

## AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA NA POPULAÇÃO DE MACRÓFAGOS (M2) CITOPROTETORES DO JEJUNO DE RATOS ARTRÍTICOS

Andrya Reder Hollatz (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lidia Rodrigues Cicero, Jacqueline Nelisis Zanoni (Orientador), e-mail: andryarhollatz@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

### Morfologia/Histologia.

**Palavras-chave:** artrite reumatoide, flavonoides, macrófagos.

### Resumo:

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito da quercetina microencapsulada (10 mg/kg) e do anti-inflamatório não esteroide ibuprofeno (17,5 mg/kg) sobre a população de macrófagos M2 intestinais no jejuno de ratos. Estes foram distribuídos em 5 grupos com seis ratos Holtzman cada: controle (C), artrítico sem tratamento (AIA), artrítico tratado com ibuprofeno (controle positivo) a 17,5mg/kg (AI), artrítico tratado com quercetina microencapsulada a 10 mg/kg (AQ) e controle tratado com quercetina microencapsulada a 10 mg/kg (CQ). Após 60 dias de período experimental estes foram eutanasiados e o jejuno foi coletado para posterior técnica imunohistoquímica para marcação de macrófagos CD206 e quantificação. Os grupos AIA, AI e AQ apresentaram redução significativa no ganho de massa corporal (GMC) de cerca de 77% (vs C;  $p < 0,05$ ). A densidade de macrófagos CD206 no grupo AIA aumentou em 42% em relação ao controle ( $p < 0,0001$ ). Os grupos AQ e AI apresentaram redução na população de macrófagos M2 de 23% ( $p < 0,0001$ ) e 35% ( $p < 0,0001$ ), respectivamente, em relação a AIA. Conclui-se que o tratamento com quercetina obteve efeito compensatório sobre a população de macrófagos M2 em ratos artríticos, reduzindo a densidade celular a valores próximos ao controle.

### Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica, autoimune, inflamatória e multissistêmica cuja principal característica é o acometimento simétrico progressivo de pequenas e grandes articulações, incluindo cartilagens, tendões e músculos. Em um estudo de Souza *et al.*, (2011) verificou-se alterações morfométricas da área dos neurônios entéricos provocada por AR, confirmando o caráter sistêmico da doença. Seu aspecto destrutivo deve-se não só à proliferação de células inflamatórias que liberam enzimas proteolíticas e citocinas, mas também ao estresse oxidativo com consequentes danos a proteínas, lipídios e DNA devido à ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres.

O intestino tem inervação autonômica própria, o Sistema Nervoso Entérico (SNE), e estudos recentes destacam a atuação dos macrófagos, conjunta e intimamente com este sistema na fisiopatologia de diversas doenças. Macrófagos M2 estão presentes no tecido do trato gastrointestinal em íntima associação com os plexos nervosos. Os macrófagos apresentam papel antioxidante, anti-inflamatório e citoprotetor sobre os neurônios entéricos e sobre as CIC (Funnes *et al.*, 2018). Atualmente, o tratamento medicamentoso da AR compreende fármacos glicocorticoides, AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais), analgésicos e DMARDs (drogas modificadoras de atividade da doença reumática). Nos últimos anos, novas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas, mas ainda há casos em que a resposta ao tratamento escolhido não é satisfatória, e o alto custo do tratamento e inúmeros efeitos adversos acabam levando ao abandono da terapêutica.

Dessa forma, tratamentos à base de substâncias naturais surgem como alternativa. A quercetina é um flavonoide antioxidante e anti-inflamatório que atua inibindo as vias relacionadas a produção de EROs e mediadores inflamatórios altamente agressivos (Li *et al.*, 2016). A sua administração em microcápsulas aumenta a biodisponibilidade e conseqüentemente a absorção (Kim *et al.*, 2017). Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito da quercetina microencapsulada (10 mg/kg), e do anti-inflamatório não esteiroidal ibuprofeno (17,5 mg/kg) sobre a população de macrófagos M2 intestinais no jejuno de 30 ratos Holtzman (*Rattus Norvegicus*) artríticos induzidos pelo adjuvante complemento de Freund.

