

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DIETA RICA EM INULINA DURANTE A PSORÍASE CRÔNICA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Palavras-Chave: PSORÍASE¹, ÁCIDO GRAXO², INULINA³

Autores(as):

VITÓRIA CHRISTINA GASPAR, FCA - UNICAMP
MS^a. ROBERTA NICOLLI SAGIORATO (coorientadora), FCA - UNICAMP
Prof^a. Dr^a. HOSANA GOMES RODRIGUES (orientadora), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO

A pele é um órgão imunologicamente ativo, no entanto, reações imunológicas desreguladas podem levar a doenças crônicas autoimunes da pele, como a psoríase, que afeta aproximadamente 1,5% da população brasileira (DUARTE; OLIVEIRA; PORTO-SILVA, 2015; ROMITI et al., 2017). A psoríase é caracterizada por placas escamosas e avermelhadas na pele, frequentemente acompanhadas de áreas esbranquiçadas. Essas lesões podem levar a coceira e até mesmo sangramento, resultando em significativo desconforto para o indivíduo. Embora a patologia da psoríase ainda não seja totalmente compreendida, sabe-se que a doença pode ser desencadeada por fatores genéticos e ambientais. A interação desses fatores resulta em hiperproliferação e diferenciação de queratinócitos, gerando hiperplasia epitelial e paraqueratose (DENG *et al.*, 2016; TASHIRO; SAWADA, 2022).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 60 milhões de pessoas são afetadas pela psoríase, sendo essencial aumentar a conscientização sobre a doença, visto que a mesma é classificada como um problema de saúde global. Assim, torna-se necessário avanços científicos no tratamento, que atualmente é limitado e frequentemente associado a efeitos colaterais devido ao uso de imunossupressores para controlar os sintomas (RENDON; SCHÄKEL, 2019; MASCARENHAS-MELO *et al.*, 2022).

Diante desse contexto, tratamentos não convencionais estão sendo investigados para o manejo da psoríase. A nutrição, em particular o uso de imunonutrientes como ácidos graxos, pode oferecer uma abordagem promissora para aliviar ou reduzir os sintomas, com menor risco de efeitos indesejáveis (KANDA et al., 2020).

As fibras alimentares são carboidratos que não são digeridos pelas enzimas do estômago e intestino humano. Ao percorrer o trato gastrointestinal (TGI), essas fibras são, em sua maioria, degradadas pela microbiota intestinal, resultando na formação e liberação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato, sendo o butirato o subproduto mais abundante desse processo (TOPPING e CLIFTON, 2001).

A inulina é uma fibra solúvel encontrada naturalmente em vegetais como chicória e alcachofra de Jerusalém. Quando metabolizada pelas bactérias no lúmen intestinal, a inulina AGCC, que podem servir como fonte de energia para os colonócitos, ou serem transportados pela corrente sanguínea. Estudos sugerem que a administração de inulina pode reduzir processos inflamatórios, melhorar a integridade e a diversidade da microbiota intestinal e, assim, oferecer proteção contra várias doenças intestinais (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 2023). No entanto, ainda não se conhecem os efeitos da inulina sobre as manifestações clínicas da psoríase. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do consumo de dieta rica em inulina durante a psoríase crônica experimental em camundongos.

METODOLOGIA

O projeto foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP) (Protocolo: 6259-1/2023). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 8 semanas de idade, provenientes do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram realizados dois experimentos independentes resultando em 8 camundongos por grupo, sendo os grupos: Controle (C); Imiquimode (IMQ) e Imiquimode + inulina (IMQ + inu). Os grupos receberam dietas com diferentes quantidades de fibras.

Os animais do grupo “C” receberam aplicação tópica de 70 mg de vaselina e dieta controle contendo 5% de celulose), os animais do grupo “IMQ” receberam 70 mg de creme Ixium® (5% Imiquimode, FarmOquímica, Rio de Janeiro, RJ) e dieta controle (contendo 5% de celulose), os animais do grupo “IMQ + inulina” receberam 70 mg de creme Ixium® e dieta com alto teor de inulina (5% de celulose e 10% de inulina) (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 2023).

