

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DO ÁCIDO GRAXO LINOLEICO DURANTE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO DIABETES EXPERIMENTAL TIPO II

Palavras-Chave: DIABETES, CICATRIZAÇÃO, ÁCIDO GRAXO LINOLEICO

Autores(as):

SOPHIA FRNACHI BRUZETTI, FCA/UNICAMP
ROBERTA NICOLLI SAGIORATO (coorientadora), FCA/UNICAMP
Prof^a. Dr^a. HOSANA GOMES RODRIGUES (orientadora), FCA/UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A pele é um órgão multifuncional, capaz de responder a estímulos externos e internos. E por isso, está exposta à agressões externas e sujeita à lesões. A cicatrização é um processo bem estabelecido e evolutivamente conservado, mas que em alguns casos patológicos, como o diabetes, resulta em complicações que prejudicam e atrasam o reparo tecidual, promovendo em muitos casos a formação de feridas crônicas (BALTZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença crônica também influenciada pela genética, mas muito associada a fatores ambientais como padrão alimentar e prática de atividade física, sendo causada pelo desenvolvimento e perpetuação de resistência à insulina nos órgãos periféricos, o que resulta em hiperglicemia (TINAJERO; MALIK, 2021). O atraso na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos se deve principalmente a inflamação crônica e aumento do estresse oxidativo tecidual. A pele perde funcionalidade e torna-se mais suscetível a novos ferimentos e riscos potenciais de ulcerar (HOLL J et al., 2021). A resposta inflamatória durante a cicatrização de feridas pode ser controlada por nutrientes imunomoduladores, como os ácidos graxos ômega-6. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação oral com ácido graxo linoleico durante o processo de cicatrização de feridas em camundongos diabéticos tipo 2.

METODOLOGIA:

O projeto foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (CEUA nº 6274-1/2022). Foram utilizados camundongos homocigotos para uma mutação no receptor de leptina (BKS.Cg^m +/+ Lepr^{db}/J Unib), que promove o desenvolvimento espontâneo do diabetes, e seus controles do tipo selvagem C57BL/6J (WT), machos, com 8 semanas de idade, provenientes do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura de 23 ± 2°C. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: (WT) animais do tipo selvagem suplementados com água; (db/db) animais diabéticos suplementados com água e (db/db LA) animais diabéticos suplementados com 50 µL de ácido linoleico (22 mg/kg).

Foi realizado o acompanhamento da glicemia dos animais até que todos pudessem ser considerados diabéticos, ou seja, com níveis glicêmicos ≥ 240 mg/dL. Para o acompanhamento da glicemia, a mesma foi aferida em diferentes tempos, coletando o sangue da veia caudal e utilizando o Kit Accu-check® Active. Após a confirmação do diabetes, os animais do grupo db/db LA receberam suplementação oral de 50 µL/dia de ácido graxo linoleico puro por 5 dias consecutivos (Sigma Aldrich,

Alemanha) por pseudogavagem com pipeta monocanal mecânica (10-100 µL, Eppendorf®). Os animais dos grupos WT e db/db foram suplementados com água. Após 5 dias de administração do ácido linoleico, uma área de aproximadamente 1 cm² de pele foi removida cirurgicamente da região dorsal.

Foi avaliado o consumo de água e ração dos camundongos a partir da média do consumo diário. No dia da indução da ferida, os animais foram alojados em gaiolas individuais e foi ofertado 300 mL de água no bebedouro e 70g de ração comercial padrão para camundongos (Nuvilab®, Quimtia, Colombo, Brasil). Por um período de 21 dias, a ração foi pesada e o volume de água medido três vezes na semana.

Para avaliar o fechamento da ferida, as mesmas foram fotografadas em diferentes tempos de seguimento após a lesão. Utilizamos câmera digital Sony® cyber-shot (DSC-S950S 4X 10MP com zoom óptico). Para a análise, a área da ferida foi medida através do software Image J (National Institute of Mental Health -NIH) e os resultados expressos em porcentagem (%) em relação à área inicial da ferida.

