

CONTAGEM DE CÉLULAS TÍMICAS EM RATOS INDUZIDOS À ARTRITE EXPERIMENTAL POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND.

Eloisa Fernandes Boschini, Mariana Machado Muglia, Jacqueline Nelisis Zandoni, jnzanoni@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Morfológicas/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas e Morfologia

Palavras-chave: artrite reumatoide, homeopatia, *Rhus toxicodendron*

Resumo:

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que acomete 1% da população e apesar dos avanços científicos a terapia farmacológica ainda é falha. Neste trabalho foi proposto um tratamento homeopático à base de *Rhus toxicodendron* em ratos induzidos à artrite experimental. Os animais foram distribuídos nos grupos, controle (C), artríticos não tratados (AIA), artríticos tratados com *Rhus toxicodendron* na diluição D9 (ARD9) e artríticos tratados com Ibuprofeno (AIIB). O timo foi submetido a quantificação celular para avaliação do efeito desse tratamento. Os grupos AIA e AIIB apresentaram redução na contagem celular em relação ao C ($p < 0,05$), já ARD9 demonstrou uma quantificação superior à do C ($p < 0,05$). O tratamento parece ter ação benéfica sobre a involução do timo com aparente atividade imunomodulatória. Estudos relacionados ao tipo celular afetado poderão elucidar o benefício da formulação do tratamento da AR.

Introdução

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença imunomediada caracterizada pela inflamação das articulações, iniciando pelas articulações pequenas de mãos, punhos e pés e, manifestações sistêmicas como, perda de peso, doenças cardiovasculares, alterações metabólicas, depressão. É influenciada por fatores genéticos, que envolve polimorfismo do loci HLA, principalmente os alelos DRB1*04 e ambientais relacionados por exemplo a idade, obesidade e tabagismo (MCINESS et al., 2011). A AR pode ser admitida como uma manifestação sítio-específica de uma doença autoimune sistêmica, cujos alvos principais são membrana sinovial, cartilagem e osso em um ambiente marcado por hipóxia e angiogênese. Os mecanismos que precedem a fase pré-articular e que levam à perda da auto tolerância por células T e B possivelmente relacionam-se à seleção tímica e tolerância periférica (KORB-PAP, 2012). Quanto à terapia farmacológica, a busca por drogas eficazes e de baixo custo é ainda necessária. Nesse contexto, a homeopatia vem como

alternativa ao tratamento da AR por sua ação imunoduladora e preço acessível. Esta, por sua vez, se baseia no princípio da cura pelo semelhante e no conceito de doses mínimas. Assim, testamos a *Rhus Toxicodendron* (RT) na diluição D9 (RTD9) em um modelo de artrite induzida (AI) em ratos quanto ao seu efeito sobre as células do timo.

Materiais e métodos

Vinte ratos machos Holtzman pesando entre 170-200 g foram distribuídos em quatro grupos, Controle (C), artrítico (AIA), artrítico tratado com RT na diluição D9 (ARD9) e artrítico tratado com ibuprofeno (AIIB). Os animais artríticos receberam uma injeção intradérmica do Adjuvante Completo de Freund (ACF), 0,1 mL de suspensão a 1% de *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma®) na região plantar da pata posterior esquerda, para indução da artrite experimental. Já os animais do grupo controle foram submetidos a uma injeção intradérmica contendo 0,1mL de óleo mineral (Nujol®, Schering-Plough, São Paulo-Brasil). O grupo ARD9 foi tratado com a formulação RTD9 por gavagem, 2 vezes ao dia sendo que a dose foi de 0,1mL por período de tratamento, totalizando 0,2ml ao dia. Os grupos C e AIA receberam 0,2mL do veículo da formulação, seguindo o mesmo padrão de administração do grupo tratado. Para o grupo AIIB a dose de ibuprofeno foi de 17,5mg/kg (Kaur ecol., 2011). Após 28 dias, os animais foram anestesiados com tiopental e realizada a timectomia. O timo foi fixado em Bouin por 24h e incluído em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 6 μ m no sentido longitudinal, em micrótomo Leica rm2255 rotary, esses foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H&E). Imagens foram capturadas em objetiva de 40x em um microscópio Motic acoplado a um sistema de captura (Motic BA400) e analisadas em software Image Pro Plus, num total de 180 imagens por grupo para as regiões cortical e medular do timo. Os resultados foram submetidos à análise estatística através dos programas Statistica 8.0, sendo expressos como média \pm erro padrão. A análise estatística foi feita pelo delineamento em bloco dos dados morfométricos e em seguida aplicado teste de Fisher. A quantificação foi submetida a análise de variância One-way (ANOVA). Em ambas análises foi adotado nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Neste trabalho, foi utilizado um modelo de artrite induzida por ACF em ratos para avaliação do efeito sobre o timo da formulação RTD9. Os ratos artríticos apresentaram edema na pata injetada 24horas após à indução e na pata contralateral por volta do 10º dia, confirmando o modelo experimental. A contagem das células do timo na região cortical foi menor em AIA e AIIB em relação a C ($p < 0,000$), enquanto o grupo ARD9 apresentou contagem de células superior à do próprio C ($p < 0,00044$) (Tabela 1). Na região medular o resultado foi semelhante, mas o aumento

