



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Rayssa Lopes Martins

**Comparação entre o uso do óleo de oliva e ácidos graxos em lesões cutâneas
agudas em camundongos**

Rio de Janeiro

2020

Rayssa Lopes Martins

Comparação entre o uso do óleo de oliva e ácidos graxos em lesões cutâneas agudas em camundongos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Andréa Monte Alto Costa

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M386 Martins, Rayssa Lopes.
Comparação entre o uso do óleo de oliva e ácidos graxos em lesões cutâneas agudas em camundongos / Rayssa Lopes Martins – 2020.
46f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Andréa Monte Alto Costa

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Pele – Reparos e reconstrução - Teses. 2. Cicatrização de feridas - Teses. 3. Ácidos graxos – Teses. 4. Óleos – Uso terapêutico. I. Costa, Andréa Monte Alto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616-003.9

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rayssa Lopes Martins

Comparação entre o uso do óleo de oliva e ácidos graxos em lesões cutâneas agudas em camundongos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de dezembro 2020 .

Orientadora: Prof.^a Dra. Andréa Monte Alto Costa
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. Eduardo Tavares Lima Trajano
Universidade de Vassouras

Prof.^a Dra. Bianca Martins Gregório
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Vinicius Novaes Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Deus, que quando eu achava que não conseguiria, que eu não era capaz e que estava tudo perdido, Ele veio e restaurou meus sonhos e me deu infinitamente mais do que eu imaginava. Obrigada meu Deus!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à Deus por ter me sustentado até aqui.

Aos meus pais por todo incentivo, investimento e parceria durante todos esses anos.

À minha tia por sempre torcer por mim e me incentivar.

Aos meus amigos por sempre vibrarem por cada etapa desse trabalho e torcerem sempre pela minha felicidade

Em especial aos meus amigos da faculdade pra vida (Welker e Valentina), aos meus amigos do laboratório (Bianca, Aline, Fernanda, Raquel, Camilla, Andrea), aos meus amigos da célula por sempre orarem por mim. Gratidão!

Aos alunos de iniciação científica por somarem comigo nesse trabalho. Obrigada Sarah, Natalie e Bianca. Desejo a vocês um futuro brilhante.

Gratidão.

Nem preciso mais saber pra onde vou ou quanto tempo ainda falta pra chegar pois eu sei de alguém que encontrou o seu lugar. E esse alguém sou eu, não direi adeus. Eu sei bem aqui dentro que o Senhor não me esqueceu.

Daniela Araújo

RESUMO

MARTINS, Rayssa Lopes. **Comparação entre o uso do óleo de oliva e ácidos graxos em lesões cutâneas agudas em camundongos** 2020. 46f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

As lesões cutâneas podem ser um grave problema de saúde devido à morbidade associada e aos altos custos envolvidos no seu tratamento. Uma formulação comercial rica em ácidos graxos essenciais e triglicéridos é amplamente utilizada para prevenção e tratamento de injúrias, porém, esta formulação possui alto custo, dificultando o acesso a este tratamento. Entretanto, já foi mostrado que, em algumas situações, o óleo de oliva, que possui baixo custo, pode promover o reparo cutâneo por possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. Surge a hipótese de que o óleo de oliva é um produto capaz de auxiliar na reparação tecidual, à semelhança de uma formulação rica em ácidos graxos. O objetivo do estudo foi comparar os efeitos de uma formulação comercial rica em ácidos graxos ao óleo de oliva na cicatrização de lesões agudas em camundongos. Camundongos Swiss machos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: controle, óleo de oliva e ácidos graxos, tratados respectivamente com óleo mineral, óleo de oliva extra virgem e solução de ácidos graxos. As lesões foram realizadas nas costas dos camundongos e tratadas topicamente com os compostos. Seis dias após o ferimento, as lesões tratadas com óleo de oliva e ácidos graxos diminuíram em comparação ao grupo controle. O óleo de oliva diminuiu a quantidade de neutrófilos. A expressão de VEGF estava aumentada nos grupos óleo de oliva e ácidos graxos. Além disso, o óleo de oliva demonstrou ser um antioxidante por apresentar menor quantidade de ROS, nitrito e TBARS em comparação ao grupo controle. Com os resultados obtidos foi possível concluir que tanto a aplicação tópica de óleo de oliva quanto de um composto rico em ácidos graxos foi capaz de melhorar a cicatrização de lesões agudas em camundongos.

Palavras-chave: Óleo de oliva. Lesões agudas. Ácidos graxos. Reparo tecidual. Camundongos.

ABSTRACT

MARTINS, Rayssa Lopes. **Comparison between the use of olive oil and fatty acids in acute skin lesions in mice.** 2020. 46f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Skin lesions can be a serious health problem due to the associated morbidity and high costs involved in their treatment. A commercial formulation rich in essential fatty acids and triglycerides is widely used to prevent and treat injuries, however, this formulation has a high cost, making access to this treatment difficult. However, it has already been shown that, in some situations, olive oil, which has a low cost, can promote skin repair by having antioxidant and anti-inflammatory properties. The hypothesis arises that olive oil is a product capable of assisting tissue repair, similar to a formulation rich in fatty acids. The aim of the study was to compare the effects of a commercial formulation rich in fatty acids with olive oil on the healing of acute lesions in mice. Male Swiss mice were randomly divided into 3 groups: control, olive oil and fatty acids, treated respectively with mineral oil, extra virgin olive oil and fatty acid solution. The lesions were performed on the mice's back and treated topically with the compounds. Six days after the injury, injuries treated with olive oil and fatty acids decreased compared to the control group. Olive oil decreased the amount of neutrophils. VEGF expression was increased in the olive oil and fatty acid groups. In addition, olive oil proved to be an antioxidant because it has a lower amount of ROS, nitrite and TBARS compared to the control group. With the results obtained it was possible to conclude that both the topical application of olive oil and a compound rich in fatty acids was able to improve the healing of acute lesions in mice.

Keywords: Olive oil. Acute lesions. Fatty acids. Wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Efeito do tratamento tópico de lesões agudas em camundongos com ácidos graxos essenciais e óleo de oliva.....	31
Figura 2 –	Efeito do tratamento tópico de lesões agudas em camundongos com ácidos graxos e óleo de oliva em macrófagos e neutrófilos seis dias após a lesão.....	33
Figura 3 –	Efeito do tratamento tópico de lesões agudas em camundongos com ácidos graxos e óleo de oliva no colágeno seis dias após a lesão.....	35
Figura 4 –	Efeito do tratamento tópico de lesões agudas em camundongos com ácidos graxos e óleo de oliva no estresse oxidativo / nitrosativo e no dano seis dias após a lesão.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ERO	Espécie reativa de oxigênio
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TGF- α	Fator de crescimento transformador alfa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
MCP-I	Proteína quimioatrativa de monócito 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
EGF	Fator de crescimento epidérmico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MMP	Metaloproteínases
MEC	Matriz extracelular
AGE	Ácidos graxos essenciais
ATP	Adenosina trifosfato
HE	Hematoxilina e eosina
MPO	Mieloperoxidase
BCA	Ácido bicinconímico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
α	Alfa
μ l	Microlitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REPARO TECIDUAL CUTÂNEO	15
2	ÓLEO DE OLIVA	18
3	ÁCIDOS GRAXOS	20
4	OBJETIVOS	22
4.1	Geral	22
4.2	Específicos	22
5	MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1	Animais	23
5.2	Modelo de lesão	23
5.3	Desenho experimental	23
5.4	Análises macroscópicas	24
5.5	Sacrifício e coleta de amostras	25
5.6	Análises histológicas	25
5.7	Imunohistoquímica	26
5.8	Imunoblotting	27
5.9	Dosagem de espécies reativas de oxigênio	28
5.10	Nitrito	28
5.11	Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	29
5.12	Análise estatística	29
6	RESULTADOS	30
6.1	Macroscopia, contração e reepitelização	30
6.2	Inflamação, infiltração de neutrófilos e macrófagos	32
6.3	Deposição de matriz extracelular, diferenciação miofibroblástica e angiogênese	34
6.4	Estresse e dano oxidativo	35
7	DISCUSSÃO	37
	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	44
ANEXO B – Análise do óleo de oliva.....	45

INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo em que o tecido danificado é substituído por uma cicatriz ¹ e esse processo envolve alguns componentes da matriz extracelular e células como fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais e epiteliais. Além disso, há a participação de células de defesa, como neutrófilos e macrófagos, e mediadores, como citocinas e fatores de crescimento ². Esse processo é dividido didaticamente em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, com o objetivo de restabelecer a homeostase por meio da substituição do tecido lesado por um tecido mecanicamente e estruturalmente semelhante ao fisiológico ³.

No entanto, as lesões cutâneas podem ser um problema de saúde muito grave devido à morbidade associada e aos altos custos envolvidos no seu tratamento ⁴ principalmente em pacientes idosos e gravemente enfermos, e, portanto, a busca por terapias que minimizem essas lesões ou permitam sua cicatrização completa são de extrema importância.

Uma formulação comercial rica em ácidos graxos essenciais e triglicérides (Dersani®) é amplamente utilizada para prevenção e tratamento de escaras ou lesões por pressão. Apesar de ser um produto bastante utilizado na clínica, não existem estudos conclusivos que demonstrem a ação dos ácidos graxos essenciais no processo de cicatrização. Um estudo mostrou que o tratamento tópico da lesão com ácidos graxos essenciais aumenta as citocinas pró-inflamatórias, auxiliando no reparo das lesões ^{5,6}. Essa formulação forma uma barreira protetora na pele, evitando a maceração, proporcionando alívio após a primeira aplicação e com grande capacidade de regeneração tecidual ⁷. No entanto, essa formulação tem alto custo, dificultando o acesso a esse tratamento.

