

Potencial efeito inflamatório do óleo mineral utilizado como placebo em ensaios clínicos e experimentais.

Palavras chave: Óleo mineral; Placebo; Inflamação.

Aluno(a): Beatriz Moreira Nascimento

Orientador(a): Dennys Esper Cintra

Coorientador(a): Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari

Introdução:

O óleo mineral (OM), uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos derivados do petróleo, é usado como lubrificante e no tratamento da constipação intestinal, facilitando o amolecimento das fezes ao aumentar a secreção de água no intestino. Por não ser digerido nem absorvido, é considerado fisiologicamente inerte (Silva, 2010) e frequentemente utilizado como placebo em ensaios clínicos (Olshansky et al., 2020).

Ensaio controlados por placebo são o padrão-ouro para testar intervenções farmacológicas (Bostrom et al., 2021). Contudo, a inércia do OM como placebo foi questionada após o estudo REDUCE-IT, um ensaio multicêntrico, randomizado e duplo-cego com pacientes cardiovasculares. Nesse estudo, o grupo placebo que recebeu OM apresentou aumento de marcadores inflamatórios e alterações no perfil lipídico, como elevação de

LDL-C, lipoproteína B e proteína C reativa de alta sensibilidade (Deepak et al., 2019; Olshansky et al., 2020). Em contraponto, O estudo STRENGTH, que avaliou derivados de ômega-3 (EPA e DHA), utilizou óleo de milho como placebo e foi interrompido precocemente por não mostrar diferenças significativas entre os grupos, indicando ausência de efeito do tratamento (Nicholls et al., 2020). Esse contraste com o REDUCE-IT sugere que os efeitos observados neste último podem estar relacionados ao OM, evidenciando a necessidade de investigar seus efeitos biológicos (Bostrom et al., 2021).

Estudos experimentais indicam que a administração crônica de OM em camundongos aumenta a permeabilidade intestinal, eleva proteínas ligadoras de LPS e amiloide sérico A (SAA), um marcador de inflamação sistêmica (Pieterman et al., 2021). Outro estudo mostrou aumento de SAA, maior expressão de

L-selectina e redução de células B de memória, sugerindo infiltração tecidual e alteração imune (Gopaul et al., 2021). Assim, este estudo visa investigar o OM como possível agente pró-inflamatório.

Metodologia

Animais, eutanásia e coleta de amostras

O experimento, aprovado pelo CEUA (certificado nº 206/2024), utilizou doze camundongos machos C57, divididos em dois grupos de seis. Um grupo recebeu soro fisiológico (controle) e o outro, OM (tratado), ambos na dose de 30 µL por via oral, uma vez ao dia por 15 dias. Os animais foram monitorados quanto ao peso ao longo do experimento. Após os 15 dias de tratamento, os camundongos foram eutanasiados conforme normas da CEUA. Coletaram-se amostras de fezes e sangue para análises cromatográficas. O intestino foi removido para análises histológicas e moleculares, e o fígado foi armazenado a -80 °C para estudos futuros. O baço foi retirado e pesado, e o conteúdo do íleo foi diluído (1:5) em água destilada para aferição do pH.

Análises Histológicas

Os fragmentos intestinais foram fixados em solução de paraformaldeído a 10%, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xileno e posteriormente incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram obtidos com espessura de 5 µm,

utilizando micrótomo da marca Microm, modelo HM340E. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para evidenciar a morfologia geral dos tecidos. As imagens foram analisadas por meio do software CoreIDRAW, que permitiu a delimitação das estruturas de interesse. A altura das vilosidades intestinais foi medida traçando-se uma linha da base até o ápice de cada vilosidade. Para definição da base, utilizou-se como referência o ápice das glândulas intestinais, onde se localizam as células de Paneth. Nos casos em que essas estruturas não estavam visíveis ou bem definidas, considerou-se como base a transição morfológica em que a conformação celular deixava de se assemelhar à das vilosidades. Na ausência total de identificação das criptas, a camada muscular da mucosa foi utilizada como ponto de referência inferior para a medição. A espessura da túnica muscular foi avaliada em três pontos distintos ao longo da amostra, para minimizar variações locais e obter uma média representativa. As delimitações foram feitas com o auxílio da ferramenta de polilinhas do CoreIDRAW.

Análise de expressão gênica (RT-qPCR)

Para avaliar a expressão gênica de marcadores inflamatórios, analisou-se a expressão da interleucina-1 beta (IL1β) no íleo. O RNA foi extraído com TRIzol® e homogeneização em TissueLyser II. A partir de 2 µg de RNA, sintetizou-se cDNA usando kit da Thermo Fisher. A expressão gênica foi quantificada por qPCR, com detecção via SYBR

Green e TaqMan®, em equipamento 7500 Fast. Os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, com normalização por gene de referência.