Para mimetizar a inflamação psoriática crônica, utilizamos o fármaco Imiquimode com potencial de modular a resposta inflamatória, resultando em características semelhantes à psoríase em humanos (Swindell et al., 2017).

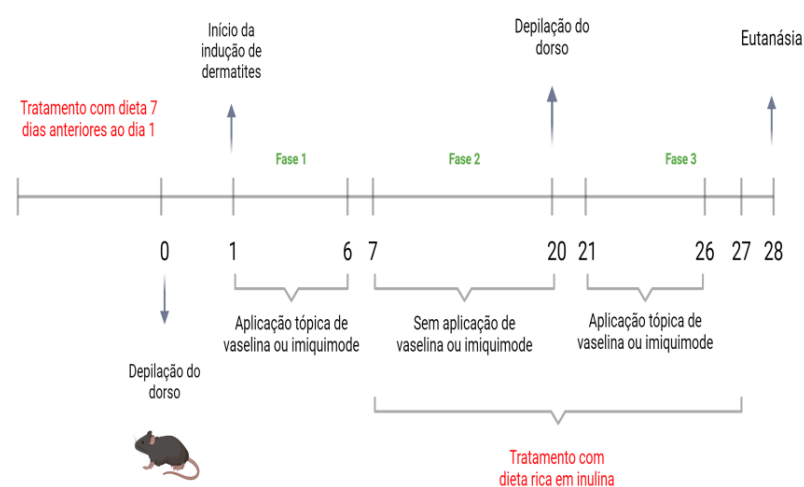


Figura 1. Desenho experimental. A aplicação de imiquimode ocorreu em dois ciclos para mimetizar a psoríase crônica. Os animais foram tratados topicamente com imiquimode por 6 dias. O tratamento oral com a dieta ocorreu entre o 7º e 26º dia de protocolo.

gel (Vasenol®). Para a caracterização do modelo de psoríase experimental crônica, ocorreu o período de recuperação de duas semanas entre os ciclos, onde os animais não receberam aplicação tópica de vaselina ou imiquimode (fase 2). No 20º dia o dorso dos animais foi novamente depilado, com a reaplicação tópica de vaselina ou imiquimode durante 6 dias consecutivos (fase 3). A eutanásia para coleta da pele e do baço foi realizada no 28º dia (FENIX et al., 2020). O consumo da dieta controle e da dieta rica em fibras iniciou sete dias anteriores ao protocolo e continuou até o dia da coleta dos tecidos (28º dia do protocolo) (FACHI et al., 2019). Durante sete dias consecutivos os camundongos foram pesados, após esses dias, a análise do peso corporal foi realizada uma vez por semana.

Para avaliarmos o espessamento epidérmico da pele psoriática, foi realizada a mensuração em (mm) da pele dorsal dos camundongos em cinco regiões diferentes para obter um valor médio. Para aferição das médias das utilizamos um paquímetro digital (Mitutoyo) (ROLLER et al., 2012). O dorso dos animais também foi fotografado diariamente utilizando-se a câmera digital Sony® cyber-shot (DSC-S950S 4X 10MP com zoom óptico)

O consumo de água e ração foi avaliado a partir da média do consumo diário. Dentro de um período de 28 dias, a ração foi pesada e o volume de água medido três vezes na semana, sendo realizada a reposição a cada 7 dias.