Em busca de um produto mais acessível e com propriedades benéficas para o tratamento de lesões, o óleo de oliva se torna uma alternativa a ser avaliada. O óleo de oliva é um produto natural rico em ácido oleico (ácido graxo monoinsaturado) e possui propriedades benéficas no processo de cicatrização, como antiinflamatório e antioxidante ⁸. O óleo de olival também demonstrou ser capaz de acelerar a infiltração de células inflamatórias e liberação de citocinas pró-inflamatórias e mediar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), melhorando o fechamento de lesões ^{9,10}. No entanto, pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação na reparação do tecido cutâneo quando usado topicamente.

O objetivo do estudo foi comparar os efeitos de uma formulação comercial rica em ácidos graxos ao óleo de oliva na cicatrização de lesões agudas.

1. REPARO TECIDUAL CUTÂNEO

O reparo tecidual é um processo complexo e dinâmico, importante para a recuperação da homeostase do organismo após uma lesão, que ocorre através de uma série de interações entre células, mediadores e matriz extracelular ^{1,11}. O reparo tecidual pode ser dividido didaticamente em quatro fases diferentes que se sobrepõem: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento ^{2,3}. O objetivo final da cascata de reparo tecidual é reestabelecer a homeostase substituindo o tecido lesionado por um tecido mecanicamente e estruturalmente semelhante ao fisiológico, a cicatriz³.

A primeira fase do reparo tecidual é a hemostasia. A hemorragia inicial expõe o tecido conjuntivo subendotelial altamente trombogênico para as plaquetas, que são ativadas por proteínas da matriz, como colágeno e fibronectina, presentes na parede vascular ¹. A ativação das mesmas leva à adesão e agregação, assim como à liberação de mediadores. As plaquetas são então incorporadas por uma matriz inicial composta de fibrina, fibrinogênio e fibronectina ³. Além de preencher o leito da lesão, o coágulo servirá como matriz provisória para migração de diversos tipos celulares ¹², e concentrará citocinas e fatores de crescimento no local da lesão. As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento como o TGF- β e o PDGF, que induzem o influxo de células inflamatórias para o leito da lesão ¹³.

A inflamação é essencial para o reparo, e a inibição ou prolongamento desta fase pode resultar no comprometimento de todo o processo ¹³. Esta fase é caracterizada pelo intenso crescimento e migração de células. Em resposta a quimioatrativos específicos como: fragmentos proteicos de matriz extracelular, fator de crescimento transformante beta (TGF- β), proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-1) e alterações moleculares na superfície de células endoteliais de capilares da área da lesão, os monócitos invadem a lesão e se diferenciam em macrófagos ^{1,14}. O recrutamento dos neutrófilos inicia a limpeza dos debris celulares e a fagocitose de agentes infecciosos. Se o estímulo para a infiltração neutrofílica não persistir, os neutrófilos serão exudados ou fagocitados pelos macrófagos ^{11,15}. A liberação de fatores de crescimento estimula os eventos que caracterizam a fase proliferativa. Esta fase é marcada pela proliferação e migração de diversos tipos celulares ¹⁴. Alguns eventos desta fase são a fibroplasia, angiogênese, reepitelização e formação do tecido de granulação ^{1,11}. A fibroplasia é o processo de proliferação e migração dos fibroblastos através da matriz provisional e a deposição de proteínas da matriz extracelular ¹. A expressão de TGF- β pelos macrófagos induz a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos ¹¹. Os miofibroblastos

possuem filamentos de actina citoplasmáticos similares aos encontrados em células musculares lisas, e possuem a habilidade de se contrair ¹. Esta característica confere aos miofibroblastos o papel de mediadores da contração da lesão ¹. A contração aproxima os bordos da mesma, diminuindo a área da lesão e facilitando o reparo ¹². Esse evento envolve uma complexa interação entre células, matriz celular e citocinas. Os pseudópodos dos miofibroblastos se estendem e a actina citoplasmática dos miofibroblastos se liga à fibronectina extracelular, às fibras de colágeno e retraem, produzindo a contração da lesão ¹.

Durante esse processo, ocorre também a angiogênese, que consiste na formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes ¹⁴. Diversos fatores estimulam este evento, como a baixa quantidade de oxigênio e a liberação de VEGF por células presentes na lesão (plaquetas, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células epidérmicas) ^{1,11,14}. As células endoteliais estimuladas proliferam e migram em direção ao leito da lesão através da digestão enzimática da membrana basal e da projeção de pseudópodes, formando estruturas tubulares ¹⁴. Ao mesmo tempo se inicia a reepitelização, um processo através do qual os queratinócitos das margens da lesão são estimulados a proliferar e migrar em direção ao centro da lesão formando uma língua migratória por baixo do coágulo e um epitélio estratificado com a finalidade de reestabelecer a integridade da pele, originando a neopiderme ¹⁴. Esse processo é estimulado por citocinas como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o TGF- α secretados pelos macrófagos e plaquetas ¹¹.

A fase de remodelamento é caracterizada pela redução da celularidade e substituição do tecido de granulação rico em colágeno tipo III por uma cicatriz rica em colágeno tipo I e com poucas células e poucos vasos ^{16,17}. O colágeno tipo III, que é inicialmente depositado na matriz extracelular é menos espesso que o colágeno da pele sã, e é orientado paralelamente à lesão ¹¹. O remodelamento de colágeno durante a transição de tecido de granulação para cicatriz depende da síntese e catabolismo contínuos ^{12,14}. Conforme aumenta a quantidade de colágeno tipo I depositado na cicatriz, aumenta também a força tensil da cicatriz ¹³. Com o reparo da lesão, a celularidade no local começa a diminuir através da apoptose de miofibroblastos e células vasculares ¹⁷.

Por ser um processo dinâmico e bem orquestrado por diversas células e mediadores, diversos fatores podem alterar o processo normal de reparo da pele, e quanto maior o tempo para a realização do reparo, pior para a lesão ^{1,11}. Esse processo de cicatrização pode ser prejudicado por alguns fatores que favorecem o retardo em qualquer uma de suas fases. Esses fatores estão relacionados à ferida e/ou indivíduo. O retardo cicatricial pode ocasionar

complicações para a vida do paciente, causando prejuízos estéticos, funcionais, econômicos e sociais.

2. ÓLEO DE OLIVA

Usado ricamente na dieta mediterrânea, o óleo de oliva é obtido diretamente de azeitonas e exclusivamente por meios mecânicos quando se trata de óleo de oliva virgem. O óleo de oliva é rico em ácido oleico e compostos fenólicos (hidroxitirosol e oleuropeína), que possuem propriedades antioxidantes¹⁸. Contêm principalmente um ácido graxo monoinsaturado (ácido oleico) que apresenta mais de 80% do total de óleo de oliva, além de ácidos graxos poliinsaturados (linoléico e α -linolênico) e uma pequena quantidade de ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico). Também está presente na composição do óleo de oliva uma mistura complexa de: hidrocarbonetos, tocoferóis, compostos fenólicos, esteróis, clorofila, carotenóides, ácidos terpênicos, monoglicerídeos e diglicerídeos, ácidos graxos livres, ésteres e outros voláteis¹⁹.

Durante o processo de reparo tecidual, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas pelas células inflamatórias e atuam na defesa do organismo contra bactérias³. As EROs também são formadas no corpo durante metabolismo normal e, a uma taxa mais elevada, mediante exposição a fatores ambientais como fumaça de cigarro e poluentes, ou como consequência de doenças e traumática eventos. Se as EROs não forem interceptadas e neutralizadas, elas podem causar sérios danos a moléculas essenciais, como DNA, proteína, ácidos graxos poliinsaturados, especialmente aqueles nos fosfolipídios das membranas celulares e lipoproteína. E como consequência, podem retardar o reparo tecidual¹⁸.

Os tocoferóis, presentes no óleo de oliva, são álcoois solúveis em gordura que funcionam como vitamina E, especialmente α -tocoferol, um antioxidante muito importante¹⁹. O α -tocoferol é capaz de interceptar radicais livres e impedir a destruição de lipídios no nível da membrana celular. Também protege a lipoproteína baixa densidade (LDL) da oxidação. A LDL oxidada está implicada no desenvolvimento de doenças cardiovasculares¹⁸. Outros compostos importantes são os fenólicos. Os mais importantes são o 5-hidroxitirosol e seu éster de ácido elenólico, oleuropeína, sendo este último um constituinte exclusivo das folhas de oliveira e do óleo de oliva¹⁰.

O hidroxitirosol é um composto fenólico muito importante presente no óleo de oliva. Tem como característica promover a expressão de NRF2 e desintoxicar enzimas¹⁰. Além disso tem como função principal um importante antioxidante, e anti-inflamatório na composição do óleo de oliva, que podem promover proteção contra doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e câncer²⁰.