Análises estatísticas:

Para a análise estatística, inicialmente verificamos a normalidade dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Para dados paramétricos, utilizamos o teste t de Student, não pareado. Já para dados não paramétricos, aplicamos o teste de Mann-Whitney.

Resultados e discussão:

Figura 1

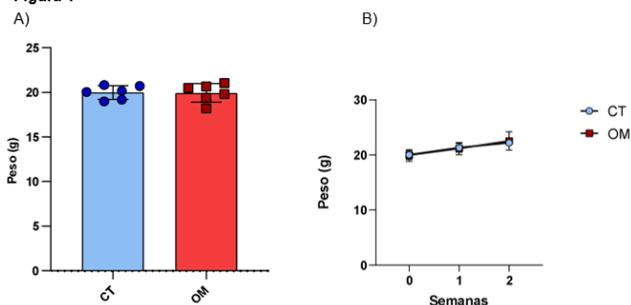


Figura 1 - Randomização (A); Acompanhamento semanal do peso (B).

A randomização foi conduzida com base no peso corporal, visando garantir uma distribuição homogênea entre os grupos. Os camundongos foram pesados e organizados em ordem crescente; em seguida, foram pareados com base em pesos semelhantes. Dentro de cada par, um animal foi alocado aleatoriamente ao grupo OM e o outro ao grupo controle (CT). O que permitiu formar grupos com peso inicial

equivalente, reduzindo interferências nos desfechos avaliados (Figura 1A). O peso corporal foi monitorado semanalmente, e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ao final do tratamento (Figuras 1B).

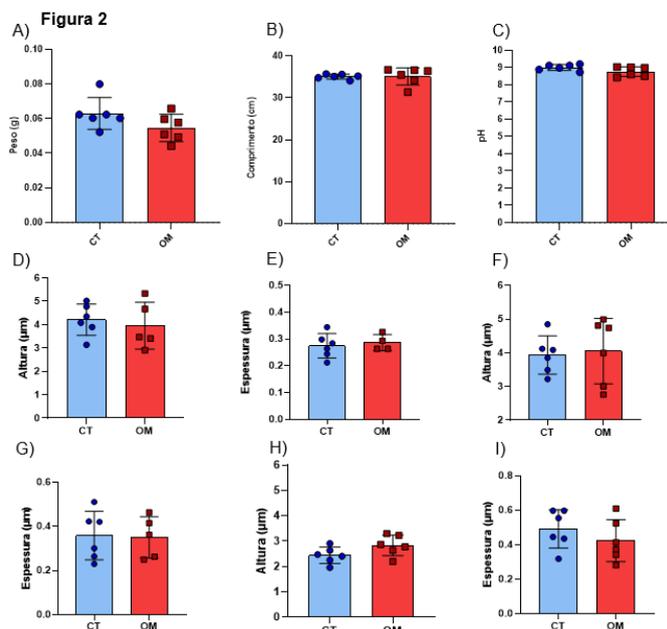


Figura 2 - Peso baço (A); Comprimento do intestino (B); pH do conteúdo do íleo (C); Altura da vilosidade do duodeno (D); Espessura da túnica muscular duodeno (E); Altura da vilosidade do jejuno (F); Espessura da túnica muscular jejuno (G); Altura da vilosidade do íleo (H); Espessura da túnica muscular íleo (I).

Estudos indicam que substâncias aparentemente inertes, como o OM, podem infiltrar tecidos (Vera-Lastra et al., 2018) e aumentar o peso do baço, sugerindo ativação imune (Gopaul et al., 2021). Por isso, o peso do baço foi avaliado como marcador de inflamação sistêmica (Schrenk et al., 2021), mas não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 2A), possivelmente devido à formulação, dose, via de administração ou modelo experimental.

Para investigar efeitos inflamatórios no intestino, mensurou-se o comprimento intestinal, que pode encurtar com inflamação (Peuhkuri et al., 2010). O intestino delgado foi segmentado em duodeno, jejuno e íleo para análises, sem diferenças significativas entre os grupos (Figura 2B). Para investigar possíveis alterações no intestino, foi medido o pH do conteúdo do íleo, uma região sensível a mudanças luminais que podem indicar inflamação local (Sun et al., 2021). Não houve diferenças significativas entre os grupos tratados com OM e CT (Figura 2B), sugerindo ausência ou baixa intensidade de inflamação no íleo. A análise histológica também não mostrou diferenças na altura das vilosidades nem na espessura da túnica muscular nos segmentos duodeno, jejuno e íleo, indicando que o OM não causou alterações estruturais relevantes (Figuras 2D a 2I).