## Materiais e métodos

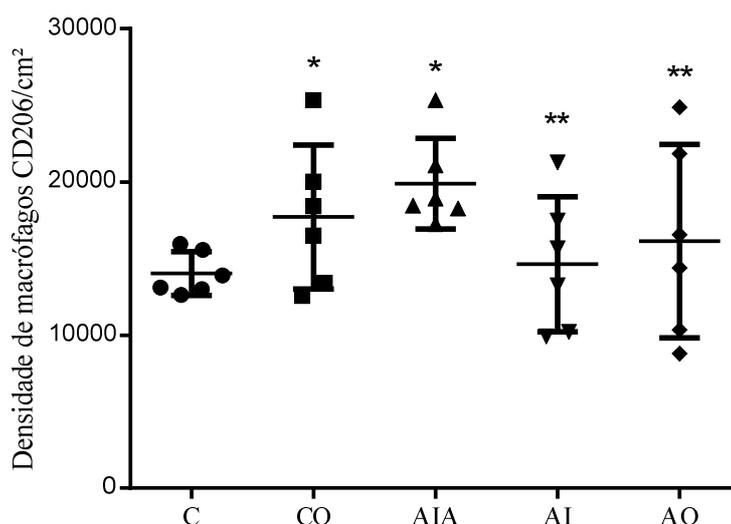
Em conformidade com a aprovação do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEAE) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob o parecer CEUA nº 4462180216, foram utilizados 30 ratos adultos Holtzman (*Rattus Norvegicus*) machos. Aos 56 dias de idade foram distribuídos aleatoriamente em cinco diferentes grupos, contendo 6 animais cada: controle (C), artrítico sem tratamento (AIA), artrítico tratado com ibuprofeno (controle positivo) a 17,5mg/kg (AI), artrítico tratado com quercetina microencapsulada a 10 mg/kg (AQ) e controle tratado com quercetina microencapsulada a 10 mg/kg (CQ). A artrite foi induzida através de injeção intradérmica, na pata traseira esquerda, de suspensão de adjuvante complemento de Freund (CFA) 0,1 mL de suspensão a 5% de *Mycobacterium tuberculosis* mortas e secas pelo calor, na região plantar da pata posterior esquerda de cada animal. Ao final de 60 dias de tratamento os animais foram eutanasiados e o jejuno foi coletado e microdissecado para obtenção de preparado total da túnica muscular para realização de imunohistoquímica para macrófagos CD206 imunorreativos.

Foi avaliada a densidade dos macrófagos CD206 em 30 campos microscópicos aleatórios. Um fator de correção foi empregado na densidade de macrófagos dos grupos AIA, AI, AQ e CQ para manter a mesma proporção da área intestinal de seus respectivos grupos controle. A densidade foi expressa em número de células por cm<sup>2</sup>. Os resultados foram submetidos a análise estatística através do delineamento em blocos e pós teste de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%.

## Resultados e Discussão

Os grupos AIA, AI e AQ apresentaram redução significativa no ganho de massa corporal (GMC) de cerca de 77% (vs C;  $p < 0,05$ ); portanto, nenhum dos tratamentos adotados (AI e AQ) foi eficaz em reverter essa redução. A redução do GMC pode ser explicada pelos diversos sintomas característicos da doença, os quais são de difícil reversão com tratamentos pontuais como o uso de anti-inflamatórios, sejam eles naturais ou laboratoriais. Estes sintomas incluem dores, rigidez matinal, fadiga, alterações do sono e cansaço, os quais podem afetar os hábitos alimentares do animal, provocando perda de apetite (Smolen, 2018). Ademais, a AR também se relaciona com a síndrome de caquexia, que consiste na perda de massa corporal involuntária pelo indivíduo.

