

AValiação DOS NEUROTRANSMISSORES VIP E CGRP DO ÍLEO DE RATOS ARTRÍTICOS ADMINISTRADOS COM QUERCETINA.

Tuany Caroline Bernardi (PIC/UEM)¹; Bruna Thais Silva¹; Lucas Brunati Grevaschi¹; Mariana Lima Machado¹; Gleison Daion Piovezana Bossolani¹; Jaqueline Nelisis Zanoni¹; Juliana Vanessa Colombo Martins Perles¹
(Orientadora), e-mail: jjvcm77@gmail.com

¹Universidade Estadual de Maringá

Área: Ciências biológicas; Subárea: Morfologia.

Palavras chaves: Sistema Nervoso Entérico; Flavanóides; Artrite Reumatoide.

Resumo

A artrite reumatoide, por ser uma doença inflamatória sistêmica, gera um aumento de espécies reativas de oxigênio no organismo, gerando o estresse oxidativo. Os neurônios entéricos, principalmente as subpopulações imunorreativas ao CGRP e VIP, são sensíveis a esses radicais. A administração de quercetina, atuaria reduzindo os danos relacionados ao trato gastrointestinal. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a área de varicosidades imunorreativas para VIP e CGRP em ratos artríticos tratados ou não com quercetina. Foram utilizados 15 ratos machos da linhagem Holtzman (*Rattus norvegicus*) inicialmente com 53 dias de idade, distribuídos em 3 grupos: Controle (C); Artríticos (AIA) e Artríticos tratados com quercetina (AQ). A indução da artrite experimental foi por injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund (ACF) na região plantar da pata posterior esquerda de cada animal. Após 60 dias de protocolo experimental, os ratos foram eutanasiados e os segmentos intestinais coletados para a realização das técnicas imunohistoquímica para VIP e CGRP. Os nossos resultados mostraram um aumento na área das varicosidades VIP-érgicas e CGRP-érgicas de ambos os plexos no grupo AIA, possivelmente devido a um aumento na produção desses neuropeptídeos mediante o quadro inflamatório ou mesmo por neurodegeneração e dificuldade do transporte ao longo das fibras nervosas.

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é caracterizada como uma doença inflamatória crônica autoimune. Há o aumento do estresse oxidativo e produção de citocinas pró-inflamatórias, gerando desenvolvimento das respostas inflamatórias no organismo. O trato gastrointestinal é innervado por neurônios componentes do sistema nervoso entérico (SNE), distribuídos em dois plexos ganglionados principais: mientérico e submucoso, responsáveis pela motilidade, absorção, secreção, manutenção da mucosa e da função imunológica. Alterações

gastrointestinais são reportadas na AR, podendo afetar o funcionamento do sistema digestório causando disfagia, refluxo gastroesofágico, dor abdominal, diarreia, constipação e incontinência fecal (Furness, 2006). No SNE há expressão de diferentes tipos de neurotransmissores dentre eles o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) e o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP). O CGRP é um neuropeptídeo inibitório, com importante papel neuromodulador Possui ação biológica de inibição do ácido gástrico e vasodilatação (HOLZMANN, 2011). O VIP age relaxando a musculatura lisa do intestino. Sua secreção pode ser alterada por interleucinas inflamatórias, como as encontradas em organismos com AR (ABAD, 2011). Em virtude dos frequentes relatos de reações adversas com o uso dos AINEs no tratamento convencional da artrite, substâncias naturais podem ser incluídas como tratamento alternativo à doença. A quercetina um flavonóide com potencial anti-inflamatório e antioxidante presente na dieta humana. (NABAVI et al, 2015). Este estudo teve como objetivo avaliar a área de varicosidades imunorreativas para VIP e CGRP em ratos artríticos tratados ou não com quercetina.

Materiais e métodos

Foram utilizados ratos adultos machos, da linhagem Holtzman (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEAE) sob o parecer CEUA nº 4462180216. Aos 50 dias de idade, os animais foram transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia e terapêutica, onde permaneceram alojados em condições controladas de temperatura, ciclo claro/escuro e ingestão de água e ração *ad libitum*. Os ratos com 53 dias de idade foram disponibilizados para período experimental duração de 60 dias, distribuídos em três grupos com 5 animais cada, de acordo com os tratamentos submetidos.

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais (n=5).

C	Controle
AIA	Artríticos não tratados
AQ	Artríticos tratados com quercetina (50mg/kg, vo)

Os animais artríticos foram induzidos por injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund (ACF) 0,1 mL de suspensão a 5% de *Mycobacterium tuberculosis*, na região plantar da pata posterior esquerda de cada animal. Os animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento, recebendo assim uma injeção intradérmica com 0,1 mL do veículo, óleo mineral (Nujol®, Schering-Plough, São Paulo-Brasil). A quercetina foi administrada na dosagem de 50 mg/Kg ao grupo AQ, por gavagem diariamente. Para o cálculo individual da dose, os animais foram pesados e a dose calculada a cada dois dias. Aos 113 dias de idade, os animais foram anestesiados com tiopental (40 mg/kg) via intraperitoneal, após, os íleos foram coletados em uma celiotomia.