As amostras de pele coletadas no 21^o dia após a lesão, foram fixadas em solução de formaldeído 4% por 24 horas, desidratadas em baterias crescentes de etanol e incluídas em blocos de parafina Paraplast, seccionadas em micrótomo rotatório manual (micrótomo Eppendorf®). Os cortes foram hidratados em baterias de etanol decrescentes e corados em Sirius Red e hematoxilina/eosina para avaliar a organização das fibras de colágeno e para avaliar os aspectos gerais da inflamação. As imagens foram adquiridas em microscópio estereoscópico Leica® (MZ10F) acoplado a câmera Leica® (DFC310 FX) e Microscópio Olympus® (U-LH100HG).

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. Comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa Prisma 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A aferição da glicemia dos animais após a indução de ferida comprova que os animais dos grupos db/db e db/db LA permaneceram diabéticos durante toda o processo de cicatrização, com níveis de glicemia superiores a 240 mg/dL.

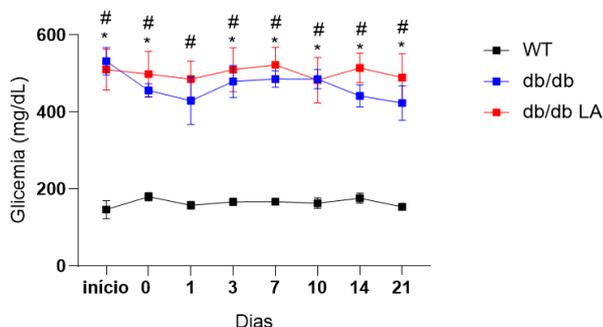


Figura 1. Acompanhamento de glicemia durante 21 dias. Grupos controle (WT; n=7); diabético (db/db; n=4); diabético suplementado com ácido linoleico (db/db LA; n=4). A glicemia inicial representa a glicose aferida no dia que a suplementação foi iniciada e a glicemia no tempo 0 representa a glicose aferida no dia de indução de ferida nos animais. As demais glicemias foram aferidas nos tempos 1, 3, 7, 10, 14 e 21 após a indução de ferida. (*) Indica diferença significativa entre os grupos WT e db/db. (#) Indica diferença significativa entre os grupos WT e db/db LA.

De acordo com os resultados de consumo de ração, a ingestão foi maior maior nos grupos db/db e db/db LA em comparação ao grupo WT, como esperado. Além disso, o consumo de água foi significativamente maior no grupo db/db LA em comparação aos grupos db/db e WT.

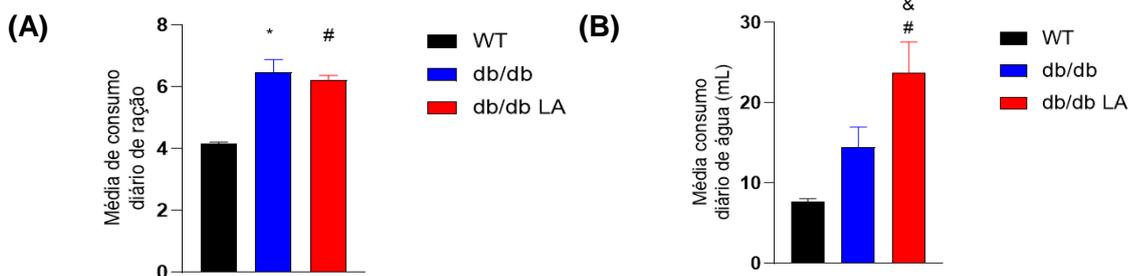


Figura 2. Média de consumo diário de água e ração (A) Média do consumo diário de ração. (B) Média do consumo diário de água. Grupos controle (WT; n=7); diabético (db/db; n=4); diabético suplementado com ácido linoleico (db/db LA; n=4). O consumo foi avaliado a partir do dia

de indução de ferida, sendo realizado a cada dois dias até o final do protocolo. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média, considerando-se diferença significativa com $p < 0,05$, por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. (*)Indica diferença significativa entre os grupos WT e db/db; (#) indica diferença significativa entre os grupos WT e db/db LA; (&) indica diferença significativa entre os grupos db/db e db/db LA.