Um dos compostos em abundância é o ácido oleico, um ácido monoinsaturado com propriedades anti-inflamatórias extraído da azeitona, também é capaz de modular o reparo tecidual, pois a sua aplicação tópica diminui a expressão gênica de MMP-2, aumenta a da MMP-9 e do colágeno tipo III ²¹. A administração oral de ácido oleico em ratos acelera a migração de células inflamatórias, citocinas e produção de EROs em lesões cutâneas agudas melhorando o fechamento das lesões cutâneas ^{5,21,22}. Sendo assim, a administração de ácido oleico modula a fase inflamatória do reparo tecidual, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, acelerando a produção de EROs, levando a uma rápida solução da fase inflamatória e resultando no rápido fechamento das lesões.

Foram demonstrados alguns tipos de administração do óleo de oliva. Sobre o uso oral, foi visto que a suplementação dietética com óleo de oliva em camundongos com estresse crônico reduz a resposta inflamatória, a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas melhorando o fechamento da ferida e a deposição de colágeno ²³. Em pacientes queimados, uma dieta suplementada com 20% de azeite reduz o tempo de permanência no hospital e promove a cicatrização de queimaduras de segundo grau ²⁴. Em ensaios clínicos, a aplicação de um creme com Aloe vera e azeite de oliva em úlceras de pressão diminui o tamanho da ferida, a área necrótica e a dor ²⁵. Outro estudo demonstra que a administração tópica de azeite de oliva extra virgem previne a formação de úlceras de pressão em pacientes imobilizados ²⁶.

3. ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

Os ácidos graxos essenciais (AGE) são originários de óleos poli-insaturados e encontrados em células animais e vegetais ⁵. Formam uma classe de compostos que contêm uma longa cadeia hidro-carbonada e um grupamento carboxila terminal ²⁷. Os AGEs não são sintetizados pelo organismo humano, pois os mamíferos não possuem as enzimas necessárias para produzi-los. Portanto, devem obtê-los de fontes vegetais ou animais. Apresentam três funções principais: são componentes estruturais das membranas biológicas; atuam como precursores de mensageiros intracelulares e são oxidados, nesse caso, gerando adenosina trifosfato (ATP) ²⁷.

O estudo sobre os efeitos dos ácidos graxos essenciais na pele se iniciou em 1929 com um estudo que demonstrou que a deficiência dos AGEs causa alteração na pele e na cauda do animal de característica necrótica e escamação da pele ²⁸.

Segundo Declair, os AGEs têm importante papel no transporte, metabolismo das gorduras, na manutenção da função e integridades estrutural das membranas celulares. Os AGEs podem ser aplicados na pele íntegra e em ferimentos. Quando os AGEs são aplicados sobre a pele íntegra, são rapidamente absorvidos, melhoram a hidratação, formam uma película o que impede que a pele seja escoriada, pois permanece por maior tempo hidratado aumentando a elasticidade da pele ⁶. Porém, um estudo mostrou que os AGEs aceleravam a cicatrização, agindo de forma a aumentar a resposta imune, acelerando o processo inflamatório, e conseqüentemente estimulando o processo de cicatrização por meio da angiogênese e da epitelização, facilitando a entrada de fatores de crescimento na célula ⁷.

A formulação atual dos produtos à base de AGEs tem sua composição básica de triglicerídeos de cadeia média (ácido caprílico, ácido cáprico, ácido capróico e ácido láurico) e ácido linoléico (ácido graxo essencial), lectina de soja e vitaminas A e E ²⁹. Os triglicérides de cadeia média são úteis como fonte nutricional e estabilizante de produtos a serem administrados por via oral, tópica ou parenteral. Podem ter uso no tratamento e prevenção de dermatite amoniacal e de úlceras de decúbito, por formarem uma barreira protetora para a pele, impedindo a maceração, além de importante ação nos processos de inflamação celular, proporcionando alívio após a primeira aplicação, nutrição celular local, além de possuir grande capacidade de regenerar tecido ²⁷. Como um todo os AGEs agem de forma a aumentar a resposta imune, acelerando o processo inflamatório, e conseqüentemente estimulando o

processo de cicatrização por meio da angiogênese e da epitelização, facilitando a entrada de fatores de crescimento na célula ²⁹.

Segundo Dealey, um produto eficaz para o tratamento de feridas deve apresentar as seguintes características: facilidade de remoção, conforto, não exigência de trocas frequentes, boa relação custo/benefício, manutenção o leito da ferida com umidade ideal e as áreas periféricas secas e protegidas, facilidade de aplicação, e adaptabilidade (conformação às diversas partes do corpo) ⁶.

Os AGEs têm sido apresentado na forma líquida, semelhante a um óleo e possuem as seguintes vantagens: fácil aplicação, podem ser utilizados com qualquer outro produto e em diferentes fases de cicatrização, não contêm substâncias irritantes para a pele. Apesar dos AGEs serem bastante utilizados na clínica, o seu mecanismo de ação ainda não está totalmente compreendido.

Considerando os benefícios já comprovados do óleo de oliva no processo de reparo (inclusive com elucidação dos principais mecanismos) e seu baixo custo, e a boa experiência clínica com a utilização de AGEs na promoção do reparo cutâneo (embora sem elucidação dos mecanismos) porém com alto custo, a hipótese investigada neste trabalho é que em um estudo comparativo os óleo de oliva e os AGEs terão performances semelhantes. Caso se confirme a hipótese a utilização do óleo de oliva na promoção do reparo cutâneo em humanos deverá ser investigada pois o seu baixo custo tornará esta terapia mais acessível.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Comparar os efeitos de uma formulação comercial rica em ácidos graxos com o azeite de oliva na cicatrização de lesões agudas em camundongos.

4.2 Específicos

- a) Avaliar o fechamento da lesão aguda de animais tratados com óleo mineral, óleo de oliva e ácidos graxos;
- b) Quantificar o número de macrófagos e neutrófilos na área da lesão;
- c) Quantificar os miofibroblastos e os vasos na área da lesão;
- d) Quantificar a liberação de citocinas características do processo reparo tecidual na lesão;
- e) Quantificar a deposição de colágeno na lesão;
- f) Quantificar ROS, nitrito e peroxidação lipídica na lesão.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/044/2018) e estão de acordo com a legislação brasileira para experimentos em animais (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008). Camundongos Swiss machos, com idades entre 8 e 10 semanas, pesando entre 20 e 25g, foram divididos em três grupos com 10 a 15 camundongos por grupo. Os camundongos foram alojados em uma instalação com ciclos de exaustão de ar (15 minutos/hora), temperatura em torno de 22°C e ciclo de 12 horas de claro e escuro. Os animais tiveram livre acesso à ração e água filtrada.

5.2 Modelo de lesão

No dia da lesão, todos os animais foram anestesiados com halotano. O dorso dos animais foi tricotomizado e depilado com creme depilatório (Veet®, Reckitt Benckiser, São Paulo, Brasil) e duas lesões excisionais totais foram realizadas com auxílio de um punch de biópsia de 8 mm de diâmetro. As lesões foram posicionadas a dois centímetros de distância do osso occipital na linha mediana e a um centímetro de distância entre elas. A epiderme e a derme foram completamente removidas expondo o tecido muscular sub-jacente e 20 µl de cada composto foram aplicados em cada ferida. A seguir foi utilizado um curativo oclusivo, aplicando filme plástico sobre a lesão e a seguir fita adesiva³⁰.

5.3 Desenho Experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: grupo controle, grupo azeite e grupo ácidos graxos, tratados respectivamente com óleo mineral, azeite de oliva extra

virgem (Boriello®, Minas Gerais, Brasil) com 70,8% de ácido oleico, um importante ácido graxo, e 14,4% de ácido palmítico (Anexo B), e uma formulação comercial rica em ácidos graxos essenciais amplamente utilizado na clínica prática (Dersani®, Daudt, São Paulo, Brasil). De acordo com o fabricante, o Dersani é composto por triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, óleo de girassol clarificado, lecitina, palmitato de retinol, acetato de tocoferol e alfa-tocoferol. Um dia antes do ferimento, os animais foram barbeados com creme depilatório (Veet®, Reckitt Benckiser, São Paulo, Brasil). No dia seguinte, foi realizada anestesia inalatória com halotano, a pele foi limpa com etanol 70% e, na sequência, foram realizadas duas lesões de 8mm de diâmetro no dorso de cada animal com punção de biópsia a dois centímetros do osso occipital, e uma centímetro de distância entre eles. A epiderme e a derme foram completamente removidas, expondo o panículo carnosum, e 20 µl de cada composto foram aplicados em cada ferida. A seguir foi utilizado um curativo oclusivo, aplicando filme plástico sobre a lesão e a seguir fita adesiva³⁰. O curativo foi trocado 3 e 6 dias após o ferimento e as soluções reaplicadas nesses dias. As lesões foram medidas e fotografadas no dia do ferimento e 3 e 6 dias depois.

5.4 Análises macroscópicas

No dia da realização da lesão (dia 0), 3 e 6 dias após a área da lesão foi medida. Para isto, um papel celofane transparente foi colocado sobre o dorso do animal, e com uma caneta permanente preta o bordo da lesão foi desenhado³⁰. Em seguida, os desenhos foram digitalizados e medidos com o auxílio do software de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

Seis dias após a realização da lesão, as lesões foram analisadas também quanto à porcentagem de reepitelização. Isso foi feito a partir da diferença da medida da área total da lesão, e da área reepitelizada. O resultado foi expresso em porcentagem da área total reepitelizada³⁰.

