad, M (2022) estudaram as propriedades pró-resolutivas do ácido oleico em doenças inflamatórias, incluindo hepatite, síndrome do intestino irritável e pneumonia (BORNIQUEL *et al.*, 2010; FARAG; GAD, 2022).

Considerando o conhecimento atual sobre os efeitos imunomoduladores dos ácidos graxos, e tendo em vista que são poucos os trabalhos que investigam os efeitos do ômega-9 (ω -9) no contexto da psoríase (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013) este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos microscópicos e moleculares da administração oral de ácido graxo oleico (C18:1, ω -9, OL) no quinto dia de psoríase experimental induzida por Imiquimode (IMQ) em camundongos.

METODOLOGIA:

Perante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP) (Protocolo: 5562-1//2020), utilizamos camundongos machos da linhagem C57BL/6 provenientes do CEMIB/UNICAMP.

Foram realizados dois experimentos independentes, totalizando 6 camundongos por grupo, sendo os grupos: controle (C); (IMQ); (IMQ+OL), onde o grupo (C) recebeu a aplicação tópica de vaselina e suplementação oral de água, o grupo (IMQ) recebeu aplicação tópica de 60 mg de creme contendo 5% de IMQ e foi suplementado com água, e por fim, o grupo (IMQ+OL) recebeu a aplicação tópica de IMQ e foi suplementado com 12,5 μ L de ácido graxo oleico (OL) por 5 dias consecutivos (**Figura 1**).

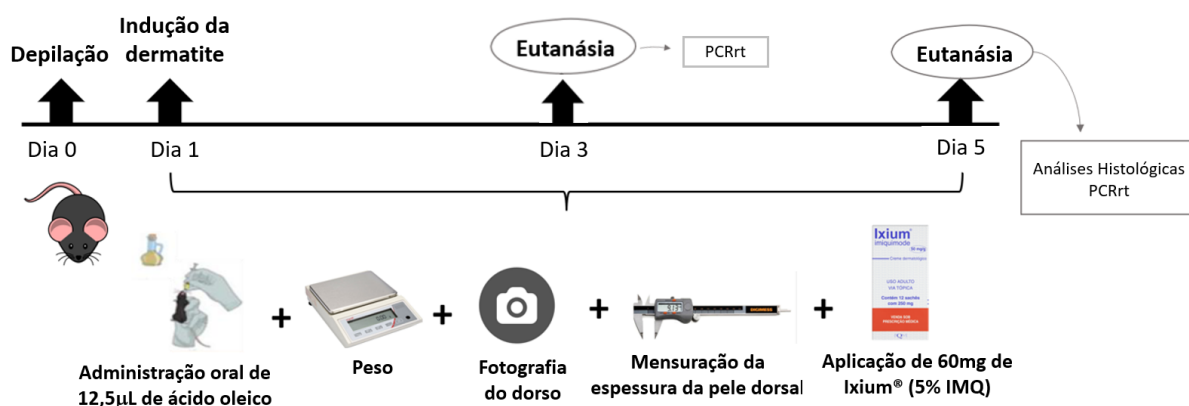


Figura 1. Desenho experimental. O dorso dos animais foi depilado (Dia 0) no dia anterior ao 1º dia de aplicação tópica de 60 mg de Ixium® (5% de imiquimode), a aplicação ocorreu diariamente até o 5º dia. Diariamente ocorreu a suplementação com 12,5 μ L de ácido graxo oleico, os animais foram pesados, fotografados e o espessamento da pele aferido. As amostras da pele foram coletadas no 3º e no 5º dia para análise da expressão gênica por PCR em tempo real e no 5º dia para análises histológicas.

Ao longo dos 5 dias, diariamente, os animais foram pesados, o dorso de cada animal foi fotografado e o espessamento da pele foi avaliado com a utilização de um paquímetro digital (NOURBAKHSI *et al.*, 2022).