De acordo com a análise de fechamento da ferida, entre os 3° e 10° dias do protocolo de 21 dias, a ferida dos grupos db/db e db/db LA estava significativamente maior em relação à ferida do grupo WT, revelando um atraso na cicatrização em relação ao grupo controle. Não observamos diferenças entre os grupos db/db e db/db LA. Entretanto, se analisarmos apenas a área da ferida no 21° dia após a lesão, é possível ver claramente que os animais que receberam suplementação com o ácido graxo linoleico apresentaram menor área ainda aberta, em relação ao grupo db/db sem suplementação.

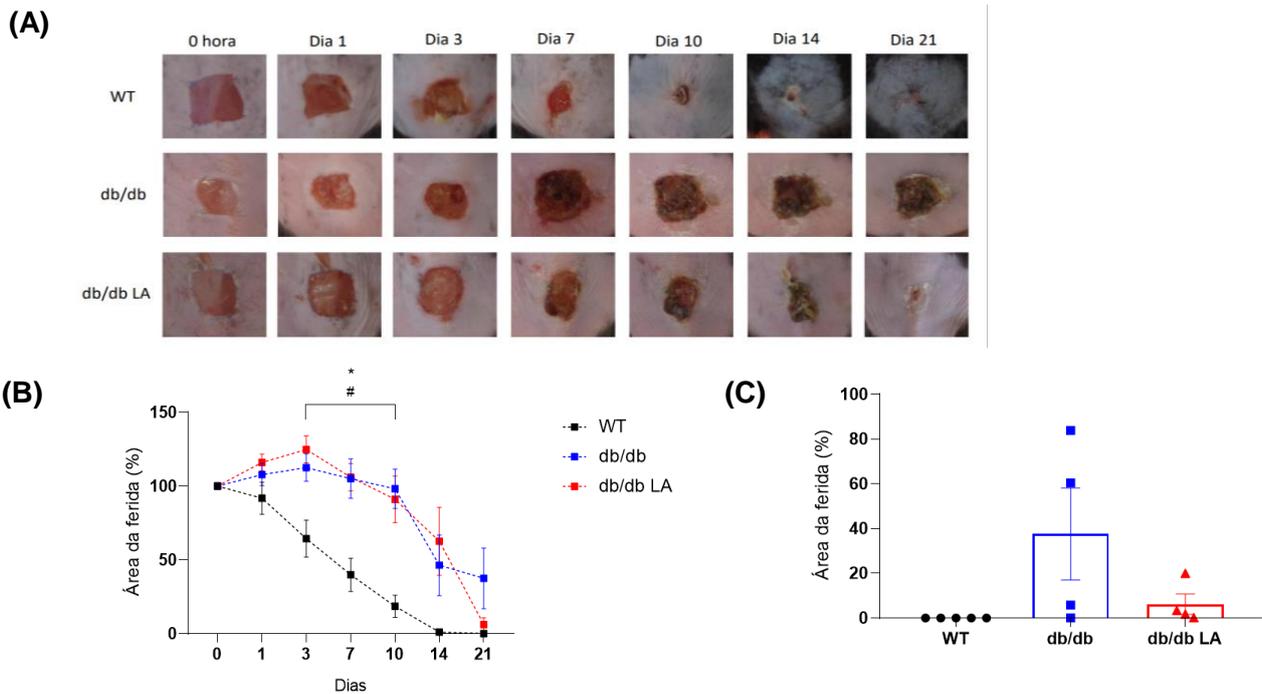
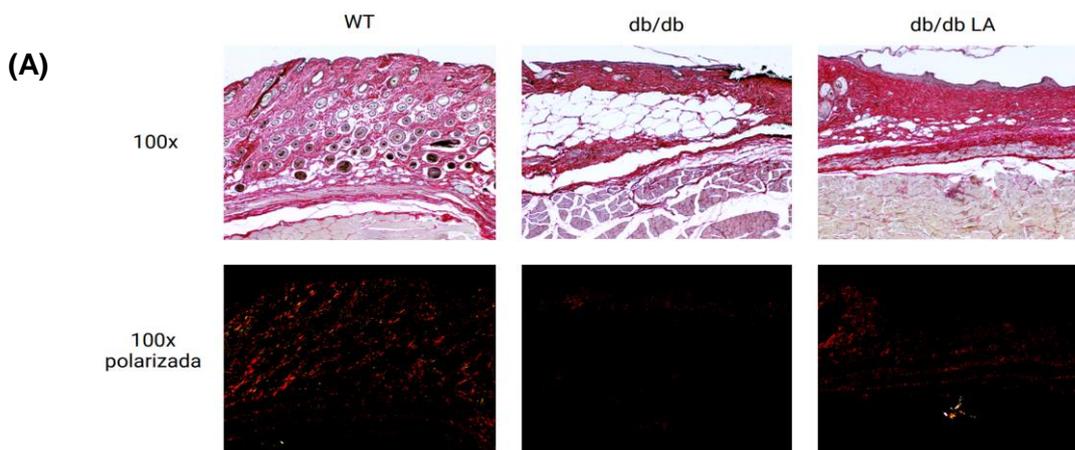