5.5 Sacrifício e coleta das amostras

Seis dias após a realização da lesão, os animais foram sacrificados em uma câmara de CO₂. Aleatoriamente, uma das lesões com pele sã adjacente foi coletada e fixada em formaldeído tamponado (pH 7,2) para análises microscópicas. A outra lesão foi congelada em nitrogênio líquido e depois estocada a -70°C para análises bioquímicas.

As lesões fixadas em formaldeído foram clivadas, desidratadas em séries crescentes de álcool etílico, clarificadas em xileno, infiltradas e incluídas em parafina.

5.6 Análises histológicas

A partir do material incluso em parafina, cortes histológicos (5 µm) foram preparados. Para a análise geral do tecido, as lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), e digitalizadas no Panoramic View software (3DHistech Ltd.). Os cortes também foram corados com vermelho de picrossírius. Quando prontas, as lâminas foram observadas sob luz polarizada (Microscópio Zeiss Axiostar plus, câmera AxioCam Cc1, monitor Samsung) para avaliação da distribuição e organização das fibras do sistema colágeno.

Para avaliar a reepitelização, a área total da ferida e o comprimento da língua epitelial foram medidos nas lâminas digitalizadas. A porcentagem de reepitelização foi calculada multiplicando a língua epitelial por 100 e dividindo pelo comprimento total da ferida. Esta e todas as outras quantificações foram realizadas às cegas.

A análise da densidade celular e área do tecido de granulação foi realizada em lâminas coradas com HE e digitalizadas. Para a análise da densidade celular, uma ferramenta estereológica (contagem de pontos) foi usada conforme descrito anteriormente³¹. Um sistema de 42 pontos foi usado, e cinco campos aleatórios ao longo do tecido de granulação em cada animal foram avaliados. A densidade de volume (Vv [células]%) das células foi expressa como a porcentagem de pontos que atingem as células (Pp) em relação ao número total de pontos (Pt) da grade³².

Para avaliação da densidade do colágeno, as lâminas (pelo menos uma para cada animal) foram coradas com vermelho de picrossírius. As lâminas foram então observadas sob

luz polarizada e sete imagens aleatórias foram capturadas. Para quantificar a área ocupada pelas fibras de colágeno, foi utilizado o software ImageJ. Os resultados são expressos em mm².

5.7 Imunohistoquímica

Para a quantificação de neutrófilos e macrófagos, os cortes histológicos foram imunomarcados usando anticorpo antimieloperoxidase (MPO) produzido em rato (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 1:500) e anti-F4/80 de rato também produzido em rato (Serotec Inc., Raleigh, NC, 1:500) anticorpos, respectivamente. Os sítios antigênicos dos foram recuperados com aquecimento (70°C) dos cortes em tampão citrato (pH 6,0). Posteriormente, a peroxidase endógena foi inibida. Após a lavagem, o anticorpo primário foi detectado usando um anticorpo secundário biotilado anti-rato (DAKO, Carpinteria, CA, 1:800) seguido de incubação com estreptavidina (DAKO). A diaminobenzidina foi usada como cromógeno. As seções foram contrastadas com hematoxilina. Para quantificar o número de células imunomarcadas, cinco campos aleatórios por animal foram analisados. Os resultados são apresentados como células positivas por mm². Após a rotulagem, as lâminas foram digitalizadas e analisadas. Para quantificação de células F4/80 ou MPO-positivas, cinco campos aleatórios ao longo do tecido de granulação foram analisados em cada animal. Um sistema de 42 pontos foi usado, e cinco campos aleatórios ao longo do tecido de granulação em cada animal foram avaliados às cegas. A densidade de volume das células (V_v [células]%) foi expressa como a porcentagem de pontos que atingem as células (P_p) em relação ao número total de pontos (P_t) da grade ³².

Os miofibroblastos e vasos (com células de actina de músculo liso alfa positivas na parede) foram quantificados por método estereológico, utilizando seções imunolotadas com anticorpo monoclonal de camundongo em tecido de camundongo, conforme descrito anteriormente ⁵. Resumidamente, as seções foram incubadas com um sistema EnVision anti-camundongo (DAKO, 1:60) e, em seguida, a peroxidase endógena foi inibida. Após a lavagem, as seções foram incubadas com uma mistura de um anticorpo anti- α -SMA de camundongo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 1:600) mais o EnVision anti-camundongo (DAKO, 1:20) durante a noite. A diaminobenzidina foi usada como cromógeno, e os núcleos celulares foram corados com hematoxilina.

5.8 Imunoblotting

Fragmentos de lesão congelados foram macerados em tampão de lise, pH 7,5, (20 mM Tris-HCl, 138 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100, e coquetel inibidor de protease P2714 (Sigma-Aldrich). A quantidade de proteínas totais foi determinada usando o teste de proteína do ácido bicinonínico (BCA - Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN). Quantidades iguais de proteína (30 µg) foram separadas de acordo com o peso molecular por eletroforese em géis de poliacrilamida SDS e padrões de peso molecular (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA) foram incluídos. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com leite em pó desnatado a 5% (Nestlé, São Paulo, Brasil) dissolvido em PBS contendo Tween-20 a 0,05% (TPBS) para bloquear a ligação de anticorpos inespecíficos na membrana. Em seguida, as membranas foram incubadas durante a noite a 4 ° C com os seguintes anticorpos primários: colágeno anti-tipo I de coelho (pré-colágeno tipo I, 140-210 kDa; colágeno tipo I maduro, 70-90 kDa) (Millipore, Temecula, CA, 1: 500), fator de crescimento endotelial anti-vascular de camundongo-A (VEGF-A) (45 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, 1: 500) e fator de antígeno nuclear de célula antiproliferativa de camundongo (PCNA) (40 kDa) (DAKO, 1:200). Na sequência, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo, que foram detectados usando quimioluminescência intensificada (ECL) (Santa Cruz Biotechnology). Para detectar quimioluminescência, um sistema de captura ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) e software Image Lab 4.1 (Bio-Rad Laboratories) foram usados. Depois que as membranas foram removidas (Tris HCl, 2% SDS, β-mercaptoetanol), elas foram incubadas durante a noite com um anticorpo monoclonal de camundongo contra β-actina (43 kDa) (Sigma-Aldrich, 1: 1000) e depois com um anti- mouse Envision system (DAKO, 1:200) por 1 hora. A detecção de quimioluminescência foi realizada da mesma forma relatada anteriormente. As bandas foram analisadas por densitometria usando o software de imagem ImageJ, e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (a.u.).

5.9 Dosagem das espécies reativas de oxigênio (EROs)

A estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada por meio de um método colorimétrico adaptado de Choi et al. (2006). O método é baseado na reação do sal azul de nitrotetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich) com as espécies reativas de oxigênio. Sendo que 90% do sal reage exclusivamente com ânion superóxido. Algumas outras espécies reativas reagem menos seletivamente com esse sal, como: radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso (Cho et al., 2006). As amostras de lisado tecidual da pele dos camundongos foram ressuspensas em 100 μ l de tampão fosfato de potássio (KPE) e 100 μ l da solução de NBT a 0,1% foi adicionado a reação. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 600 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 500 μ l de tampão KPE e centrifugado a 600 g por 10 minutos. Após a repetição da lavagem com tampão KPE, o pellet foi ressuspensado em hidróxido de potássio a 2M. A reação colorimétrica foi lida a 630 nm em leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom, Cambourne, Reino Unido). Os resultados foram expressos em μ M de ROS por mg proteína total.

5.10 Nitrito

A dosagem de nitrito é utilizada para a avaliação da síntese de óxido nítrico (NO), uma vez que esse radical possui um tempo de meia vida curta. Assim, a formação desse radical é mensurada através da formação do nitrito, que é um produto da degradação estável. A detecção dos níveis de nitrito é feita através do ensaio colorimétrico de Griess (Green et al., 1982). Para a reação, 50 μ l de homogeneizado da pele foram misturados a 50 μ l de água destilada. A amostra diluída foi transferida para uma placa de 96 poços em duplicata e misturada a 50 μ l de solução de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 2,5%. Então, a mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 50 μ l de solução de naftiletilenodiamina a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% foram adicionados a mistura. Concentrações crescentes de nitrito (0; 0,1; 1; 10; 25; 50; 75; 100 pM) foram preparadas e utilizadas como curva padrão. A reação foi lida a 540 nm em leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom). Os resultados foram expressos em μ M de nitrito por mg proteína total.

5.11 Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método de TBARS foi utilizado para analisar os produtos de malondialdeído (MDA) durante a reação de ácido-aquecimento. Durante a peroxidação lipídica, há a formação de MDA e este subproduto da peroxidação reage ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA). As lesões congeladas foram maceradas como descrito anteriormente. As amostras (150 ul) foram misturadas com 10% de ácido tricloroacético (TCA; Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil); a mistura foi centrifugada a 5800 rpm durante 15 minutos. 150 ul do sobrenadante foram coletados em misturados com 150 ul do TBA (Merck, Darmstadt, Alemanha). A mistura foi aquecida a 95°C durante 10 minutos. A absorvância de luz foi medida a 532nm. Os dados foram normalizados com a curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TPM) (500 uM; #108383; Sigma- Aldrich). Os dados são expressos como uM de malondialdeído por mg de proteínas totais (uM/mg ptn).