Para as análises histológicas, coletamos a pele do dorso dos camundongos e mantivemos em formaldeído 4% por 24 horas. Então, as amostras foram desidratadas e incluídas em parafina, cortadas em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina (CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014; HOU *et al.*, 2018). Com a utilização do *software ImageJ* foi avaliado o número de camadas de queratinócitos (KULIG *et al.*, 2016), a área da epiderme e a distância entre a epiderme e a camada muscular (espessura da derme). Os dados de área da epiderme e espessura da derme são expressos em unidade relativa, sendo que a normalização foi feita em relação à média do grupo controle.

Para avaliar a expressão gênica de citocinas e peptídeos associados com a proliferação e estresse de queratinócitos, sucedeu-se o experimento de PCR em tempo real (PCRrt), utilizando aproximadamente 30 mg de tecido mantidos em RNAlater até o momento da extração do RNA. Para isso, primeiramente o RNA foi extraído e a qualidade do RNA foi analisada com base na relação da absorvância A260/A280, assim como na visualização do RNA após eletroforese em gel de agarose 1,5%. A partir disso, as amostras de RNA com baixa qualidade foram excluídas e o experimento foi realizado utilizando como controle endógeno, os níveis de ubiquitina C (UBC).

Para a análise estatística, as comparações foram analisadas por *One-way ANOVA* ou *Two-way ANOVA*, seguidos de pós-teste de Bonferroni e os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A suplementação com 12,5 μ L de ácido oleico reduziu o percentual da espessura da pele dorsal em relação ao 1º dia, quando comparado com o grupo controle do tratamento, grupo (IMQ) do 2º ao 7º dia (Figura 2). Portanto, a suplementação amenizou os efeitos da aplicação de IMQ em camundongos.

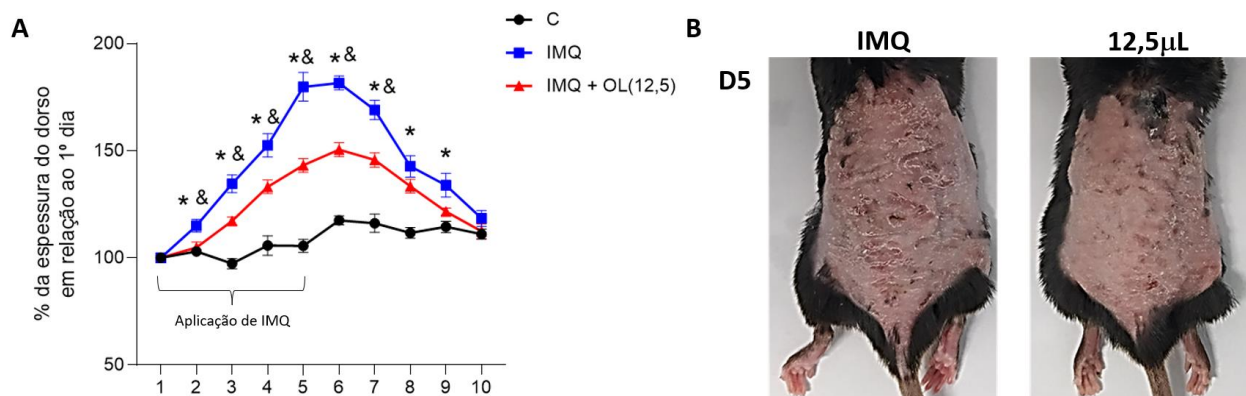


Figura 2. Aplicação tópica de IMQ por 5 dias consecutivos induz alterações fenotípicas na pele de camundongos e a suplementação oral com ácido graxo oleico amenizou esses efeitos. (A) Porcentagem da espessura da pele em relação ao 1º dia durante 10 dias, sendo que a aplicação do IMQ e suplementação (IMQ+OL) com 12,5 μ L de ácido oleico ocorreram ao dia 1 ao 5. (B) Fotos representativas do dorso dos camundongos no 5º dia de indução da doença (D5). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média, valores de $p < 0,05$ são considerados significativos, (*) C versus IMQ, (&) IMQ versus IMQ+OL, por *Two-Way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*.