Para análises histológicas, coletamos no 28º dia a pele do dorso dos camundongos, e mantivemos em formaldeído 4%. As amostras foram desidratadas em baterias crescentes de etanol e incluídas em blocos de parafina Paraplast, seccionadas em micrótomo rotatório manual (micrótomo Eppendorf®). Em

Os animais foram separados em gaiolas individuais, sendo ofertado 250 mL de água no bebedouro e, aproximadamente, 70g das suas respectivas dietas (5% celulose ou 5% celulose + 10% de inulina) durante 7 dias anteriores ao início do protocolo. Para a indução da psoríase, o dorso dos animais foi depilado com o uso de lâminas. No dia seguinte, os camundongos foram anestesiados com isoflurano utilizando-se o Sistema de Anestesia Inalatória por Infusão – Baixo Fluxo – Compact - Bonther® (volume de 0,3L/m e taxa de infusão de 1,5%, conforme recomendado pelo fabricante). Foi aplicado aproximadamente 70 mg de creme Ixium® (contendo 5% de imiquimode) em uma área de 4 cm (comprimento) x 2 cm (largura), diariamente durante 6 dias consecutivos (fase 1). Os camundongos do grupo controle, foi aplicado 70 mg de vaselina em

seguida, coradas com hematoxilina e eosina para avaliar os aspectos gerais da psoríase. Os materiais foram documentados em fotomicroscópio Eclipse 800 (Nikon, Japão), utilizando-se a câmera digital Coolsnap (Media Cybernetics, USA). Foram realizadas quantitativas das camadas da epiderme, área da epiderme e espessura da epiderme. Para análise do número de camadas da epiderme consideradas 3 fotos de cada corte (aumento de 20x), as camadas de queratinócitos foram contadas e estabelecida uma média das 3 análises (KULIG et al., 2016). Para a análise da área da epiderme, foram tiradas 3 fotos de cada corte (aumento de 10x) e a área foi contornada no software *ImageJ* (HA et al., 2014). Para a análise da espessura da epiderme, 3 fotos de cada corte (aumento de 20x) foram analisadas no *ImageJ* através de 5 linhas retas traçadas entre a epiderme, os valores foram analisados a partir da média dos 5 resultados.

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. 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 para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

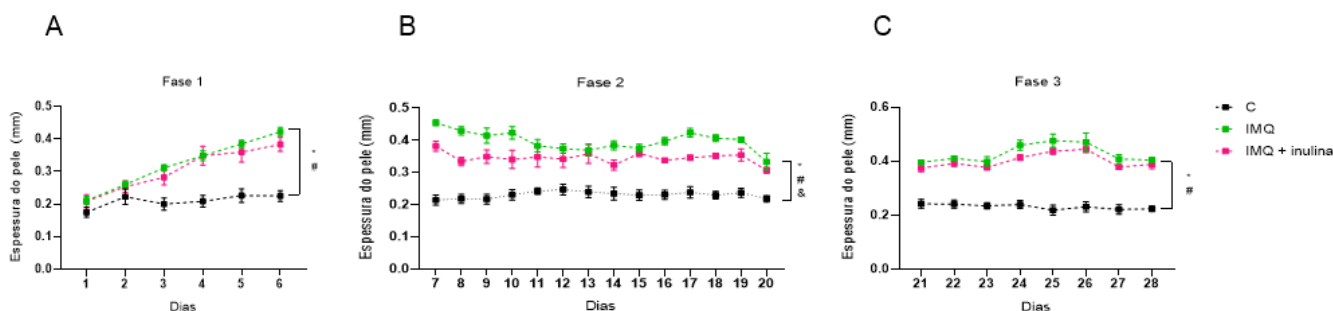


Figura 2. Espessura da pele (mm). Valores são expressos como média \pm erro padrão da média, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$, (*) C versus IMQ, (#) C versus IMQ + inu (A); (*) C versus IMQ, (#) C versus IMQ + inulina, (&) IMQ versus IMQ + inu (B); (*) C versus IMQ; (#) C versus IMQ + inu (C), por Two-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

A aferição da espessura foi realizada diariamente durante todo o protocolo. Os resultados indicam que os animais dos grupos IMQ e IMQ + inulina apresentaram espessura aumentada no dorso em comparação com o grupo controle (C), durante todo o experimento. Esse aumento é atribuído à aplicação de imiquimode, que induz inflamação e, conseqüentemente, espessamento da pele. No entanto, o grupo tratado com dieta rica em inulina mostrou uma redução na espessura do dorso, durante a fase 2, comparado ao grupo não tratado (IMQ), nos dias 7, 8, 9, 10, 14, 16 e 17. Esses efeitos não foram observados em outras fases do protocolo.