5.12 Análises estatísticas

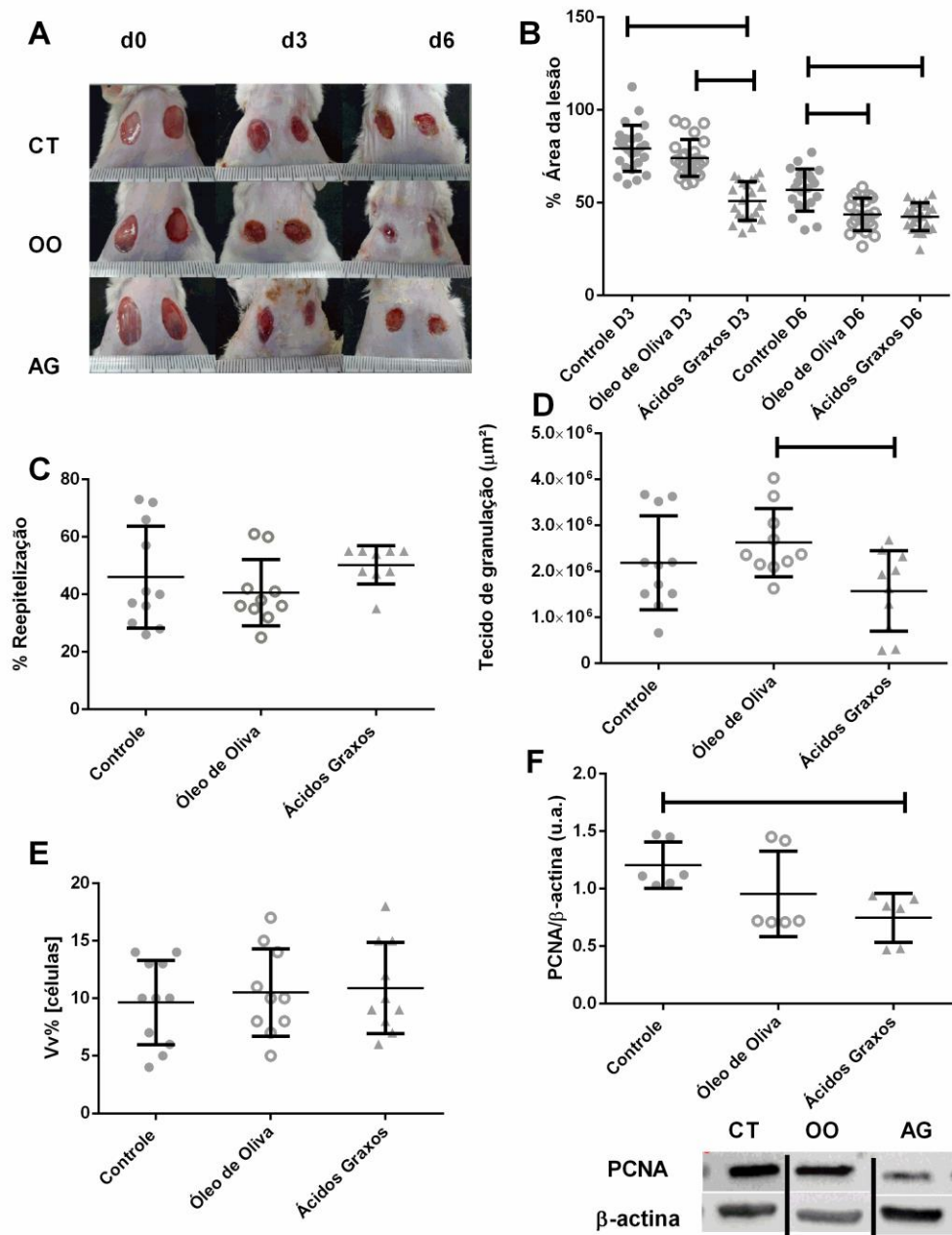
Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. O teste D-Agostino Pearson foi usado para analisar a normalidade dos dados. Em seguida, a análise foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ou ANOVA com pós-teste de Bonferroni para dados paramétricos. Em todos os casos, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism (GraphPad Prism versão 6.0, San Diego, CA).

6 RESULTADOS

6.1 Macroscopia, contração e reepitelização

O fechamento da ferida foi avaliado três e seis dias após o ferimento. Três dias após a lesão, o grupo ácidos graxos apresentou área de lesão menor do que o grupo óleo de oliva e o grupo controle (Figura 1A e 1B). No entanto, essa diferença não se manteve durante o tratamento, e seis dias após o ferimento, o grupo tratado com óleo de oliva apresentou feridas menores que o grupo controle, e o grupo tratado com ácidos graxos essenciais também apresentou lesão menor que o grupo controle (Figura 1A e 1B). Embora não tenha havido diferença na reepitelização entre os grupos (Figura 1C), a área do tecido de granulação foi aumentada no grupo óleo de oliva em comparação com o grupo ácidos graxos (Figura 1D).

Figura 1 - Efeito do tratamento tópico de lesões agudas em camundongos com ácidos graxos essenciais e óleo de oliva macroscopicamente, na contração e reepitelização



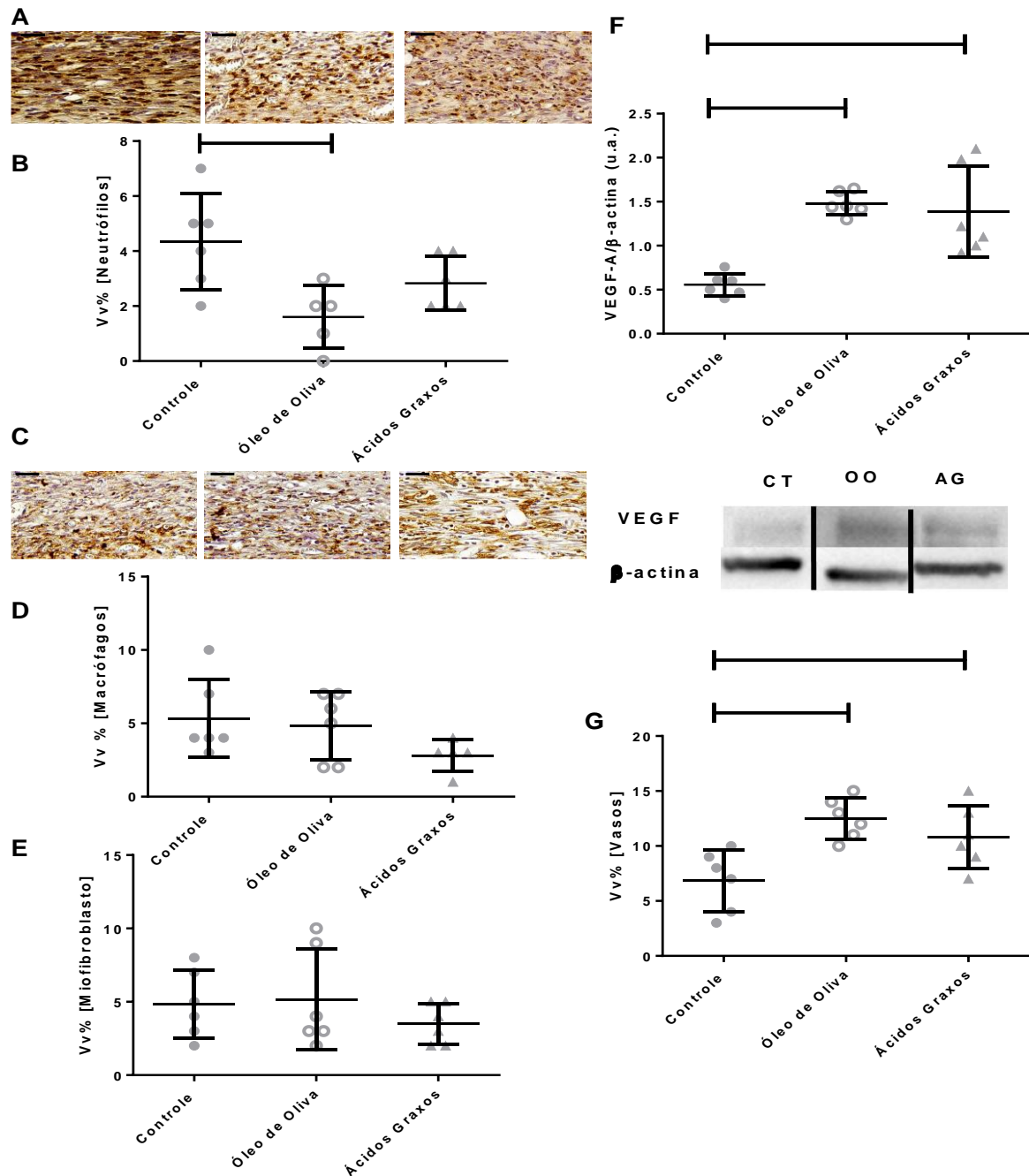
Legenda: (A) Fotografias representativas de lesões de grupos de controle (CT), óleo de oliva (OO) e ácidos graxos (AG) 0 (d0), 3 (d3) e 6 (d6) dias após o ferimento. (B) Fechamento da ferida nos grupos controle, óleo de oliva e ácidos graxos três e seis dias após o ferimento. Dados ($n = 20$ lesões por grupo) (C) Porcentagem de área reepitelizada nos grupos óleo de oliva, ácidos graxos e controle seis dias após a lesão. Dados ($n = 10$ lesões por grupo) (D) Área do tecido de granulação no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos seis dias após o ferimento. Dados ($n = 10$ lesões por grupo) (E) Densidade de volume (Vv) da celularidade do tecido de granulação seis dias após a lesão no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos. Dados ($n = 10$ lesões por grupo) (F) Proliferação celular (expressão de PCNA) no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos seis dias após o ferimento. Dados ($n = 6$ lesões por grupo) são apresentadas como a média \pm DP. A barra superior indica uma diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Bonferroni.