Figura 3. Fechamento da Ferida em 21 dias. **(A)** Quadro de fotos representativas. **(B)** Gráfico da área da ferida. **(C)** Área da Ferida no 21° dia. Grupos controle (WT; n=7); diabético (db/db; n=4); diabético suplementado com ácido linoleico (db/db LA; n=4). Os valores foram expressos como média \pm 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 os grupos WT e db/db; (#) indica diferença significativa entre os grupos WT e db/db LA.

A partir da análise histológica de 21 dias, na coloração em Sirius Red nos revela um maior desenvolvimento de matriz extracelular no grupo db/db LA em relação ao grupo não suplementado. Além disso, também observamos menor deposição de fibras de colágeno no grupo db/db em relação ao grupo WT. Na coloração Hematoxilina e Eosina observamos sinais de tecido cicatrizado em todos os grupos, principalmente pela presença de anexos dérmicos.



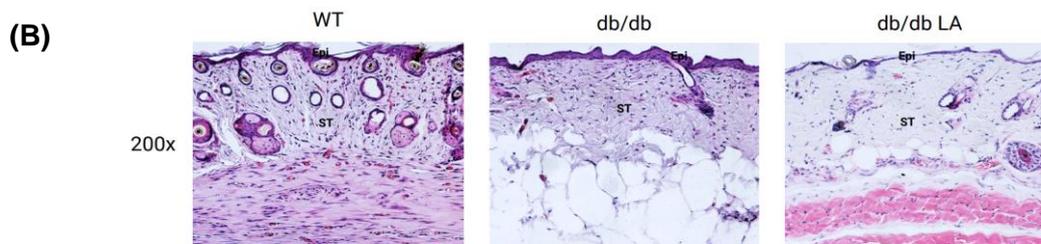


Figura 4. Análises Histológicas em 21 dias. (A) Coloração em Sirius Red com fotografias sem e com polarização em aumento de 100x. (B) Coloração em Hematoxilina e Eosina em aumento de 200x. Grupos controle (WT; n=7); diabético (db/db; n=3); diabético suplementado com ácido linoleico (db/db LA; n=4). ST = scar tissue; Epi = epiderm.

