

TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA REDUZ A INFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE CRÔNICA

Lucimara Rodrigues Carobeli (PIBIC/CNPq), Débora dos Anjos Weber Luz, Ana Paula de Santi Rampazzo, Beatriz Petroncine Martins Zani, Odinei Hess Gonçalves, Ciomar Aparecida Bersani Amado, Maria Raquel Marçal Natali (Orientador)
e-mail: lucimaracarobeli@gmail.com

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

Ciências Biológicas - Morfologia - Histologia

Palavras-chave: doença inflamatória intestinal, TNBS, mieloperoxidase

Resumo:

Doenças Inflamatórias Intestinais causam prejuízos tanto funcionais como estruturais e terapias com anti-inflamatórios naturais devem ser investigadas. O objetivo deste estudo foi avaliar o tratamento com nanopartículas de curcumina sobre o colo distal de ratos induzidos a colite ulcerativa crônica. Ratos Wistar machos dos grupos controles receberam enema com solução salina e os colíticos com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), ambos foram subdivididos em tratamento realizado por vinte e oito dias com água ou nanopartícula de curcumina (CurNano). Verificou-se que parâmetros inflamatórios macroscópicos e microscópicos estavam aumentados apenas no colo distal dos animais colíticos tratados com água ($p < 0,05$). Este mesmo grupo também apresentou aumento na atividade enzimática da mieloperoxidase tecidual ($p < 0,05$), enquanto no tratamento com CurNano houve redução a níveis semelhantes aos controles ($p > 0,05$). Todas as túnicas da parede do colo distal apresentaram espessura aumentada quando os animais foram induzidos com TNBS e tratados com água ($p < 0,05$), entretanto, naqueles que receberam CurNano este parâmetro foi estatisticamente igual aos animais não colíticos ($p > 0,05$), exceto para a túnica muscular. Conclui-se que o tratamento com nanopartículas de curcumina por 28 dias, em ratos com colite experimental, possibilitou a remissão dos parâmetros inflamatórios avaliados, indicando seu potencial efeito anti-inflamatório.

Introdução

Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) apresentam incidência crescente e afetam morfofuncionalmente o trato digestório, mais especificamente o intestino grosso. A Doença de Crohn e a colite ulcerativa caracterizam-se pela alternância entre remissão e ativação da inflamação, evoluindo à cronicidade, com manifestações de dor abdominal, diarreia, sangramento retal e perda de peso.

As terapias com corticosteroides e anti-inflamatórios não-esteroidais têm eficácia limitada e causam efeitos colaterais, principalmente se aplicadas de forma crônica, por isso a ação de produtos naturais deve ser investigada. A *Curcuma longa* tem potente atividade anti-inflamatória, porém é pouco absorvida. O encapsulamento em

nanopartículas aumenta a biodisponibilidade de substâncias, além de possibilitar o uso de baixas doses (Rocha et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito crônico do tratamento com curcumina encapsulada em nanopartículas em modelo experimental de colite ulcerativa em ratos, induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS).

Materiais e métodos

Após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 22342171116), utilizou-se 30 ratos machos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, com 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Os animais foram distribuídos em 5 grupos (n=6): C: Controle; SA: enema salina, gavagem água; SCN: enema salina, gavagem CurNano; TA: enema TNBS, gavagem água e TCN: enema TNBS, gavagem CurNano. A colite foi induzida pela aplicação retal de solução alcoólica de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 15 mg) de acordo com o modelo descrito por Morris et al. (1989). Realizou-se tratamento diário via gavagem, por 28 dias, utilizando uma dose de 25 mg de nanopartícula de curcumina (CurNano) por kg do animal nos grupos SCN e TCN. Após esse período os animais foram eutanasiados para coleta de amostras do colo distal.

As características macroscópicas teciduais foram pontuadas de 0 a 13, de acordo com o nível crescente de lesão, baseado no escore de Appleyard e Wallace (1995). Realizou-se o processamento histológico do colo distal com coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) e avaliou-se semi-quantitativamente a intensidade da inflamação, utilizando-se critérios modificados de Boyer et al. (2005). A análise morfométrica foi realizada em 20 imagens de cada animal, capturadas por microscópio óptico com objetiva de 10x, totalizando 100 mensurações/túnica/animal através do sistema de análises de imagens Image Pró Plus® 4.5, com resultados expressos em μm .

Quantificou-se a atividade enzimática da mieloperoxidase tecidual (MPO), na presença de peróxido de hidrogênio e do indicador tetrametilbenzidina (TMB). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (620 nm).

Por meio do software Graph Pad Prism® 5.0, verificou-se a normalidade dos dados pelo teste Kolmogorov-Sminov. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, e os paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (One-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Após vinte e oito dias de experimento, a superfície do colo distal dos animais dos grupos SA e SCN, apresentava hiperemia leve e localizada, com ausência de ulcerações, contrastando com o obtido nos animais do grupo TA ($p < 0,05$), que apresentaram escores elevados na avaliação macroscópica, devido ao espessamento da parede do órgão e a presença de danos teciduais extensos. Os animais tratados com CurNano (TCN) revelaram um escore de inflamação menor, pois apresentaram apenas hiperemia e ulceração localizada, indicando um início de recuperação dos danos teciduais (Tabela 1).

O processo inflamatório também foi avaliado pela dosagem da atividade da MPO, enzima armazenada nos neutrófilos. A Tabela 1, apresenta o aumento na atividade da MPO estatisticamente significativo no grupo TA ($p < 0,05$), correlacionado com a presença de extenso infiltrado inflamatório nestes tecidos. No grupo TCN a dosagem foi semelhante aos controles ($p > 0,05$), mostrando redução da inflamação após o tratamento com nanopartículas de curcumina.

