CANABIDIOL NO TRATAMENTO DE RATOS HOLTZMAN INDUZIDOS À ARTRITE EXPERIMENTAL: AVALIAÇÃO DE CÉLULAS CD20, CD45 E CD68 IMUNORREATIVAS NA MUCOSA DO ÍLEO.

Eduarda Barbieri Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Giovana Emanuele Derio de Lemos(Coorientadora), Jacqueline Nelisis Zanoni (Orientadora). E-mail: jnzanoni@uem.br

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

Ciências Biológicas, Morfologia/ Histologia

Palavras-chave: Anti-inflamatório; Imunohistoquimica; Intestino.

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da administração de canabidiol (CBD; 50 mg/kg) sobre a resposta inflamatória intestinal, por meio da análise das populações de células CD20, CD45 e CD68 imunorreativas (IR) na mucosa ileal de ratos com artrite experimental. Foram utilizados 30 ratos machos adultos da linhagem Holtzman (*Rattus norvegicus*), distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=6): controle (C), controle tratado com CBD (CC), artrite (A), artrite tratada com CBD (AC) e artrite tratada com ibuprofeno (AI). Após 60 dias, os animais foram eutanasiados e amostras do íleo foram coletadas para análise imuno-histoquímica. As células imunorreativas foram quantificadas em 30 vilos intestinais por amostra. Os dados foram analisados nos programas Statistica 8.0 e GraphPad Prism 8.0, utilizando delineamento em blocos e pós-teste de Fisher, com nível de significância de 5%. A artrite aumentou significativamente a densidade de células CD20-IR, CD45-IR e CD68-IR na mucosa ileal em relação ao controle ($p<0,05$). O CBD reduziu significativamente as populações CD20-IR e CD68-IR nos animais artríticos ($p<0,05$), sem alterar CD45-IR. O ibuprofeno reduziu CD20-IR, mas aumentou CD45-IR e CD68-IR em relação ao grupo artrítico ($p<0,05$). Em animais saudáveis, o CBD aumentou CD20-IR e CD68-IR ($p<0,05$), sem alterar CD45-IR. Conclui-se que o CBD exerce efeito imunomodulador na mucosa ileal de animais artríticos, reduzindo populações celulares associadas à resposta inflamatória. Entretanto, seus efeitos em condições fisiológicas indicam a necessidade de estudos adicionais sobre as consequências da administração prolongada do CBD para a homeostase imunológica intestinal.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica e sistêmica, que pode causar dor persistente, danos simétricos nas articulações e danos extra articulares, decorrente da perda da autotolerância imunológica, caracterizada pela ação de linfócitos autorreativos, citocinas pró-inflamatórias e produção de anticorpos

contra proteínas próprias alteradas, especialmente proteínas citrulinadas, promovendo inflamação e destruição articular progressiva. Entre suas manifestações extra articulares, destacam-se alterações no trato gastrointestinal (TGI), cuja resposta imunológica depende do equilíbrio entre células Th17, associadas à inflamação, e células T reguladoras (Tregs), responsáveis pela modulação da resposta imune (NETO et al., 2022). Alterações na microbiota intestinal e no eixo IL-23/IL-17 podem contribuir para a manutenção da inflamação sistêmica e articular. Nesse contexto, marcadores celulares como CD20, CD45 e CD68 permitem identificar, respectivamente, células B, leucócitos totais e macrófagos, contribuindo para a avaliação das alterações inflamatórias intestinais associadas à AR. Como alternativa terapêutica, o canabidiol (CBD), composto derivado da *Cannabis sativa*, vem sendo investigado por seus potenciais efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores, mediados entre outros mecanismos, pela interação com o sistema endocanabinoide e pelos receptores CB1 e CB2. Assim, a investigação dos efeitos da AR sobre o intestino e da possível ação do CBD pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na inflamação sistêmica e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas complementares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste estudo seguiram os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM) sob o protocolo nº 2446180723. Foram utilizados 30 ratos machos adultos da linhagem Holtzman (*Rattus norvegicus*), variedade albinus, que tiveram a artrite induzida pela inoculação de 0,1 mL do Adjuvante Completo de Freund a 5%, contendo *Mycobacterium tuberculosis*, na pata traseira esquerda. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=6 por grupo): controle (C), controle tratado com CBD (CC), artrite induzida tratado com CBD (AC) e artrite induzida tratado com ibuprofeno (AI).