Na Figura 3 é possível observar que o ácido oleico reduziu o número de camadas e da área da epiderme em comparação ao grupo (IMQ) (Figura 3A e B). Estes dados sugerem um efeito benéfico do ácido graxo oleico na redução da hiperproliferação epidérmica de queratinócitos e na formação de placas psoriáticas, parâmetros característicos da doença (DENG *et al.*, 2016; TASHIRO; SAWADA, 2022).

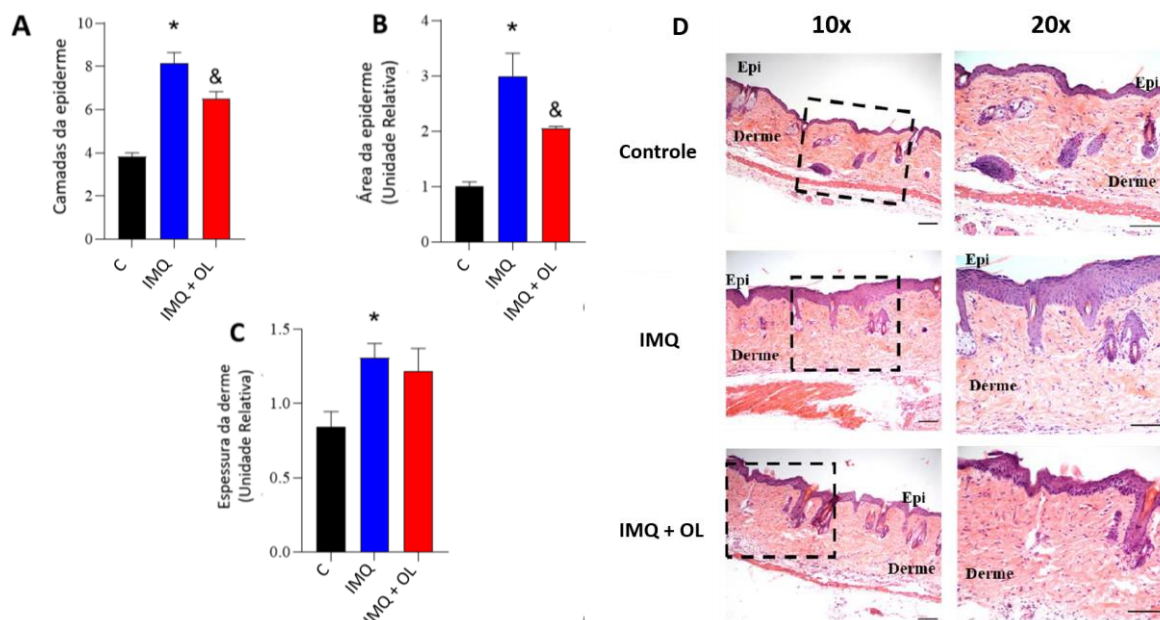


Figura 3. Análises histológicas no 5º dia. (A) Número de camadas de queratinócitos na epiderme. **(B)** Área da epiderme, dado expresso em unidade relativa normalizado pelo controle. **(C)** Espessura da derme, dado expresso em unidade relativa normalizado pelo controle. **(D)** Imagens representativas no aumento de 10x e 20x e escala de 100µm. Valores são expressos como média ± erro padrão da média, sendo considerados significativos os valores de $p < 0.05$, (*) C versus IMQ; (&) IMQ versus IMQ+OL, por *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Epi=Epiderme.

Através do PCRrt, observamos que no 3º dia de tratamento com IMQ houve aumento da expressão de genes relacionados com a hiperproliferação de queratinócitos, como *Krt17*, *S100a8*, *S100a9* no grupo IMQ, quando comparado ao grupo C. Por outro lado, a suplementação com ácido oleico foi capaz de reduzir significativamente a expressão desses genes no grupo IMQ+OL em comparação ao IMQ. Como se trata de genes associados à hiperproliferação de queratinócitos, os resultados do PCRrt se completam e condizem com os dados da espessura da pele, já que foi visto aumento da espessura da epiderme, do número de camadas de queratinócitos e um pico no 5º dia de aplicação, provavelmente pela proteína já estar desempenhando função, por isso do aumento da expressão gênica estar presente no PCRrt de 3 dias e não mais no de 5 dias.