Fonte: A autora, 2020.

6.2 Inflamação, infiltração de neutrófilos e macrófagos

Não houve diferença na densidade celular entre os grupos quando a densidade do volume celular foi analisada (Figura 1E). No entanto, a proliferação celular (expressão da proteína PCNA) foi menor no grupo de ácido graxo do que no grupo controle (Figura 1F). As células inflamatórias foram analisadas em seções imunomarcadas. Foi observada uma redução no número de neutrófilos no grupo óleo de oliva em comparação com o grupo controle (Figura 2B), mas nenhuma diferença foi observada no número de macrófagos (Figura 2D).

Figura 2 - Efeito do tratamento tópico de lesões agudas em camundongos com ácidos graxos e óleo de oliva em macrófagos e neutrófilos seis dias após a lesão



Legenda: (A) Fotomicrografias representativas da detecção imunohistoquímica de mieloperoxidase (MPO) na área de lesão no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos. Bar = 50 μ m. Dados (n = 6 lesões por grupo) (B) Quantificação de neutrófilos MPO-positivos em tecido de granulação no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos. Dados (n = 6 lesões por grupo) (C) Fotomicrografias representativas da detecção imunohistoquímica de F4 / 80 no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos. Bar = 50 μ m. Dados (n = 6 lesões por grupo) (D) Quantificação de macrófagos f4 / 80-positivos na área do tecido de granulação no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos. Bar = 50 μ m. Dados (n = 6 lesões por grupo) (E) Quantificação de miofibroblastos α -SMA-positivos na área de lesão no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos. Dados (n = 6 lesões por grupo) (F) Densitometria expressa como

unidades arbitrárias (u.a.) para imunotransferência de VEGF no controle, grupos de azeite e ácido graxo seis dias após a lesão e imagens representativas das bandas de VEGF e β -actina no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos seis dias após a lesão. Dados (n = 6 lesões por grupo) (G) Quantificação de vasos positivos na área de lesão no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos seis dias após a lesão. Os dados (n = 6 lesões por grupo) são apresentados como a média \pm DP. A barra superior indica uma diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Bonferroni.

Fonte: A autora, 2020.

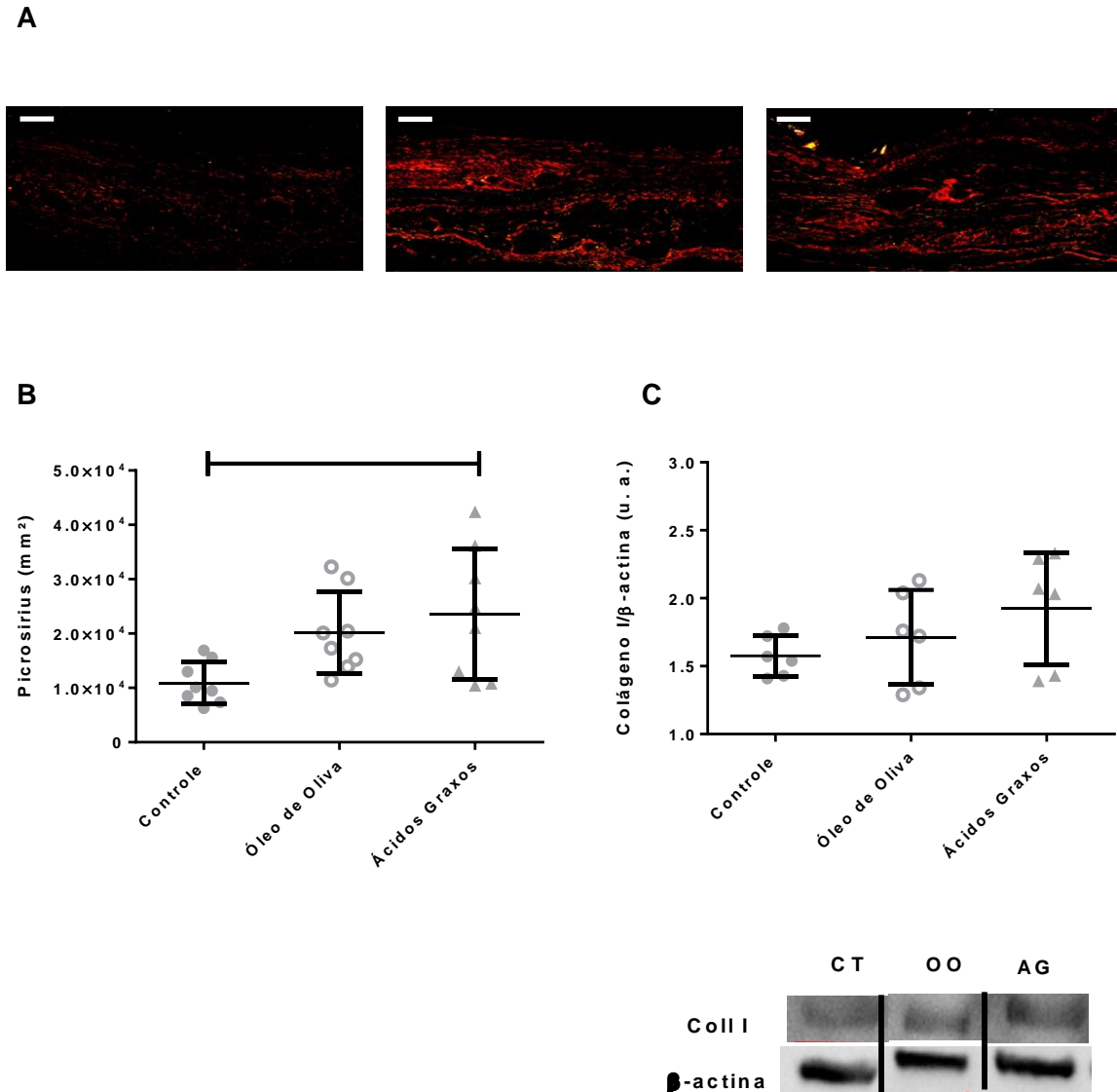
6.3 Deposição de matriz extracelular, diferenciação miofibroblástica e angiogênese

A distribuição e a quantidade de fibras de colágeno foram avaliadas em seções coradas com picrossírius. Os grupos controle apresentaram pequena quantidade de fibras colágenas finas, curtas e esverdeadas. No grupo óleo de oliva as fibras eram maiores, mais espessas e mais amarelas do que as do grupo controle. As fibras do grupo tratado com ácidos graxos apresentaram características semelhantes às do grupo do óleo de oliva. A quantidade de fibras colágenas foi visualmente maior nos grupos tratados do que no grupo controle (Figura 3A). A quantificação da superfície ocupada pelas fibras colágenas mostrou mais fibras colágenas no grupo ácido graxo do que no grupo controle (Figura 3B). A expressão do colágeno I maduro foi analisada por western blot e não mostrou diferenças entre os grupos (Figura 3C).

As principais células responsáveis pela deposição da matriz extracelular e contração da ferida são os miofibroblastos. A avaliação da densidade do volume celular em seções imunomarcadas com anticorpos anti- α SMA não mostrou diferença no número de miofibroblastos entre os grupos (Figura 2E).

Para análise da angiogênese, foram quantificados os vasos que apresentavam células α -SMA-positivas na parede. O grupo tratado com óleo de oliva e o grupo tratado com ácidos graxos essenciais apresentaram mais VEGF (Figura 2F) e vasos (Figura 2G) do que o grupo controle.

Figura 3 - Efeito do tratamento tópico de lesões agudas em camundongos com ácidos graxos e óleo de oliva no colágeno seis dias após a lesão



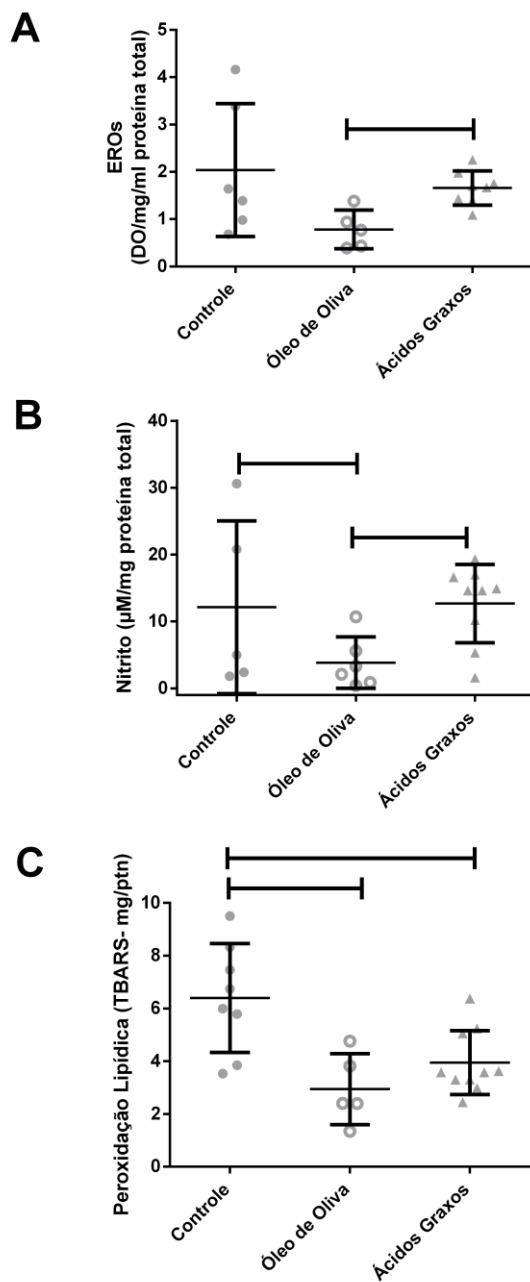
Legenda: (A) Fotomicrografias representativas de lâminas coradas de vermelho de picrosirius observadas sob luz polarizada do grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos. Bar = 50 μ m. Dados (n = 10 lesões por grupo) (B) Quantificação das fibras de colágeno coradas com picrosirius red. (C) Densitometria expressa como unidades arbitrárias (u.a.) para imunoblotting de colágeno tipo I no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos e imagens representativas de colágeno tipo I e bandas de β -actina no grupo controle, óleo de oliva e ácidos graxos seis dias após a lesão. Os dados (n = 6 lesões por grupo) são apresentados como a média \pm DP. A barra superior indica uma diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Bonferroni.