Os resultados referentes ao consumo de água mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos ao longo de todo o protocolo. Isso indica que o grupo que ingeriu uma dieta com maior teor de fibras solúveis, não apresentou um aumento no volume de água ingerida em mililitros. Embora esse resultado não corresponda às expectativas relacionadas à composição da dieta, é notável que, apesar da ausência de significância estatística, os grupos IMQ e IMQ + inulina apresentaram um consumo de água que foi semelhante entre si.

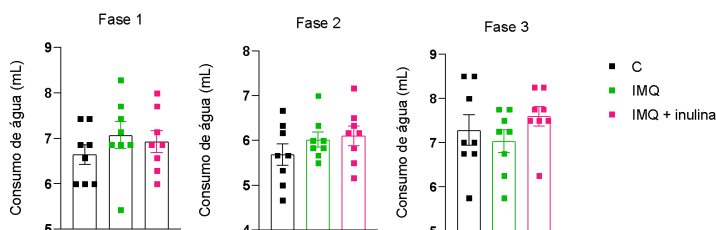


Figura 3. Consumo de água (ml). A ingestão de água dos grupos descritos neste projeto (C, IMQ e IMQ + inulina) foi mensurada três vezes por semana (previamente definidos) durante os 28 dias. Valores são expressos como média \pm erro padrão da média, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$, por One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

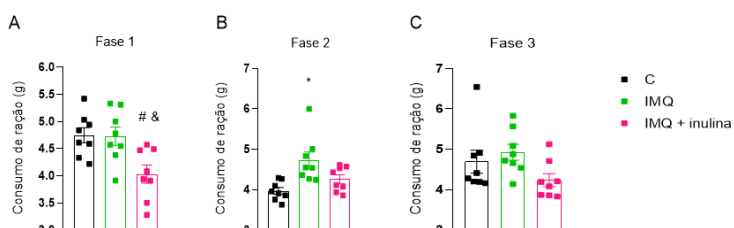


Figura 4. Consumo de dieta (g). Valores são expressos como média \pm erro padrão da média, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, (#) C versus IMQ + inulina, (&); IMQ versus IMQ + inulina (A); (*) C versus IMQ (B), por One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Os resultados do consumo alimentar mostraram que, na fase 1, o grupo IMQ + inulina reduziu a ingestão da dieta em comparação aos grupos IMQ e C. Já na fase 2, o grupo IMQ aumentou o consumo de dieta em relação ao grupo C. Esses resultados sugerem que o grupo que recebeu a dieta com maior teor de fibras, consumiu uma quantidade menor de dieta em gramas em comparação ao grupo não tratado. Esse efeito pode estar relacionado ao aumento da saciedade atrelado ao consumo de fibras.

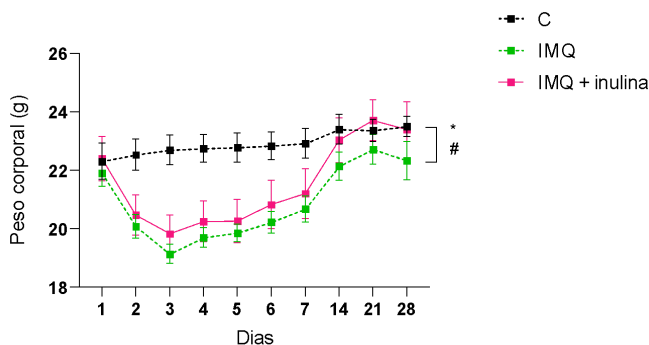
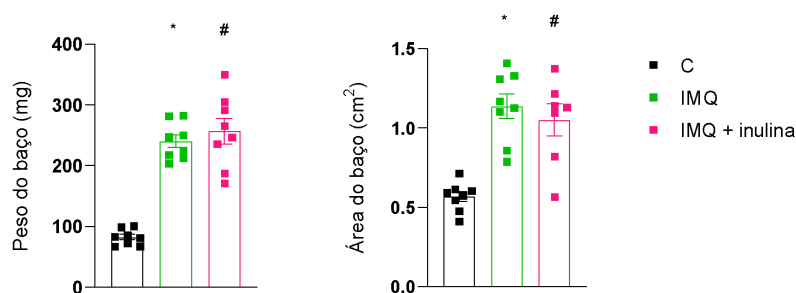