Microscopicamente, no colo distal dos animais dos grupos SA e SCN foram observadas alterações pontuais na mucosa, resultando em baixos escores. Os animais colíticos (TA), apresentaram características de inflamação tecidual severa, que permitiram diferir estatisticamente dos grupos controles ($p < 0,05$), tais como destruição da arquitetura da mucosa, vasodilatação, pontos hemorrágicos, alterações na morfologia das criptas, além da presença de infiltrado de polimorfonucleares nas túnicas que compõem a parede colônica. No grupo TCN constatou-se redução na intensidade das características inflamatórias, com recuperação de aspectos morfológicos padrão, semelhantes aos grupos controles ($p > 0,05$), conforme expresso na Tabela 1.

Tabela 1 - Avaliação semi-quantitativa macroscópica e microscópica da inflamação e atividade da mieloperoxidase (MPO) do colo distal de ratos dos grupos controle (C), salina-água (SA), TNBS-água (TA), salina-nanopartículas de curcumina (SCN) e TNBS-nanopartículas de curcumina (TCN). Resultados expressos em média \pm erro padrão (n=6).

Grupos	Avaliação macroscópica	Avaliação microscópica	Atividade MPO (D.O/mg de proteína)
C	0,0 \pm 0,0 ^a	0,16 \pm 0,16 ^a	0,079 \pm 0,009 ^a
SA	0,0 \pm 0,0 ^a	0,66 \pm 0,21 ^a	0,069 \pm 0,003 ^a
TA	4,00 \pm 0,0 ^b	5,5 \pm 0,34 ^b	0,129 \pm 0,019 ^b
SCN	0,167 \pm 0,167 ^a	0,66 \pm 0,21 ^a	0,074 \pm 0,005 ^a
TCN	2,33 \pm 0,211 ^{ab}	2,6 \pm 0,61 ^a	0,064 \pm 0,007 ^a

Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's para avaliação macroscópica e microscópica; Análise de Variância (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey para atividade MPO. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Como mostra a Tabela 2, as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa apresentaram aumento nas suas espessuras após a indução com ácido TNBS e tratamento com água, em consequência houve aumento da parede total neste grupo ($p < 0,05$). Para o grupo TCN, a análise morfométrica indicou aumento significativo apenas na túnica muscular ($p < 0,05$), enquanto as demais apresentaram espessura semelhante aos grupos controles ($p > 0,05$). O espessamento das túnicas é justificado pela ocorrência de infiltrado inflamatório, vasos dilatados, edema e angiogênese, que de acordo com Jerkic et al. (2010) são características associadas à fase crônica da doença intestinal.

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com CurNano por um período de 28 dias, possibilitou a remissão dos parâmetros inflamatórios avaliados. Isso indica que o nanoencapsulamento pode ser uma estratégia para aumentar a biodisponibilidade da curcumina e permitir sua ação anti-inflamatória, baseada na inibição do metabolismo do ácido araquidônico, da atividade da cicloxigenase e do fator nuclear NF-kB, além da eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Rocha et al., 2014).

Tabela 2 - Morfometria das túnicas mucosa, submucosa, muscular, serosa e parede total do colo distal de ratos dos grupos controle (C), salina-água (SA), TNBS-água (TA), salina-nanopartículas de curcumina (SCN) e TNBS-nanopartículas de curcumina (TCN). Resultados expressos em média \pm erro padrão (n=6).

Grupos/ Túnicas	Mucosa (μm)	Submucosa (μm)	Muscular (μm)	Serosa (μm)	Parede total (μm)
C	570,0 \pm 13,63 ^a	49,61 \pm 2,14 ^a	116,6 \pm 4,60 ^a	11,13 \pm 0,34 ^a	908,6 \pm 17,15 ^a
SA	521,5 \pm 21,30 ^a	44,35 \pm 1,28 ^a	130,9 \pm 7,08 ^{ac}	11,44 \pm 0,36 ^a	760,2 \pm 36,23 ^a
TA	732,8 \pm 29,7 ^b	98,03 \pm 10,66 ^b	168,7 \pm 18,66 ^{bc}	13,80 \pm 0,59 ^b	1.218 \pm 68,69 ^{bc}
SCN	554,1 \pm 38,62 ^a	37,95 \pm 2,6 ^a	107,1 \pm 3,14 ^a	10,64 \pm 0,28 ^a	847,3 \pm 39,19 ^a
TCN	643,4 \pm 35,67 ^a	46,77 \pm 4,34 ^a	168,7 \pm 16,77 ^{bc}	11,61 \pm 0,39 ^a	1.062 \pm 90,18 ^{ac}

Análise de Variância (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Conclusões

Comprova-se a cronicidade da inflamação induzida pelo agente ácido TNBS no colo distal e a eficácia do mesmo, reproduzindo características semelhantes às DIIs humanas. O potencial anti-inflamatório da curcumina nanoencapsulada foi constatado pela recuperação das características macroscópicas e morfométricas teciduais e pela redução da atividade da MPO, indicando efeito positivo do tratamento.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica, à professora Dr^a Maria Raquel Marçal Natali pela orientação e ao Laboratório de Histologia (DCM-UEM).

Referências

APPLEYARD C. B., WALLACE J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 269, n. 1, 1995.

BOYER L., et al. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. **Autonomic Neuroscience**, v. 117, n. 1, p. 41-53, 2005.

JERKIK M., et al. Dextran Sulfate Sodium leads to chronic colitis and pathological angiogenesis in endoglin heterozygous mice. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 16, p. 1859-1870, 2010.

MORRIS G.P., et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 795-803, 1989.

ROCHA B. A., et al. Curcumin encapsulated in poly-L-lactic acid improves its anti-inflammatory efficacy in vivo. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 2, n. 4, p. 62-73, dez. 2014.