6.4 Estresse e dano oxidativo

Como o óleo de oliva e alguns componentes da formulação de ácidos graxos apresentam propriedades antioxidantes, alguns parâmetros relacionados ao dano oxidativo / nitrosativo foram analisados. As feridas tratadas com óleo de oliva apresentaram menor

quantidade de ROS do que as feridas controle e tratadas com ácido graxo (Figura 4A), e o mesmo resultado foi observado para o nitrito (produto estável da degradação do óxido nítrico) (Figura 4B). A peroxidação lipídica foi menor em ambos os grupos tratados do que no grupo controle (Figura 4C).

Figura 4 - Efeito do tratamento tópico de lesões agudas em camundongos com ácidos graxos e óleo de oliva no estresse oxidativo / nitrosativo e no dano seis dias após a lesão



Legenda: (A) Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), (B) nitrito (C) e peroxidação lipídica (TBARS) na lesão nos grupos controle, óleo de oliva e ácidos graxos. Os dados ($n = 6$ lesões por grupo) são apresentados como a média \pm DP. A barra superior indica uma diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Bonferroni.

7 DISCUSSÃO

O processo de reparo visa restaurar de uma forma coordenada a estrutura do tecido, e depende de vários eventos extremamente bem orquestrados ². O retardo na cicatrização de lesões cutâneas pode ser um grave problema de saúde devido à morbidade associada e aos altos custos envolvidos ⁴; portanto, a busca por terapias que otimizem esse processo com custo reduzido é extremamente importante. Várias terapias estão atualmente em uso para tratar feridas agudas e crônicas e este estudo compara um composto comercialmente disponível rico em ácidos graxos (Dersani®) com o óleo de oliva na cicatrização de lesões cutâneas agudas em camundongos. O óleo de oliva é um produto rico em ácido oléico (ácido graxo monoinsaturado) que apresenta propriedades antiinflamatórias e compostos fenólicos que atuam como antioxidantes ^{8,9}. Embora amplamente utilizados na clínica, os compostos ricos em AGEs são 12 vezes mais caros do que o óleo de oliva. A hipótese deste estudo foi que o óleo de oliva tem ação semelhante à do composto rico em AGEs, mas a um custo menor, e o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do óleo de oliva com os de compostos ricos em ácidos graxos durante o reparo tecidual de lesões agudas.

Já foi demonstrado que o óleo de oliva modula a resposta inflamatória observada nas lesões por pressão, promovendo a subsequente cicatrização de feridas ³¹. A primeira fase do processo de cicatrização de feridas é a fase inflamatória, quando as células inflamatórias liberam citocinas capazes de estimular a migração e proliferação de outros tipos de células que também participam do processo de cicatrização de feridas ¹. Os neutrófilos são as primeiras células a serem atraídas para os locais de lesão e são cruciais para limpar fragmentos celulares e microorganismos ¹¹. Os neutrófilos produzem radicais livres que ajudam na destruição bacteriana e são gradualmente substituídos por macrófagos ¹¹. Os macrófagos desempenham papel fundamental na conclusão do trabalho iniciado pelos neutrófilos principalmente pela secreção de citocinas e fatores de crescimento, contribuindo para a angiogênese, e síntese da matriz extracelular, essenciais para a transição para fase proliferativa do processo de cura ³³. Estudos anteriores mostraram que os ácidos graxos têm a capacidade de modular a expressão de citocinas inflamatórias, que podem induzir a migração de neutrófilos para o local da lesão ^{21,34}. No presente estudo, neutrófilos e macrófagos foram analisados seis dias após a realização da lesão, e uma redução no número de neutrófilos foi observada no grupo óleo de oliva em comparação ao grupo controle. Em relação aos macrófagos, não houve diferenças entre os grupos. Esses resultados indicam que o óleo de

oliva pode reduzir a resposta inflamatória, visto que no momento da observação, sexto dia após o ferimento, esperava-se que o número de neutrófilos no local da lesão estivesse aumentado.

A próxima fase da cicatrização é a formação do tecido de granulação, caracterizado por angiogênese, reepitelização, proliferação de fibroblastos e deposição de matriz extracelular¹⁷. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese e secreção de componentes da matriz extracelular, como as fibras de colágeno tipos I e III³⁵. O colágeno produzido inicialmente, principalmente o colágeno tipo III, é mais fino que o colágeno tipo I (presente em maiores quantidades na pele normal) e é orientado paralelamente à pele. O colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I durante a última fase da cicatrização (remodelamento), o que leva a um aumento da resistência à tração da cicatriz. Não há estudos conclusivos que relatem o papel dos ácidos graxos essenciais na deposição de colágeno. No caso do óleo de oliva, um estudo em lesões agudas em camundongos estressados, a administração oral do óleo de oliva melhorou a deposição de colágeno^{5,9}. Nosso estudo demonstrou que a deposição de fibras de colágeno no grupo tratado com ácidos graxos e no grupo tratado com óleo de oliva foi superior à do controle, demonstrando que o tratamento auxilia na formação de uma matriz extracelular e que os ácidos graxos e o óleo de oliva podem aumentar a quantidade de fibras de colágeno em uma lesão aguda, melhorando o processo de cicatrização.

A angiogênese ocorre no leito da ferida, com migração e estimulação mitogênica das células endoteliais³⁶. A angiogênese é uma etapa fundamental do processo de cicatrização, no qual novos vasos sanguíneos são formados e participam da formação do tecido de granulação, fornecendo nutrientes e oxigênio ao novo tecido³⁶. Os ácidos graxos atuam positivamente no processo de cicatrização por meio da angiogênese, aumentando o número de vasos na ferida²¹. Outros estudos mostraram que a administração oral do óleo de oliva aumentou a formação de vasos sanguíneos em lesão por pressão em camundongos, aumentando a expressão de VEGF⁹. Em lesões agudas de animais não estressados e estressados, o óleo de oliva aumentou a expressão da proteína VEGF e a densidade dos vasos sanguíneos²³. O presente estudo mostrou que tanto a densidade de vasos na imunohistoquímica quanto a expressão VEGF aumentaram, demonstrando que o óleo de oliva e o composto de ácidos graxos foram eficientes na promoção da angiogênese.

Outro fator que influencia no reparo tecidual são as ROS e o dano oxidativo. A produção excessiva de ROS e mediadores inflamatórios é observada em feridas com fechamento tardio, como feridas crônicas³⁷. As propriedades antioxidantes do óleo de oliva foram amplamente descritas^{8,10}. Em relação às ROS, nitrito e peroxidação lipídica, um estudo

mostrou que a administração o óleo de oliva acelerou a síntese de ROS e nitrito, e reduziu o dano oxidativo de lipídeos e proteínas³⁸. Pouco se sabe sobre o estresse oxidativo e os danos nas lesões tratadas com ácidos graxos. Neste trabalho, observamos que o óleo de oliva atuou como antioxidante, reduzindo a quantidade de ROS, nitrito e peroxidação lipídica, mas o composto rico em ácidos graxos não apresentou propriedades antioxidantes.

CONCLUSÃO

Analisando os resultados apresentados por este estudo, é possível concluir que a aplicação tópica do óleo de oliva ou de um composto rico em ácidos graxos foi capaz de melhorar a cicatrização de lesões agudas em camundongos, com resultados semelhantes. Considerando que o óleo de oliva é muito mais barato que o composto rico em ácidos graxos, é uma terapia promissora para a cicatrização de feridas. Porém, estudos adicionais precisam ser realizados (principalmente estudos clínicos com humanos) para confirmar os efeitos benéficos do óleo de oliva na cicatrização de lesões cutâneas e permitir o desenvolvimento de uma terapia eficiente e menos dispendiosa.