Esclarecimento: É importante ressaltar que devido a um problema no fornecimento dos camundongos homocigotos para uma mutação no receptor de leptina (BKS.Cg^m +/+ Lep^{db}/J Unib) por parte do CEMIB Unicamp, não foi possível alcançar o número de amostras por grupo desejado e nem mesmo realizar todos os experimentos previstos no projeto original. Afinal, não foi possível completar o número de 5 animais por grupo das análises realizadas até então, e nem mesmo fazer os lotes de 7 dias. Buscamos alternativas entrando em contato com outras universidades, porém nenhuma delas trabalhava com esse modelo animal. Assim, nossas conclusões foram feitas a partir dos resultados que conseguimos obter.

O aumento da ingestão diária de ração (**Figura 2A**) dos grupos db/db e db/db LA em relação ao grupo WT está relacionado a mutação que o camundongo db/db possui no receptor de leptina, um hormônio diretamente associado às sinalizações cerebrais de saciedade. Sendo assim a mutação no receptor impede que esse hormônio se ligue e exerça suas funções, dentre elas a sinalização hipotalâmica para diminuir a fome e promover a cessação das refeições (ZANCHI et al.; 2017). Em relação à ingestão diária de água (**Figura 2B**), também percebe-se uma diferença significativa no consumo de água quando comparamos os grupos db/db e db/db LA com o grupo WT, o que também é um fator esperado porque a hiperglicemia causa aumento considerável do fluxo urinário nos camundongos diabéticos, o que promove uma resposta compensatória de polidipsia (ZHAO et al.; 2020).

A análise de fechamento de ferida é realizada a partir das fotografias tiradas do dorso dos animais em posição vertical, ou seja, mesmo que a casca da ferida esteja praticamente solta da pele, na quantificação através das fotografias pelo software Image J, o valor será referente ao tamanho da casca. Além disso, às vezes a casca da ferida está praticamente solta da pele e quando se desprende e a quantificação da área reduz drasticamente, como na variação do 10º para o 14º dia (**Figura 3B**). Entretanto, as cascas da ferida dos animais podem se soltar em momentos diferentes, geralmente ocorrendo entre o 10º e 21º dias, fazendo com que os dados fiquem muito diferentes entre si, devido às diferenças nas fotografias.

Chamando a atenção para o 21º dia (**Figura 3C**), pode-se observar que a barra de desvio permanece grande no grupo db/db, porém pequena no grupo db/db LA, o que mostra que os dados do primeiro grupo se mantiveram heterogêneos entre si, enquanto os dados do grupo suplementado se mostraram mais homogêneos em relação aos dias anteriores. Isso porque enquanto grande parte dos animais do grupo db/db apresentava grande variabilidade em relação a aderência da casca da ferida à pele, os animais do grupo db/db LA em sua maioria, estavam com a casca despreendida quase por completo no 14º dia e por isso, do 14º para o 21º dia os dados se tornam mais homogêneos neste grupo.

Para além da análise subjetiva citada acima, sabe-se que, diferentemente dos humanos, o mecanismo pelo qual ocorre o fechamento da ferida na maioria dos roedores se deve principalmente à contração da ferida. Em contrapartida, a cicatrização da pele humana está mais atrelada ao desenvolvimento do tecido de granulação, que exerce sua função preenchendo o defeito. Curiosamente, em camundongos db/db a cicatrização se deve principalmente pela migração epidérmica e não pela contração, se tornando um modelo mais próximo daquilo que observamos nos humanos (PIGNET et al., 2024). Isso nos ajuda a entender porque tivemos certas dificuldades para expressar, através do método

análises por meio de fotografias e quantificação de área, o que estava sendo observado na prática. Justamente porque diferente dos demais modelos animais, como os camundongos C57BL/6 utilizados como grupo controle onde ocorre a contração da ferida e portanto em todas as fotografias o tamanho da ferida é condizente ao exato tamanho da casquinha; no modelo db/db, devido a maior migração epidérmica e contração reduzida, o tamanho da ferida não necessariamente será condizente à casquinha que se sobrepõe (PIGNET et al., 2024).