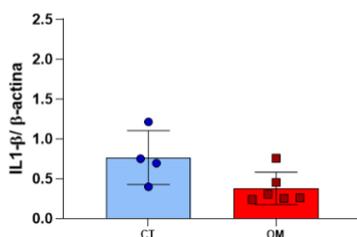


Figura 3 - Níveis de Interleucina 1-beta.

Além das análises morfológicas e fisiológicas, foi avaliada a expressão gênica da interleucina-1 beta (IL1 β) no íleo para investigar respostas inflamatórias locais (Coccia et al., 2012). Os resultados da RT-qPCR não mostraram diferença significativa entre os

grupos CT e OM (Figura 3A).

Esses resultados indicam que, nas condições testadas, o OM não causou inflamação detectável. Entretanto, limitações importantes incluem a ausência de avaliação da permeabilidade da barreira intestinal e do fígado, órgãos relevantes para a resposta imune e metabolismo.

Conclusões

Neste estudo, investigamos os efeitos inflamatórios da administração oral de OM em camundongos, focando em marcadores morfológicos, fisiológicos e moleculares no intestino delgado. Apesar de estudos anteriores sugerirem potencial pró-inflamatório do OM, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros avaliados. Assim, destaca-se a necessidade de estudos adicionais que investiguem outros órgãos e parâmetros funcionais para uma avaliação mais completa da segurança e dos possíveis efeitos biológicos do OM.

Bibliografia

1. Silva P. Farmacologia. 8^a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2010.
2. Olshansky B, et al. Mineral oil: safety and use as placebo in REDUCE-IT and other clinical studies. Eur Heart J Suppl. 2020;22(Suppl J):J34–J48.
3. Bostrom JA, Beckman JA, Berger JS. Summoning STRENGTH to Question the Placebo in REDUCE-IT. Circulation. 2021;144(6):407–409.

4. Bhatt DL, et al. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med.* 2019;380(1):11–22.
5. Nicholls SJ, et al. Effect of High-Dose Omega-3 Fatty Acids vs Corn Oil on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients at High Cardiovascular Risk. *JAMA.* 2020;324(22):2268.
6. Pieterman EJ, et al. Chronic Oral Administration of Mineral Oil Compared With Corn Oil: Effects on Gut Permeability and Plasma Inflammatory and Lipid Biomarkers. *Front Pharmacol.* 2021;12.
7. Gopaul VS, et al. Effects of mineral oil administration on the pharmacokinetics, metabolism and pharmacodynamics of atorvastatin and pravastatin in mice and dogs. *Eur J Pharm Sci.* 2021;161:105776.
8. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497–509.
9. Hartman L, Lago RC. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract.* 1973;22(6):475–6 passim.
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402–408.
11. Schrenk D, Bignami M, et al. Atualização da avaliação de risco de hidrocarbonetos de OM em alimentos. *EFSA J.* 2023;21(9):e08215. doi:10.2903/j.efsa.2023.8215.
12. Vera-Lastra O, Medina G, Cruz-Domínguez MP, et al. Síndrome autoimune/inflamatória induzida por OM: um problema de saúde. *Clin Rheumatol.* 2018;37(6):1441–1448. doi:10.1007/s10067-018-4078-2.
13. Sun Y, Koyama Y, Shimada S. Measurement of intraluminal pH changes in the gastrointestinal tract of mice with gastrointestinal diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;620:129–134. doi:10.1016/j.bbrc.2022.06.061.
14. Zhao D, Jiao S, Yi H. A exposição ao arsênico induz toxicidade do intestino delgado em camundongos por danos à barreira e resposta inflamatória por meio da ativação das vias de sinalização RhoA/ROCK e TLR4/Myd88/NF- κ B. *Toxicol Lett.* 2023;384:44–51. doi:10.1016/j.toxlet.2023.07.007.
15. Ha SE, Wei L, Jorgensen BG, et al. Um modelo de camundongo de obstrução parcial intestinal. *J Vis Exp.* 2018;(133):57381. doi:10.3791/57381.
16. Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, et al. IL-1 β medeia a inflamação intestinal crônica, promovendo o acúmulo de células linfóides inatas secretoras de IL-17A e células Th17 CD4(+). *J Exp Med.* 2012;209(9):1595–1609. doi:10.1084/jem.20111453.