Quanto à densidade de macrófagos imunorreativos ao CD206, houve um aumento de 42% no grupo AIA (vs C;  $p < 0,0001$ ) e no grupo CQ (vs C;  $p < 0,05$ ), Figura 1. Isso mostra que os macrófagos (residentes ou recrutados) aumentaram sua densidade para proteção do tecido intestinal dos efeitos deletérios ocasionados pela inflamação sistêmica da AR. Por outro lado, no grupo CQ o aumento da densidade dos macrófagos pode ter ocorrido devido administração de uma substância antioxidante e anti-inflamatória em animais saudáveis, provocando um efeito pró-oxidante com possível toxicidade. Os grupos tratados com ibuprofeno e quercetina apresentaram diminuição da densidade de macrófagos quando comparados ao grupo de animais artríticos sem tratamento: AQ reduziu 23% (AIA vs AQ;  $p < 0,0001$ ; Figura 1); AI, 35% (AI vs AIA;  $p < 0,0001$ ; Figura 1). Portanto, a quercetina atuou de forma a retornar à densidade de macrófagos quase ao estado normal (quando comparado ao grupo controle), em que o organismo não apresenta os efeitos agressivos causados pela doença. Esse efeito pode ser atribuído a atividade anti-inflamatória e antioxidante da quercetina, a qual pode ter atuado na redução da migração de células inflamatórias para tecido, a fim de estabelecer a homeostase do tecido em processo lesivo.



**Figura 1** – Análise quantitativa da densidade de macrófagos imunoreativos ao CD206 por unidade de área ( $\text{cm}^2$ ) em preparados totais da túnica muscular do jejuno nos grupos controle (C), artrítico sem tratamento (AIA), artrítico tratado com ibuprofeno (controle positivo) a 17,5mg/kg (AI), artrítico tratado com quercetina microencapsulada a 10 mg/kg (AQ) e controle tratado com quercetina microencapsulada a 10 mg/kg (CQ). \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo C e \*\*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo AIA ( $p < 0,05$ ).

## Conclusões

Conclui-se que o tratamento com quercetina obteve efeito compensatório sobre a população de macrófagos M2 em ratos artríticos, reduzindo a densidade celular a valores próximos ao controle. Assim, o uso da quercetina microencapsulada apresentou efeitos benéficos sobre a população de macrófagos M2 no plexo mientérico do jejuno de ratos artríticos. Sugere-se que a quercetina microencapsulada seja uma boa alternativa no tratamento de artrite reumatoide, atuando positivamente no bom funcionamento do trato gastrointestinal. Apesar desses resultados, mais estudos devem ser realizados para avaliação dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da quercetina sobre o trato gastrointestinal, além de possíveis efeitos colaterais.

## Agradecimentos

Agradeço à orientadora Jacqueline Nelisis Zanoni e à co-autora Lídia Rodrigues Cícero pelo auxílio, colaboração e esclarecimento. À Fundação Araucária pela concessão da bolsa e à Universidade Estadual de Maringá.

## Referências

FUNNES SC, Rios M, Escobar V, Kelergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**. v. 154, n. 2, p. 186-195, 2018.

LI Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, inflammation and immunity. **Nutrients**. v. 8, n. 3, p. 2-14, 2016.

KIM B, Choi JS, Yi EH, Lee JK, Won S, Ye K. Relative Antioxidant Activities of Quercetin and Its Structurally Related Substances and Their Effects on NF- $\kappa$ B/CRE/AP-1 Signaling in Murine Macrophages. **Molecules and Cells**. v. 35, n. 5, 410-420, 2013.

SMOLEN JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS. et al. Rheumatoid Arthritis. **Nature Reviews**. v. 4, p 1-23, 2018.

SOUZA IDS, Ribeiro JS, Bersani-Amado CA, Zanoni JN. Analysis of Myosin-V Immunoreactive Myenteric Neurons from Arthritic Rats. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 48, n. 3, p. 205-210, 2011.