Ao final de 60 dias de período experimental, os ratos foram eutanasiados, resultando na coleta de aproximadamente 2 cm do íleo de cada animal para a realização da técnica imunohistoquímica para marcação das células reativas a CD20, CD45 e CD68 na mucosa do íleo.A quantificação para cada população foi realizada em 30 vilos por rato.

Foi utilizado o software Image-Pro® Plus versão 4.5. Os resultados foram submetidos ao delineamento em blocos e pós-teste de Fisher com nível de significância de 5% e expressos como a média de células/vilosidades (Bossolani et al, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na mucosa ileal, a densidade de células CD20-IR foi significativamente maior nos grupos CC e A em comparação ao grupo C ($p < 0,05$), enquanto os grupos AI e AC apresentaram redução significativa em relação ao grupo A ($p < 0,05$). Para as células CD68-IR, observou-se aumento significativo nos grupos CC e A em relação ao grupo C ($p < 0,05$). O grupo AI apresentou aumento significativo de células CD68-

IR em comparação ao grupo A, enquanto o grupo AC apresentou redução significativa em relação ao mesmo grupo ($p < 0,05$). Em relação às células CD45-IR, verificou-se aumento significativo no grupo A em comparação ao grupo C e no grupo AI em relação ao grupo A ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos AC e A ou entre CC e C para as células CD45-IR. Resultados da densidade das células e fotomicrografias estão demonstrados na Figura 1.

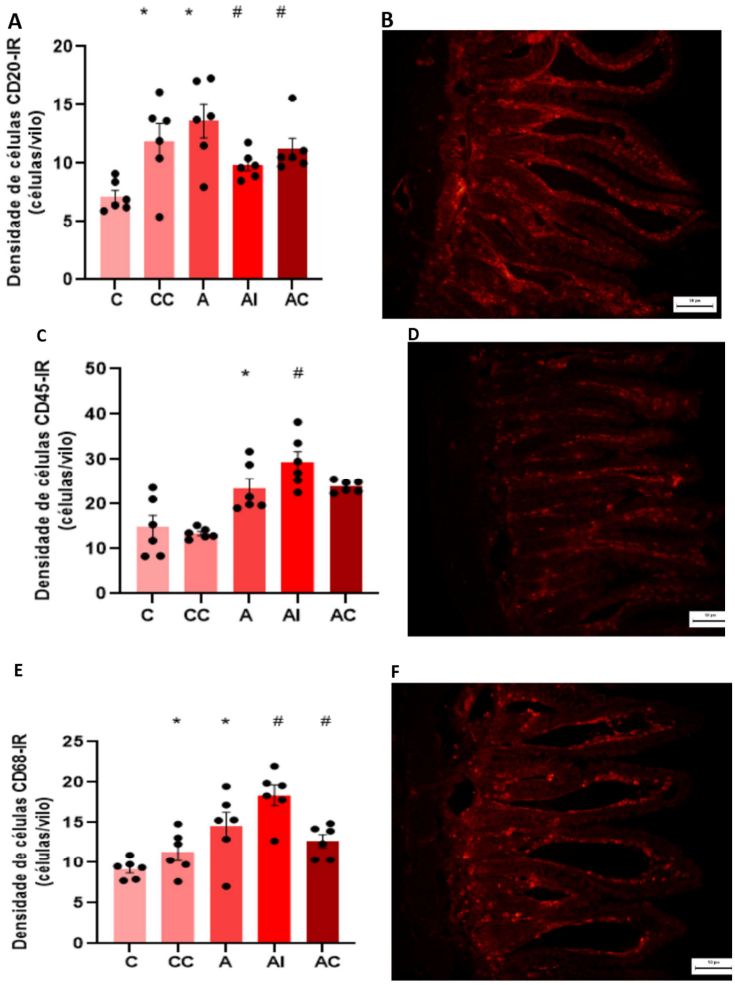


Figura 1. Quantificação (A, C e E) e fotomicrografias representativas (B, D e F) de células CD20, CD45 e CD68 imunorreativas na mucosa do íleo. Grupos: controle (C), controle tratado com CBD (CC), artrite induzida tratado com CBD (AC), artrite induzida tratado com ibuprofeno (AI). Os valores são expressos como média ± EP. *p<0,05 quando comparado a C; # p<0,05 quando comparado a A. n= 6 ratos por grupo. Barra de calibração: 50 µm.