Por mais que o n amostral das análises histológicas tenha sido pequeno, os resultados observados se mostraram homogêneos entre si. Em relação à coloração Sirius Red (**Figura 4A**), observamos baixa deposição de fibras colágenas nos animais do grupo db/db água em relação ao WT. Em contrapartida, a suplementação com ácido linoleico contribuiu para recuperar a capacidade de remodelamento da matriz extracelular, marcada pela maior deposição de colágeno no grupo db/db LA em relação ao grupo não suplementado. O que é de extrema importância quando falamos em qualidade tecidual e funcionalidade da pele, afinal a matriz extracelular, formada por proteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno, fornece uma rede dinâmica para migração, adesão, proliferação, diferenciação e maturação celular, sendo o seu desenvolvimento fundamental para a cicatrização de feridas, conferindo as características de estabilidade, flexibilidade e resistência da pele (MONAVARIAN, 2019).

Através das análises de histológicas em Hematoxilina e Eosina realizadas com tecido do 21º dia após a lesão (**Figura 4B**), não observamos diferenças nos aspectos gerais da inflamação entre os grupos analisados, demonstrado pela área da ferida predominantemente fechada, baixa infiltração de células inflamatórias, poucos vasos sanguíneos e pela presença de anexos dérmicos como glândulas e folículo piloso, indicativos de tecido regenerado e capacidades funcionais sendo reestabelecidas.

CONCLUSÕES:

Com base nos resultados obtidos concluímos que a suplementação oral com ácido graxo linoleico foi benéfica para o reparo tecidual da pele, tendo em vista que houve melhora na estruturação da matriz extracelular.

BIBLIOGRAFIA

- BALTZIS D, Eleftheriadou I, Veves A. **Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights**. *Adv Ther*. 2014 Aug;31(8):817-36. doi: 10.1007/s12325-014-0140-x. Epub 2014 Jul 29. PMID: 25069580.
- [Guangshan Zhao, Ximing Wu, Wenping Wang, Chung S. Yang, Jinsong Zhang](https://doi.org/10.1002/mnfr.202000505). **Tea Drinking Alleviates Diabetic Symptoms via Upregulating Renal Water Reabsorption Proteins and Downregulating Renal Gluconeogenic Enzymes in db/db Mice**. Volume 4. Edição 24. Wiley Online Library: 13 October 2020 <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000505>
- Holl J, Kowalewski C, Zimek Z, Fiedor P, Kaminski A, Oldak T, Moniuszko M, Eljaszewicz A. **Chronic Diabetic Wounds and Their Treatment with Skin Substitutes**. *Cells*. 2021 Mar 15;10(3):655. doi: 10.3390/cells10030655. PMID: 33804192; PMCID: PMC8001234.
- MONAVARIAN M, Kader S, Moeinzadeh S, Jabbari E. **Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing**. *Tissue Eng Part B Rev*. 2019 Aug;25(4):294-311. doi: 10.1089/ten.TEB.2018.0350. PMID: 30938269; PMCID: PMC6686695.
- Pignet AL, Schellnegger M, Hecker A, Kamolz LP, Kotzbeck P. **Modeling Wound Chronicity In Vivo: The Translational Challenge to Capture the Complexity of Chronic Wounds**. *J Invest Dermatol*. 2024 Jul;144(7):1454-1470. doi: 10.1016/j.jid.2023.11.024. Epub 2024 Mar 13. PMID: 38483357.
- Tinajero MG, Malik VS. **An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes: A Global Perspective**. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2021 Sep;50(3):337-355. doi: 10.1016/j.ecl.2021.05.013. PMID: 34399949.
- Zanchi D, Depoorter A, Egloff L, Haller S, Mählmann L, Lang UE, Drewe J, Beglinger C, Schmidt A, Borgwardt S. **The impact of gut hormones on the neural circuit of appetite and satiety: A systematic review**. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017 Sep;80:457-475. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.06.013. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28669754.