REFERÊNCIAS

- 1 Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007; **25**: 9–18.
- 2 Sun BK, Sibrashvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science (80-)* 2014; **346**: 941–945.
- 3 Chester D, Brown AC. The role of biophysical properties of provisional matrix proteins in wound repair. *Matrix Biol* 2017; **60–61**: 124–140.
- 4 Brem H, Maggi J, Nierman D, Rolnitzky L, Bell D, Rennert R *et al.* High cost of stage IV pressure ulcers. *Am J Surg* 2010; **200**: 473–477.
- 5 Cardoso CRB, Souza MA, Ferro EAV, Favoreto S, Pena JDO. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 2004; **12**: 235–243.
- 6 Lania BG, Morari J, de Almeida AR, da Silva MN, Vieira-Damiani G, de Almeida Lins K *et al.* Topical essential fatty acid oil on wounds: Local and systemic effects. *PLoS One* 2019; **14**: 1–15.
- 7 Menezes GD. Evidências na utilização dos ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. *Ciências Biológicas e Saúde* 2015; **2**: 55–64.
- 8 Servili M, Esposito S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F *et al.* Phenolic compounds in olive oil: Antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* 2009; **17**: 76–84.
- 9 Donato-Trancoso A, Monte-Alto-Costa A, Romana-Souza B. Olive oil-induced reduction of oxidative damage and inflammation promotes wound healing of pressure ulcers in mice. *J Dermatol Sci* 2016; **83**: 60–69.
- 10 Romana-Souza B, Saguie BO, Pereira de Almeida Nogueira N, Paes M, dos Santos Valença S, Atella GC *et al.* Oleic acid and hydroxytyrosol present in olive oil promote ROS and inflammatory response in normal cultures of murine dermal fibroblasts through the NF-κB and NRF2 pathways. *Food Res Int* 2020; **131**: 108984.
- 11 Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: An overview. *Plast Reconstr Surg* 2006; **117**: 1–32.
- 12 Chodorowska G, Roguś-Skorupska D. Cutaneous wound healing. *Ann Univ Mariae Curie-Skłodowska Sect D Med* 2004; **59**: 403–407.
- 13 Gantwerker EA, Hom DB. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2011; **19**: 441–453.

- 14 Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; **453**: 314–321.
- 15 Ferreira M, Souza MV De, Alessandro M, Loureiro RD, Paulo UDS, Paulo S. De Feridas : Uma Revisão Integrativa. *Rev Esc Enferm USP* 2012; **46**: 752–760.
- 16 Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res* 2008; **58**: 165–171.
- 17 Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005; **13**: 7–12.
- 18 Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 2002; **22**: 65–75.
- 19 Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RSJ. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; **49**: 218–236.
- 20 Przychodzen P, Wyszowska R, Gorzynik-Debicka M, Kostrzewa T, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. Anticancer potential of oleuropein, the polyphenol of olive oil, with 2-methoxyestradiol, separately or in combination, in human osteosarcoma cells. *Anticancer Res* 2019; **39**: 1243–1251.
- 21 Cardoso CR, Favoreto S, Oliveira LL, Vancim JO, Barban GB, Ferraz DB *et al.* Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair. *Immunobiology* 2011; **216**: 409–415.
- 22 Rodrigues HG, Vinolo MAR, Magdalon J, Vitzel K, Nachbar RT, Pessoa AFM *et al.* Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. *J Invest Dermatol* 2012; **132**: 208–215.
- 23 Rosa ADS, Bandeira LG, Monte-Alto-Costa A, Romana-Souza B. Supplementation with olive oil, but not fish oil, improves cutaneous wound healing in stressed mice. *Wound Repair Regen* 2014; **22**: 537–547.
- 24 Najmi M, Shariatpanahi ZV, Tolouei M, Amiri Z. Effect of oral olive oil on healing of 10-20% total body surface area burn wounds in hospitalized patients. *Burns* 2015; **41**: 493–496.
- 25 Panahi Y, Izadi M, Sayyadi N, Rezaee R, Jonaidi-Jafari N, Beiraghdar F *et al.* Comparative trial of Aloe vera/ olive oil combination cream versus phenytoin cream in the treatment of chronic wounds. *J Wound Care* 2015; **24**: 459–465.
- 26 Lupiáñez-Pérez I, Morilla-Herrera JC, Ginel-Mendoza L, Martín-Santos FJ, Navarro-Moya FJ, Sepúlveda-Guerra RP *et al.* Effectiveness of olive oil for the prevention of pressure ulcers caused in immobilized patients within the scope of primary health care:

- Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2013; **14**: 1–7.
- 27 Magalhães MSF, Fechine FV, De Macedo RN, Monteiro DLS, Oliveira CC, Brito GADC *et al.* Effect of a combination of medium chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithin and vitamins A and E on wound healing in rats. *Acta Cir Bras* 2008; **23**: 262–269.
- 28 George BY. A new deficiency exclusion. *J Biol Chem* 1929; **82**: 345–367.
- 29 Conde WL. Vitamina A e Retinóides. 1987; : 1–8.
- 30 Nascimento AP, Costa AMA. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br J Nutr* 2006; **96**: 1069–1077.
- 31 Assis De Brito TL, Monte-Alto-Costa A, Romana-Souza B. Propranolol impairs the closure of pressure ulcers in mice. *Life Sci* 2014; **100**: 138–146.
- 32 Baddeley AJ, Gundersen HJG, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc* 1986; **142**: 259–276.
- 33 Hantash BM, Zhao L, Knowles JA, Lorenz HP. The Department of Surgery, Division of Plastic Surgery, Stanford University School of Medicine, 257 Campus Drive, Stanford, CA 94305. *New York* 2008; : 51–61.
- 34 Young-Hee L, Bhattarai G, Jae-Cheol K, Tae-II K, Nan-Hee L, Jung-Chang L *et al.* Oxidative stress resistance through blocking Hsp60 translocation followed by SAPK/JNK inhibition in aged human diploid fibroblast. *Cell Biochem Funct* 2008; **26**: 320–328.
- 35 Serini G, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. 1998_Serini_1087.pdf. *J Cell Biol* 1998; **142**: 873–881.
- 36 Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; **386**: 671–674.
- 37 Karimi Z, Behnamoghdam M, Rafiei H, Abdi N, Zoladl M, Talebianpoor MS *et al.* Impact of olive oil and honey on healing of diabetic foot: A randomized controlled trial. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2019; **12**: 347–354.
- 38 Romana-Souza B, Monte-Alto-Costa A. Olive oil reduces chronic psychological stress-induced skin aging in mice through the NF- κ B and NRF2 pathways. *J Funct Foods* 2019; **54**: 310–319.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

ibrag Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Comparação do efeito de uma formulação contendo ácidos graxos essenciais e triglicerídeos e óleo de oliva no reparo cutâneo em camundongos**", registrada com o nº 044/2018, sob a responsabilidade de **Andrea Monte Alto Costa** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 31/07/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/07/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss
Nº de animais	60
Peso/Idade	25-30 g / 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 31 de Julho de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B- Análise do óleo de oliva



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
 SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
 AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
 INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
 CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº: **RE-CQ 03.1595/17** REF PROPOSTA CCQA Nº 1947/17-1
 INTERESSADO: **Andréa Monte Alto Costa**
 ENDEREÇO: **Avenida Marechal Rondon, 381/HLA-Rio de Janeiro/RJ**
 DATA DE RECEBIMENTO DA(S) AMOSTRA(S): **30/05/2017** DATA DE INÍCIO DA(S) ANÁLISE(S): **06/06/2017**
 DATA DE EMISSÃO: **07/06/2017**
 NATUREZA DA(S) ANÁLISE(S): **Físico-química**

1. DESCRIÇÃO DA(S) AMOSTRA(S)

RAm-CQ 3901/17 - Azeite de oliva extra virgem Borriello, lote: Ar1, fabricação: 2017, validade: 2018.

2. MÉTODO(S)

A codificação MA-CQ refere-se aos documentos internos dos laboratórios do ITAL, seguida das informações resumidas da referência do método.

Composição em ácidos graxos - MA-CQ.014 baseado em AOCS (2014), Official Method Ce 1a-13 e Ce 1h-05. AOAC (2010), Official Method 996.06. HARTMAN & LAGO. Lab. Practice. 22(8), 494-495, 1973. McCance & Widdowson's. The Composition of Foods. 2002. 537p.

3. RESULTADO(S)

Determinação		Resultado
Ácidos Graxos (%)		
Saturados		16,51
Monoinsaturados		73,08
Poli-insaturados		10,05
Ômega 3		0,95
Ômega 6		9,10
Trans-isômeros totais		ND < 0,01 ^a
NI		0,36
Composição em ácidos graxos (%)		
C 16:0	palmitico	14,43
N.I.		0,15
C 16:1 ômega 7	palmitoleico	2,10
C 17:0	margárico	0,08
C 17:1	cis-10-heptadecanoico	0,21
C 18:0	esteárico	1,51
C 18:1 ômega 9	oleico	70,77
C 18:2 ômega 6	linoleico	9,10
C 20:0	araquídico	0,36
C 18:3 ômega 3 α	alfa linolênico	0,95
C 22:0	behênico	0,13
N.I.		0,21

^aND = Não detectado.

NI = Não identificado.

OBSERVAÇÕES

- a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle.





GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

b) A integridade deste Relatório/Parecer é confirmada através do controle da validade da assinatura digital incorporada no arquivo Adobe PDF. Todas as cópias, impressas ou eletrônicas, devem ser verificadas por comparação com o arquivo Adobe PDF que exibe uma assinatura digital válida. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial.

Vera Sônia Nunes da Silva
Pesquisadora
Unidade Laboratorial de Referência
em Química de Alimentos

Ana Maria Rauen O. Miguel
Pesquisadora Científica
Unidade Laboratorial de Referência
em Química de Alimentos