Em relação ao grupo A, verificou-se aumento significativo na densidade de células CD20-IR, CD45-IR e CD68-IR quando comparado ao grupo controle. Esse achado reforça que a artrite induzida desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica que se estende ao intestino, favorecendo o recrutamento e a ativação de linfócitos e

macrófagos na mucosa intestinal. Evidências recentes demonstram que a inflamação crônica decorrente da artrite reumatoide compromete a homeostase imunológica intestinal e intensifica a infiltração de células inflamatórias (Park et al., 2023).

No grupo AC, observou-se uma redução significativa na densidade de células CD20-IR e CD68-IR em comparação ao grupo artrítico (A), evidenciando o potencial efeito anti-inflamatório do CBD. Esse efeito tem sido atribuído à ativação de receptores do sistema endocanabinoide, capaz de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias e atenuar a resposta imune inflamatória (Marinho & Neto, 2023). Em contraste, a população de células CD45-IR não apresentou diferença significativa entre os grupos AC e A, sugerindo que o CBD exerceu um efeito seletivo sobre determinadas populações de células inflamatórias da mucosa ileal.

O grupo AI apresentou redução da população de células CD20-IR em comparação ao grupo A, corroborando o efeito anti-inflamatório do ibuprofeno sobre a resposta imune adaptativa. Entretanto, diferentemente do esperado, observou-se aumento na densidade de células CD45-IR e CD68-IR. Esse resultado pode estar relacionado aos efeitos da administração prolongada de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), cuja inibição persistente das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) reduz a síntese de prostaglandinas gastroprotetoras, favorecendo alterações na barreira intestinal, inflamação da mucosa e recrutamento de células imunocompetentes (Aquino et al., 2017).

Por fim, o grupo CC apresentou aumento significativo das populações CD20-IR e CD68-IR em relação aos animais controle. Embora o CBD seja reconhecido por suas propriedades imunomoduladoras, sua administração prolongada em animais saudáveis pode alterar o equilíbrio fisiológico do sistema imune intestinal, promovendo modificações na composição celular da mucosa e sugerindo uma possível desregulação da homeostase imunológica (Ahmed, 2016). Em contrapartida, a densidade de células CD45-IR permaneceu semelhante à do grupo controle, indicando que esse efeito não se estendeu à população total de leucócitos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CBD demonstrou efeito anti-inflamatório no contexto da artrite experimental, caracterizado pela redução de células CD20-IR e CD68-IR na mucosa ileal, sugerindo modulação da resposta imunológica intestinal associada à doença. Entretanto, em condições saudáveis, o CBD, assim como o ibuprofeno, promoveu um aumento de linfócitos B e macrófagos, após a administração prolongada dos fármacos. Estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessas alterações e determinar suas possíveis repercussões sobre a homeostase e a função da mucosa intestinal.

REFERÊNCIAS

AHMED, W.; KATZ, S. Therapeutic use of cannabis in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 11, p. 668–679, nov. 2016.

AQUINO, A. et al. O uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e seus efeitos gastrointestinais. Campina Grande, Faculdade de Medicina de Campina Grande: II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde. ANAIS, p.1-8, 2017.

MARINHO, A. M. da N.; NETO, R. W. G. da S. Efeitos anti-inflamatórios dos canabinoides. **Brazilian Journal of Pain**, São Paulo, v. 6, p. S31-S37, 2023.

NETO, O. C. B. *et al.* Alterações intestinais em pessoas com artrite reumatoide. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, 2022.

PARK, Jung no. et al. Placas de Peyer intestinais: estrutura, função e modelagem in vitro.**Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 20, n. 3, p. 341-353, jun. 2023.

ZANONI, J. N.; BOSSOLANI, G. D. P. Does rheumatoid arthritis affect the enteric nervous system? **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 56, p. 113-117, 2019.