

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS IMUNORREATIVAS À PROTEÍNA GFAP/S100 NO ÍLEO DE RATOS INDUZIDOS À ARTRITE EXPERIMENTAL ADMINISTRADOS COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA

Maysa Pacheco Alvarez da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), José Augusto de Oliveira Dias, Ciomar Aparecida Bersani Amado, Jacqueline Nelisis Zanoni, Juliana Vanessa Colombo Martins Perles (Orientadora), e-mail: maysa.alvarez@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR

Morfologia – Histologia

Palavras-chave: Artrite reumatoide, Sistema Nervoso Entérico, Ibuprofeno.

Resumo:

O objetivo do trabalho foi avaliar possíveis alterações em células glias entéricas (CGEs) imunorreativas às proteínas S100 (S100-IR) e GFAP (GFAP-IR) em ratos induzidos a artrite reumatóide, assim como o efeito do tratamento com quercetina microencapsulada. Foram utilizados 35 ratos divididos em 5 grupos (n=7): controle (C), controle tratado com quercetina (CQ, 10mg/kg, vo), artrítico (AIA), artrítico tratado com quercetina (AQ) e artrítico tratado com ibuprofeno (AI, 17,5mg/kg, vo). Os grupos artríticos sofreram indução por adjuvante completo de Freund. Os animais foram eutanasiados aos 113 dias de idade e foi coletado o segmento do íleo para técnicas imunohistoquímicas para evidênciação de CGEs S100-IR e S100/GFAP-IR. As análises morfométricas e quantitativas foram feitas utilizando o software *Image-Pro Plus*. As CGEs-S100-IR apresentaram aumento de 6,30% na comparação AIx C e de 18,98% entre CQx C. Entre AIx AIA houve redução de 4,50% e de 10,10% entre AQx AIA. Para a mesma marcação de CGEs a análise morfométrica apesar de não mostrar diferenças significativas entre AIx C, mostrou redução de 5,76% na área entre CQx C, 5,16% entre AQx AIA e 4,23% entre AIx AIA. Houve diminuição de 11,25% no número de CGEs-S100/GFAP-IR entre AIx AI e aumento de 13,53% na comparação CQx C, porém AIx C e AQx AIA não apresentaram diferenças significativas. Conclui-se que o tratamento com quercetina microencapsulada teve efeito protetor sobre as CGEs do plexo mioentéricos do íleo de ratos artríticos e estudos adicionais estão em desenvolvimento para complementar os achados.

Introdução

É comum observar aumento de problemas gastrointestinais em pacientes artríticos, que podem estar associadas a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), que atuam no processo inflamatório e estresse oxidativo (MCINNES *et. al*, 2011). A quercetina, um flavonoide natural presente em diversos alimentos, é considerada ótima na remoção de EROs (CHOI *et al.*, 2003), portanto apresenta atividades farmacológicas que a tornam viável no tratamento de sintomas da artrite reumatoide (AR) relacionadas ao estresse oxidativo (MCINNES *et. al*, 2011).

Diversos estudos têm evidenciado que o sistema nervoso entérico (SNE) é suscetível a desequilíbrios provocados pelo estresse oxidativo (CHANDRASEKHARAN *et. al*, 2010). Localizado na parede do trato gastrointestinal, o SNE é composto principalmente por neurônios e células gliais entéricas (CGEs). As CGEs atuam na nutrição, suporte, fisiologia e fisiopatologia de determinadas doenças do SNE. É possível observar seus corpos celulares por meio de marcadores para a proteína S100. As CGEs aderem-se aos gânglios entéricos por meio de filamentos compostos pela proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (GRUNDMANN, 2019).

O objetivo deste trabalho é avaliar as populações de CGEs S100/GFAP-IR quantitativamente e S100-IR morfométrica e quantitativamente no plexo mioentérico do íleo de ratos artríticos, além do efeito de tratamento utilizando quercetina microencapsulada e ibuprofeno como controle positivo.

Materiais e métodos

Foram utilizados 35 ratos adultos machos, da linhagem Holtzmann (*Rattus norvegicus*), distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=7): controle (C), controle tratado com quercetina microencapsulada (CQ, 10mg/kg, vo), artrítico (AIA), artrítico tratado com quercetina microencapsulada (AQ) e artrítico tratado com ibuprofeno (AI, 17,5mg/kg, vo). Certificado de aprovação CEUA/UEM protocolo: 4462180216.

Os animais dos grupos artríticos receberam injeções intradérmicas de adjuvante completo de Freund: 0,1 mL (suspensão a 5% de *Mycobacterium tuberculosis* mortas e secas pelo calor), na região plantar da pata posterior esquerda. Os animais do grupo controle passaram pelo mesmo processo, com a injeção intradérmica contendo 0,1 mL de óleo mineral (Nujol®, Schering-Plough, São Paulo-Brasil).

O período experimental iniciou-se aos 53 dias de idade dos animais e durou 60 dias. Ao término os animais foram eutanasiados, o íleo foi coletado, fixado em zamboni e dissecado para obtenção de preparados totais do plexo mioentérico e realização das técnicas imunohistoquímicas para evidenciar CGEs S100-IR e S100/GFAP-IR (dupla marcação).

As análises quantitativas e morfométricas foram realizadas por meio do *software Image-Pro Plus* em imagens obtidas em microscópio de fluorescência, com ampliação de 20x. Para a análise morfométrica, foram medidos 100 corpos celulares de CGEs-S100-IR por animal, resultados expressos em μm^2 . Para as análises quantitativas foram utilizadas 30 imagens aleatórias por animal, da região intermediária dos preparados totais e realizada a contagem das CGE-S100-IR e CGE-S100/GFAP-IR, com os resultados expressos em cm^2 .

Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0, onde se verificou distribuição simétrica. Para a análise dos dados foi empregada a análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) para todos os dados seguida de pós teste de Fisher no *software* Statistica 7.0. O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram reportados como média \pm erro padrão da média (epm).

Resultados e Discussão

Na tabela 1 é possível verificar um aumento significativo de 6,30% no número de CGEs S100-IR no grupo AIA comparando a C. Comparando os grupos AI e AQ a AIA houve redução de 4,50% 10,10%, respectivamente. A comparação entre CQ e C evidenciou um aumento significativo de 18,98% das CGEs S100-IR.

A análise morfológica de CGEs S100-IR não mostrou diferença significativa entre os grupos AIA e C, entretanto foi observado uma redução significativa de 5,16% e 4,23% quando comparado AQ e AI, respectivamente, a AIA. Houve redução significativa de 5,76% da área comparando os grupos C e CQ (Tabela 1)

A quantificação de CGEs S100/GFAP-IR, apresentadas na tabela 1, não mostrou diferença significativa entre AIA e C ou AQ, apesar da redução de 5,6% no número de células CGE-S100/GFAP-IR (AQxAIA). Todavia quando comparado os grupos AI com AIA, foi observado uma redução de 11,25% no número de CGEs S100/GFAP-IR, enquanto que o grupo CQ.apresentou um aumento significativo de 13,53% em relação a C.

TABELA 1. Densidade (cm^2) e morfometria (μm^2) de CGEs-S100-IR, densidade de de CGEs-S100/GFAP-IR. Grupos experimentais: controle (C), controle não artrítico tratado com quercetina microencapsulada (CQ, 10mg/Kg,vo), artrite induzida por adjuvante (AIA), artrítico tratado com ibuprofeno (AI, 17,5mg/kg, vo) e artrítico tratado com quercetina microencapsulada (AQ). (n=7 animais)

GRUPO EXPERIMENTAL	CGEs S100-IR		CGEs S100/GFAP-IR
	Densidade	Morfometria	Densidade
C	32332±3638**	55.586±0.335	10490±1201
CQ	38468±5630*	52.388±0.306*	11909±1092*
AIA	34368±4854*	55.929±0.355	10639±1936
AQ	30895±5688**	53.044±0.341**	10042±1221
AI	32823±4092**	53.563±0.323**	9442±953.2**

Os resultados foram submetidos ao teste de *Two-way blocked analysis of variance* (ANOVA Blocked) com pós-teste de *Fisher*. * p < 0,05 quando comparado ao C; ** p < 0,05 quando comparado ao AIA.

Na presença de inflamação, é comum observar aumento na quantidade de CGEs, assim como na expressão do GFAP (GRUNDMANN *et. al*, 2019). Com base nos resultados obtidos na marcação de CGEs S100-IR pôde-se constatar um aumento na quantidade de CGEs como mostrado na literatura, porém faz-se necessário mais estudos a respeito da expressão da proteína GFAP em CGEs S100/GFAP-IR, já que não foram detectadas alterações quantitativas e morfológicas evidentes entre os grupos controle (C) e doente (AIA).

O ibuprofeno mostrou efetivo em prevenir o aumento numérico e volume de CGEs nos animais doentes mostrando seu efeito anti-inflamatório, que era esperado como

controle positivo (KAUR, 2011) a Quercetina microencapsulada apresentou resultado semelhante exceto para CGEs S100/GFAP-IR, mostrando ter potencial futuro para o tratamento de sintomas gastrointestinais relacionados a AR, sem no entanto apresentar os efeitos colaterais do Ibuprofeno (CHOI *et al.*, 2003; KAUR *et al.*, 2011). A quercetina, em animais saudáveis, apresentou resultados semelhantes ou mais acentuados do que animais doentes, demonstrando possível efeito pró-oxidante (CHOI *et al.*, 2003).

Está em andamento a avaliação das mesmas técnicas no plexo submucosa dos mesmos segmentos intestinais e realização de outras técnicas que avaliem a expressão dos marcadores avaliados neste estudo, serão importantes para a confirmação dos resultados.

Conclusões

Conclui-se que o tratamento com quercetina microencapsulada na dose de 10mg/kg, preveniu o aumento numérico e de volume de CGEs imunorreativas a S100 no plexo mioentérico de ratos artríticos de forma semelhante ao controle ibuprofeno, porém os resultados obtidos para a marcação da proteína GFAP não foram tão evidentes. Estudos adicionais estão em desenvolvimento para complementar os achados.

Agradecimentos

Ao CNPq e Fundação Araucária por terem financiado esta pesquisa. À Profª Drª Juliana Vanessa Colombo Martins Perles pela orientação. À equipe do Laboratório de Plasticidade Neural Entérica pelo auxílio ao longo da pesquisa.

Referências

CHANDRASEKHARAN, B. et al. Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 2, p. 131-e26, 2010.

CHOI, E. L.; CHEE, K.; LEE, B. H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. **European Journal Of Pharmacology**, v. 482, n. 1-3, p. 281-285, 2003.

GRUNDMANN, D. et al. Enteric Glia: S100, GFAP, and Beyond. **The Anatomical Record**, v. 302, n. 8, p. 1333-1344, 2019.

KAUR, S; BIJJEM, K. R. V.; SHARMA, P. L. Anti-inflammatory and antihyperalgesic effects of the combination of ibuprofen and hemin in adjuvant-induced arthritis in the Wistar rat. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 5, p.265-272, 2011.

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