Em relação aos outros genes avaliados, no 5º dia de tratamento a expressão das citocinas IL-22, IL-1β, IL-17, IL-23 e IL-12p40 foi aumentada no grupo IMQ em comparação ao controle. No caso da IL-17, IL-23 e IL12p40 estavam aumentadas também no 3º dia. Tais resultados são consistentes com a literatura que descreve elevada expressão desses genes na psoríase, especialmente porque se trata de genes que codificam proteínas responsáveis por respostas inflamatórias, como vasodilatação, migração e infiltração de células imunes na derme, ativação de células T, em especial células Th17 e produção de quimioatraentes (BALIWAG; BARNES; JOHNSTON, 2015).

Também observamos que a administração do ácido graxo oleico aumentou a expressão gênica de IL-12p40 em comparação ao grupo IMQ, em ambos os tempos. Esse aumento tem sido relacionado com um potencial regulatório da IL-12 em certas células envolvidas na manutenção da psoríase, se contrapondo a função patogênica exercida pela IL-23 nesse contexto (ZWICKY *et al.*, 2021). Paralelamente, Kulig *et al.* (2016) sugere que a sinalização de IL-12 é benéfica pois tem atuado limitando a inflamação da pele nos queratinócitos (KULIG *et al.*, 2016). No entanto, os alvos e mecanismos envolvidos nessa possível proteção conferida pela IL-12, e mais especificamente sua subunidade *p40*, não estão elucidados.

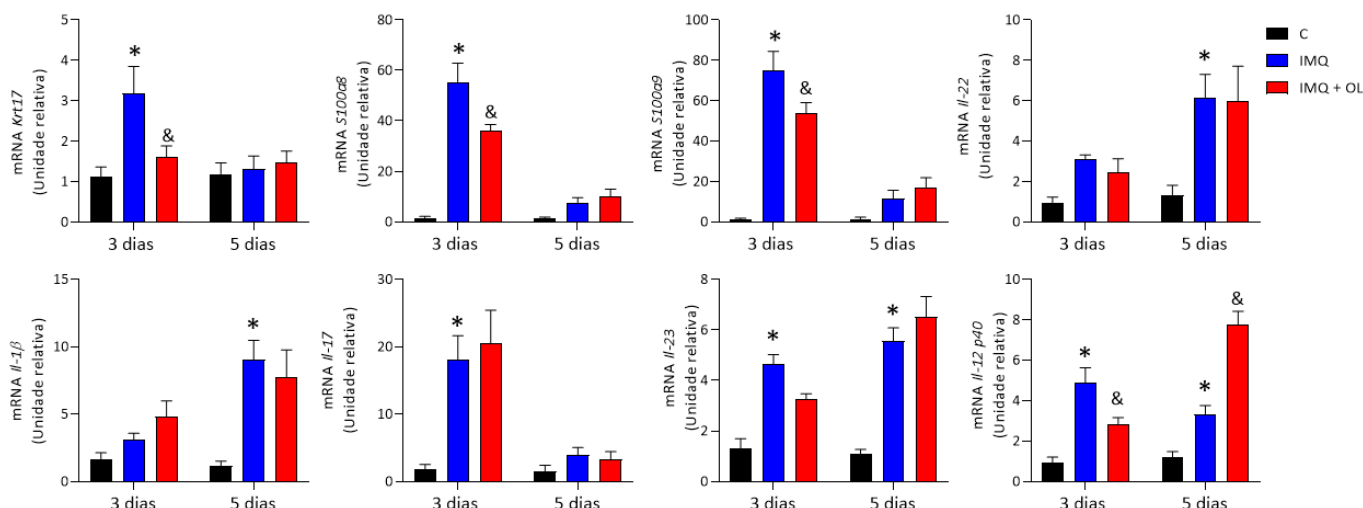


Figura 5. Expressão gênica de citocinas na pele no 5º dia do protocolo. A expressão gênica de citocinas foi avaliada por PCR em tempo real (rtPCR) com um n=5 a 7 por grupo. Valores são expressos como média ± erro padrão, (*) C versus IMQ; (&) IMQ versus IMQ+ OL, sendo considerados significativos valores de $p < 0.05$, por *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*.