Os segmentos coletados foram processados para as técnicas imunohistoquímicas. Foram subdivididos em partes de aproximadamente 1cm², e microdissecadas, para obtenção de dois preparados totais de membrana da túnica muscular e da tela submucosa para cada animal. Os preparados totais foram lavados em PBS (0,1M, pH 7.4) + Triton X-100 0,5% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (2 x 10 min) e incubados na mesma solução acrescida de 2% albumina do soro bovino (BSA) 10% de soro normal de burro por 2 h em T.A. (solução de bloqueio). Em seguida, os tecidos foram incubados com os anticorpos primários (Polyclonal Rabbit anti - VIP); sc-20727, 1:300) em solução de PBS + Triton X-100 (0,5%) + BSA (2%) + soro normal de burro (10%) por 2 h em estufa a 37°C, e em seguida deixados a T.A. por 46 h sob lenta agitação. Após esta etapa, foram realizadas três lavagens (5 min) em PBS + Triton X-100 (0,5%) e os tecidos foram incubados (6 h em T.A.) em anticorpo secundário Alexa fluor 568 (Goat anti-rabbit); A-11036, 1:250) para VIP. Posteriormente, os preparados totais contendo VIP-IR foram lavados em PBS (0,1 M, pH 7.4) (3 x 5min), montados em lâminas e armazenados à 4 °C. Para a imunomarcagem das varicosidades imunorreativas CGRP, os preparados totais da túnica muscular e tela submucosa foram lavados em PBS (0,1 M, pH 7.4) + Triton X-100 0,5% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (2 x 10 min) e incubados na mesma solução acrescida de 2% BSA 10% de soro normal de burro por 2 h em T.A. (solução de bloqueio). Em seguida, os tecidos foram incubados com os anticorpos primários (Polyclonal Rabbit anti - Calcitonin gene-related peptide (CGRP); sc-28920, 1:200) em solução de PBS + Triton X-100 (0,5%) + BSA (2%) + soro normal de burro (10%) por 48 h em T.A. sob lenta agitação. Após esta etapa, foram realizadas três lavagens (5 min) em PBS + Triton X-100 (0,5%) e os tecidos foram incubados (6 h em T.A.) em anticorpo secundário Alexa fluor 488 (Donkey anti-rabbit; A-11035, 1:500). Posteriormente, os preparados totais foram lavados em PBS (0,1 M, pH 7.4) (3 x 5min), montados em lâminas e armazenados à 4 °C. A área de 400 varicosidades (µm²) foi mensurada através do software Image Pro Plus 4® para cada marcador e animal, perfazendo um total de 2000 mensurações por grupo. Os dados morfométricos foram submetidos ao delineamento em blocos (ANOVA Blocked) seguido de Teste de Fisher (Programa Statistica 7.1). Nível de significância foi de 5%.

Resultados e discussão

As varicosidades VIP-IR apresentaram um aumento de tamanho nos animais artríticos (AIA), no plexo mientérico e submucoso ($p = 0,0000$) em relação ao controle. O tratamento reduziu os tamanhos das varicosidades em 19% no grupo AQ em relação ao grupo AIA ($p < 0,00001$). Resultados similares foram encontrados no plexo submucoso, no grupo AQ houve redução dos tamanhos das varicosidades em 22% em relação à AIA. As varicosidades CGRP-IR do plexo mientérico dos animais artríticos tiveram diferenças quando

comparadas aos controles. O tratamento com quercetina (AQ) reduziu a área em 4% relacionada ao controle ($p < 0,01$). Em comparação aos animais artríticos (AIA) a área em AQ foi 15% menor. No plexo submucoso, houve diferenças nas áreas das varicosidades entre o grupo controle e os artríticos ($p < 0,05$). Quando comparado o grupo tratado com o grupo AIA, AQ apresentou uma área semelhante ($p > 0,05$).

Área das varicosidades VIP-érgicas e CGRP-érgicas aumentaram mediante a doença. Esta plasticidade pode indicar maior produção de neurotransmissores devido suas propriedades neuroprotetoras ou acúmulo devido neurodegeneração dificultando o transporte. (Tuncel et al., 2012; Vicentini et al., 2016). No grupo tratado com quercetina houve diminuição da área das varicosidades, denunciando menor atividade neuronal neste grupo.

Conclusões

O aumento observado nas varicosidades imunorreativas pode indicar maior produção dos neurotransmissores, evidenciando suas propriedades neuroprotetoras anti-inflamatórias e antioxidantes mediante a doença, mas também pode ser por acúmulo destes, devido aos processos neurodegenerativos causados nos neurônios dificultando seu o transporte ao longo das fibras nervosas. O tratamento exclusivo com quercetina não foi capaz de exercer efeito neuroprotetor significativo nos neurotransmissores avaliados.

Agradecimentos

Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- FURNESS, J. B. Structure of the enteric nervous. **The enteric nervous system**, Malden. Blackwell Publishing, 2006. p. 1 – 28.
- ABAD, C.; WASCHEK, J. A. Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. **Current Pharmaceutical Design**, Los Angeles, United States, v. 17, n. 10, p. 1025 – 1034, 2011.
- HOLZMANN B. Modulation of immune responses by the neuropeptide CGRP. **Amino acids**, Atlanta, United States, 45(1): 1–7, 2011.
- NABAVI S.F., RUSSO G.L., DAGLIA M., NABAVI S.M. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: You are what you eat! **Food Chem**, Tehran/Iran, 179: 305-310, 2015.
- VICENTINI G.E., FRACARO L., DE SOUZA S.R., MARTINS H.A., GUARNIER F.A., ZANONI J.N. Experimental Cancer Cachexia Changes Neuron Numbers and Peptide Levels in the Intestine: Partial Protective Effects after Dietary Supplementation with L-Glutamine. **Plos One**, Los Angeles, United States, 11(9): 1-23, 2016.