Figura 5. Peso corporal (g). Valores são expressos como média \pm erro padrão da média, sendo considerados significativos os valores de $p < 0.05$, (*) C versus IMQ nos dias 2,3,4,5,6 e 7; (#) C versus IMQ + inu nos dias 2,3,4,5 e 6, por Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Na figura 5 os resultados mostram que os animais dos grupos IMQ e IMQ + inulina apresentaram uma redução do peso corporal em comparação com o grupo C. No entanto, a partir do 7º dia os animais começaram a recuperar peso, resultando em valores mais homogêneos entre os grupos.

Os resultados obtidos por meio da análise com o software *ImageJ* mostram que a área do baço nos grupos IMQ e IMQ + inulina está significativamente aumentada em comparação com o grupo controle C. O mesmo padrão foi observado em relação ao peso do baço, onde os grupos que receberam imiquimode



apresentaram um aumento significativo no peso do órgão em comparação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que o imiquimode induziu uma inflamação sistêmica nos camundongos tratados com o creme, resultando em um aumento do baço, que desempenha um papel crucial na maturação das células T e na resposta imunológica.

Figura 6. Peso (mg) e Área (cm²) do baço. Valores são expressos como média \pm erro padrão da média, sendo considerados significativos os valores de $p < 0.05$, (*) C versus IMQ; (#) C versus IMQ + inu, peso do baço e área do baço, respectivamente, por One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

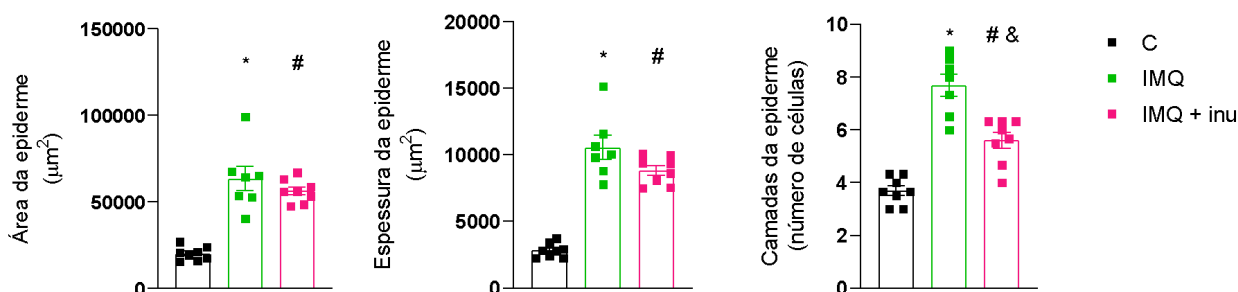
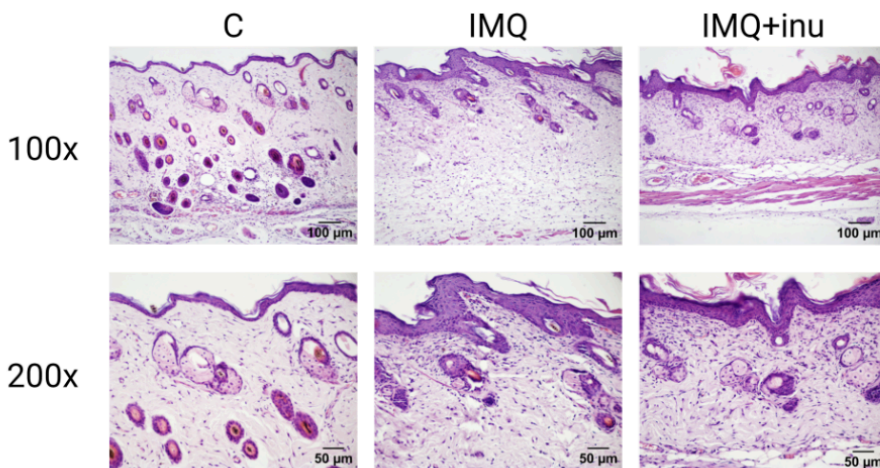