CONCLUSÕES:

Os resultados deste estudo sugerem que a administração oral de ácido graxo oleico durante a indução da psoríase experimental murina, induzida por IMQ, resultou em efeitos benéficos na redução da espessura da pele, na melhora de parâmetros histológicos cutâneos e na modulação da expressão gênica de citocinas protagonistas na doença, inclusive com potencial protetivo na doença. Esses achados suportam a hipótese do potencial terapêutico do ácido graxo oleico como um agente imunomodulador na psoríase. A compreensão dos mecanismos subjacentes a esses efeitos e a avaliação de sua eficácia por meio de outras análises são necessárias para explorar e compreender ainda mais suas aplicações.

BIBLIOGRAFIA

- ABDALLAH, F. *et al.* Skin. Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. **Mediators Inflamm.** p.1–17 (2017).
- BALIWAG, J.; BARNES, D. H.; JOHNSTON, A. Cytokines in psoriasis. **Cytokine**, v. 73, n. 2, p. 342–350 (2015).
- BORNIQUEL, S. *et al.* Nitrated oleic acid up-regulates PPARgamma and attenuates experimental inflammatory bowel disease. **Free radical biology & medicine**, v. 48,4:499-505 (2010).
- CARDIFF R., MILLER C., MUNN R. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v.6 (2014).
- DENG, Y. *et al.* The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, 2016, 377-389, vol. 50 (2016).
- FARAG, M., GAD, M. Omega-9 fatty acids: potential roles in inflammation and cancer management. **Journal, genetic engineering & biotechnology**, v. 20,1 48. (2022).
- GOMES, G. *et al.* Nanotechnology-ased alternatives for the topical delivery of immunosuppressive agents in psoriasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v.631: 122535 (2023).
- HOU, Y. *et al.* IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis. **Protein & Cell**, v.12:1027-1038. (2018).
- JIN; L.; WANG, G. Keratin 17: A Critical Player in the Pathogenesis of Psoriasis. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 2, p. 438–454, 2014.
- KANDA, *et al.* Nutrition and Psoriasis. **International journal of molecular sciences**, vol. 21,15 5405. (2020).
- KULIG, P. *et al.* IL-12 protects from psoriasiform skin inflammation. **Nature Communications**, v. 7 (2016).
- LIANG, Y. *et al.* Psoriasis: a mixed autoimmune and autoinflammatory disease. **Current Opinion in Immunology**, v.49 (2017)
- MASCARENHAS-MELO, F. *et al.* Nanocarriers for the topical treatment of psoriasis - pathophysiology, conventional treatments, nanotechnology, regulatory and toxicology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, V 176, 95–107 (2022).
- NOURBAKHSH F, *et al.* Topical Formulation of Noscapine, a Benzylisoquinoline Alkaloid, Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Lesions. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, (2022). 2022:3707647.
- RENDON, A., Schäkel, K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, 6 (2019).
- SALES-CAMPOS, H. *et al.* An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.13:201-210. (2013).
- SILVA, R. *et al.*, Mediterranean Diet: Lipids, Inflammation, and Malaria Infection. **Internation Journal of Molecular Sciences**, (2021).
- SHI, X. *et al.* IL-17A upregulates keratin 17 expression in keratinocytes through STAT1-and STAT3-dependent mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 12, p. 2401–2408, 2011.
- TASHIRO, T.; SAWADA, Y. Psoriasis and Systemic Inflammatory Disorders. **International journal of molecular sciences**, v.23, 4457. (2022).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Reports on Psoriasis**. Switzerland, 2016.
- ZWICKY, P. *et al.* IL-12 regulates type 3 immunity through interfollicular keratinocytes in psoriasiform inflammation. **Science Immunology**, v. 6(2021).