em ARD9 em relação ao C ($p < 0,0371$) foi um pouco mais discreto (Tabela 1). Fotomicrografias do timo de todos os grupos são demonstradas na Figura 1. Com o envelhecimento, a atrofia do timo é natural, e precede o mau funcionamento do sistema imunológico. Condições como infecções e inflamação podem também levar à atrofia do timo (DIANI-MOORE et al., 2017). Gray e colaboradores (2006) observaram que o número de células estromais no timo varia com a atrofia, principalmente quanto à redução das células epiteliais tímicas, as quais subexpressam muitos genes relacionados ao desenvolvimento e seleção de células T maduras capazes de responder ao não próprio e manterem-se tolerantes ao próprio, através das seleções negativas e positivas. Segundo Goronzy e Weyand (2001) a imunorreconstituição é uma alternativa ao tratamento imunossupressor. Esse comportamento parece se confirmar nas células tímicas, cuja quantificação para o grupo ARD9 foi superior à encontrada em C, o que não foi verificado no grupo AIIB. Essa ação imunomoduladora foi mais notória na região cortical, visto que o aumento celular em ARD9 foi superior ao da região medular do timo.

Tabela 1 Quantificação celular no córtex e medula do timo de animais dos grupos controle (C), artrítico (AIA), artrítico tratado com *Rhus toxicodendron* na potência D9 (ARD9) e artrítico tratado com Ibufrofeno (AIIB).

	C	AIA	RTD9	AIIB
Cortex	1223 ± 10,02	1062 ± 8,60*	1266 ± 7,79* [†]	1003 ± 6,06*
Medula	784 ± 6,30	681 ± 4,69*	799 ± 5,31* [†]	636 ± 4,58* [†]

Resultados expressos como média ± erro padrão. * $p < 0,05$ comparado a C. [†] $p < 0,05$ quando comparado a AIA.

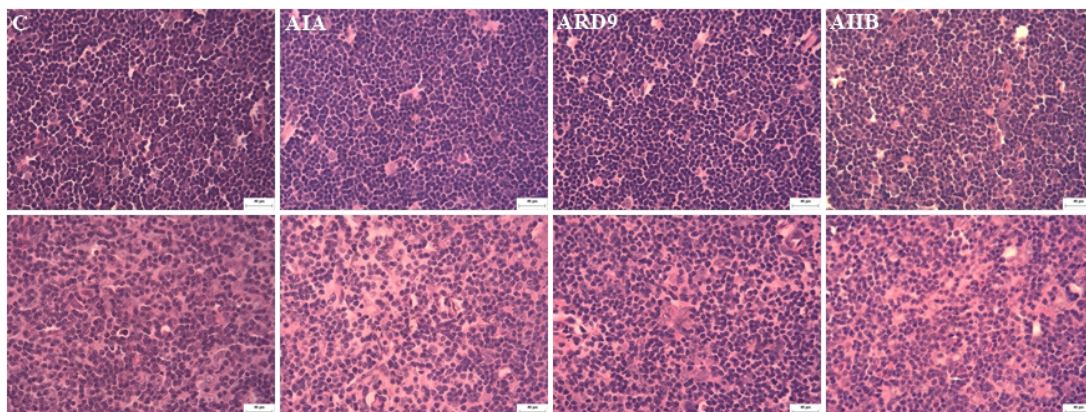


Figura 1 – Fotomicrografia das regiões cortical (linha superior) e medular (linha inferior) do timo dos animais pertencentes aos grupos controle (C), artrítico (AIA), artrítico tratado com *Rhus toxicodendron* na potência D9 (ARD9) e artrítico tratado com Ibuprofeno (AIIB). Cortes semi seriados, com 6µm de espessura, corados em Hematoxilina e Eosina.

Conclusões

O tratamento homeopático a base de RT na diluição D9 demonstrou uma ação benéfica sobre a involução do timo em relação à perda celular, a formulação apresentou ainda uma aparente atividade imunomodulatória uma vez que a quantificação das células tímicas foi superior à verificada para o grupo controle, demonstrando efeito do tratamento no modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund. Estudos relacionados ao tipo celular afetado poderão elucidar o benefício da formulação do tratamento da AR.

Referências

DIANI-MOORE, S.; SHOOT, J.; RIFKIND, A. B. et al. NAD⁺ loss, a new player in AhR biology: prevention of thymus atrophy and hepatic steatosis by NAD⁺ repletion. **Scientific Reports**, East Lansing, v. 7, p. 1-10, 2017.

GRAY, D. H.; SEACH, IN.; UENO, T. et al. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. **Blood**, Victoria, v. 108, n. 12, p. 3777-3785, 2006.

GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis. **Trends in Immunology**, Rochester, v. 22, p. 251-256, 2001.

KORB-PAP, A.; STRATIS, A.; MÜHLENBERG, K. et al. Early structural changes in cartilage and bone are required for the attachment and invasion of inflamed synovial tissue during destructive inflammatory arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Leiden, p. annrheumdis-2011-200386, 2012.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, Glasgow, v. 365, n. 23, p. 2205-2219, 2011.