Figura 7. Análise de histologia. Valores são expressos como média \pm erro padrão da média, sendo considerados significativos os valores de $p < 0.05$, (*) C versus IMQ; (#) C versus IMQ + inu; (&) IMQ versus IMQ + inu, área, espessura e camadas da epiderme, respectivamente, por One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Os grupos IMQ e IMQ + inu demonstraram aumento significativo da área e espessura da epiderme quando comparado ao grupo C. Em relação às camadas da epiderme, houve diferença significativa dos grupos IMQ e IMQ + inu quando comparado ao grupo controle, porém, o grupo tratado com dieta rica em

inulina apresentou uma redução significativa das camadas da epiderme em comparação ao grupo IMQ. Esses resultados indicam a necessidade de análises adicionais para entender como a inulina está modulando o número de camadas da epiderme.

28 dias



A partir da análise histológica de 28 dias, na coloração em hematoxilina e eosina as imagens representativas demonstram um maior espessamento da epiderme, devido a hiperproliferação de queratinócitos, durante a formação de placas psoriáticas, característicos da doença. Observou-se a presença de acantose com projeções da epiderme na derme, bem como paraceratose, resultado da rápida maturação das células epidérmicas e da ausência da camada granulosa.

Figura 8. Imagens representativas. As fotos estão apresentadas em escala de 100 e 50 µm respectivamente.

CONCLUSÃO

Os efeitos da administração oral da dieta rica em inulina durante a psoríase crônica experimental não demonstraram resultados significativos relacionados aos aspectos macroscópicos e microscópicos da inflamação psoriática.

BIBLIOGRAFIA

- DUARTE, G.; OLIVEIRA, M.; PORTO-SILVA, L.. Epidemiology and treatment of psoriasis: a Brazilian perspective. **Psoriasis: Targets and Therapy**, p. 55-64, 2015.
- ROMITI, R. *et al.* Prevalence of psoriasis in Brazil - a geographical survey. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 8, p. 167-168, 2017.
- DENG, Y. *et al.* The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**. 2016, 377-389, vol. 50 (2016).
- RENDON, A.; SCHÄKEL, K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1-28, 2019
- KANDA, *et al.* Nutrition and Psoriasis. **International journal of molecular sciences**. vol. 21,15 5405. (2020). doi:10.3390/ijms21155405.
- TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiol.Rev.**, v.81, n.3, p. 1031-64, 2001.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R. *et al.*Inulin diet uncovers complex diet-microbiota-immune cell interactions remodeling the gut epithelium. **Microbiome**, v.11, n.1, p. 90, 2023.
- FENIX, K. *et al.* Immunological memory in imiquimod-induced murine model of psoriasisform dermatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1– 13, 2020.
- FACHI, J. L. *et al.* Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. **Cell Reports**, v. 27, n. 3, p. 750- 761.e7, 2019.
- ROLLER, A. *et al.* Blockade of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)δ or PI3Kγ Reduces IL-17 and Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Dermatitis. **The Journal of Immunology**, v.189, n. 9, p. 4612–4620, 2012.