O USO ISOLADO E DA ASSOCIAÇÃO DE CURCUMINA LIVRE OU NANOEMULSIFICADA E METOTREXATO PROMOVE AUMENTO DE SULFOMUCINAS NO ÍLEO DE RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

Carlos Henrique de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM),
Karile Cristina da Costa Salomão (Doutoranda/PBC/UEM)
Nilza Cristina Buttow (Orientadora), e-email:ch.oliveirabio@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas

Ciências Biológicas: Morfologia/Histologia
Palavras-chave: reumatoide; intestino; inflamação.

RESUMO

A artrite reumatoide é uma doença multifatorial que está atrelada à infiltração de células inflamatórias e formação de *pannus* no tecido ósseo e cartilaginoso. Todavia, a patologia afeta diversas regiões do corpo, como o intestino delgado. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do uso isolado e da associação de curcumina livre (CL) ou nanoemulsificada (CN) e metotrexato (MTX) no íleo de ratos com artrite induzida por adjuvante. Foram utilizados um total de 42 ratos albinos da linhagem *Holtzma*n com 50 dias de idade em 7 grupos (n=6): controle (C); artrítico (AIA); artrítico tratado com curcumina livre (AIA+CL); artrítico tratado com nanopartículas de curcumina (AIA+CN); artrítico tratado com MTX (AIA+MTX); artrítico tratado com curcumina e MTX (AIA+CL+MTX); artrítico com nanopartículas de curcumina e MTX (AIA+CN+MTX). Após 30 dias os animais foram eutanasiados. Nos parâmetros quantitativos, foram avaliadas as células caliciformes produtoras de mucinas neutras, sulfomucinas e sialomucinas (pH 1,0 e 2,5) e linfócitos intra-epiteliais (IEL´s). A associação de CL ou CN com MTX promoveu aumento de sulfomucinas e diminuição de sialomucinas no íleo de ratos artríticos. Já o MTX isolado, aumentou os IEL's em ratos artríticos com redução quando utilizada a associação do MTX e da curcumina. Os resultados apontam para uma relação da barreira física ocasionada pelo aumento das células caliciformes produtoras de sulfomucinas e a redução dos IEL's. Porém, mais estudos para avaliar outros parâmetros que podem estar relacionados com as análises precisam ser realizados.

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada pela inflamação do tecido sinovial das articulações, cartilagens e ossos. Essa inflamação é decorrente do fator reumatoide (autoanticorpos caracterizados pela habilidade de reagir com determinados epítopos da IgG), produção de anticorpos dirigidos contra a citrulina (produzidos no líquido e membrana sinovial inflamada, capazes de reagir com diversos peptídeos citrulinados) e a infiltração de células linfoides e mieloides, que ativam células teciduais (osteoclasto e condrócitos) promovendo a destruição articular. Ademais, há projeções de tecido proliferativo que penetram a cavidade articular, invadindo tecido cartilaginoso e ósseo, formando *pannus* (SCHERER et al.,

2020). A AR é uma patologia multissistêmica, afetando órgãos extra-articulares (pulmão, rins, coração, vasos sanguíneos, sistema nervoso e intestino). No intestino delgado, especialmente na porção final (íleo), os efeitos da AR induzida por adjuvante culminam em processos neurodegenerativos nos plexos mioentérico e submucoso, inflamação da mucosa e vasculite reumática (BOSSOLANI *et al*., 2020). O tratamento da AR pode ser realizado com diversos fármacos, como o metotrexato (MTX). Este fármaco possui propriedades antimetabólica, antiproliferativa e anti-inflamatória. Além disso, o MTX possui alta eficácia e baixo custo no mercado, sendo de fácil acesso. Todavia, o uso de MTX pode ocasionar efeitos colaterais e adversos, como cefaleia, úlcera, hiperemia, êmese, hipertermia, hiperpirexia, entre outros. Desta forma, a medicina alternativa surge como uma possibilidade para minimizar os efeitos adversos e colaterais, mantendo a eficácia no combate à AR. A curcumina proveniente da *Curcuma longa* (açafrão), é antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antitumoral e antirreumática. Porém, possui baixa biodisponibilidade por administração oral, instabilidade química e rápida degradação. Entretanto, a nanotecnologia pode ser um fator para superar essas limitações. Nanoemulsões são promissores carreadores de agentes terapêuticos devido à capacidade de proteger substâncias fotolábeis da degradação, controlar a liberação de fármacos lipofílicos e diminuir os efeitos adversos. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do uso isolado e da associação de curcumina (livre e em nanopartículas) e MTX sobre as células caliciformes e IEL's no íleo de ratos *Holtzman* com artrite induzida com adjuvante (AIA).

Materiais e Métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM) sob nº 2012070222. Foram utilizados um total de 42 ratos albinos da linhagem *Holtzman*, com 50 dias de idade distribuídos aleatoriamente em 7 grupos (n=6): controle (C); artrítico (AIA); artrítico tratado com curcumina livre (AIA+CL); artrítico tratado com nanopartículas de curcumina (AIA+CN); artrítico tratado com MTX (AIA+MTX); artrítico tratado com curcumina e MTX (AIA+CL+MTX); artrítico tratado com nanopartículas de curcumina e MTX (AIA+CN+MTX). A artrite foi induzida por injeção intradérmica de adjuvante completo de Freud (CFA) na pata posterior esquerda. Após a indução, administrou-se por via oral, 200mg/kg dipirona como analgésico durante três dias consecutivos (dias 0, 1 e 2). No 7º dia após a indução artrítica teve início o tratamento que se manteve até o 29º dia. O qual foi realizado via gavagem. O MTX foi administrado na dose de 1mg/kg 4 vezes em intervalos de 7 dias. A primeira dose no 7º dia e a última no 28º dia após a indução da artrite. No 30° dia após a indução da artrite os animais foram pesados e eutanasiados com 30mg/kg de xilazina® e 180mg/kg de ketamina®, após esse procedimento eles foram submetidos à laparotomia e em seguida a retirada do íleo destinado as análises histológicas. Foi fixado em paraformaldeído 4% (pH 7,4) e posteriormente armazenados em álcool a 70%. Para as análises histológicas, os tecidos foram desidratados em bateria de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina, cortado em micrótomo com 5 µm de espessura e corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS, mucinas neutras) Alcian Blue pH 2.5 e 1.0 (sialomucinas e

sulfomucinas, respectivamente). Hematoxilina e Eosina (HE) para a análise de linfócitos intra-epiteliais (IEL´s). Foram quantificadas 2500 células presentes na cripta e vilosidade e foi calculado o índice de cada subpopulação celular. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism v.8.05. Todos os dados passaram no teste de normalidade. O teste estatístico utilizado foi análise de variância One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de *p* menor que 0,05 ($p<0,05$).

Resultados e Discussão

Os resultados são apresentados na figura 1. Na análise de células caliciformes secretoras de mucinas neutras o grupo AIA+CN obteve diferença significativa somente quando comparado com o AIA+CL, indicando o aumento de células coradas com PAS na presença da curcumina na sua forma nanoemulsificada (Fig. 1A). Entretanto, não há diferença estatística ao ser comparado com o grupo C e AIA. As células que secretam mucinas neutras estão relacionadas com a absorção de moléculas de baixo peso molecular.

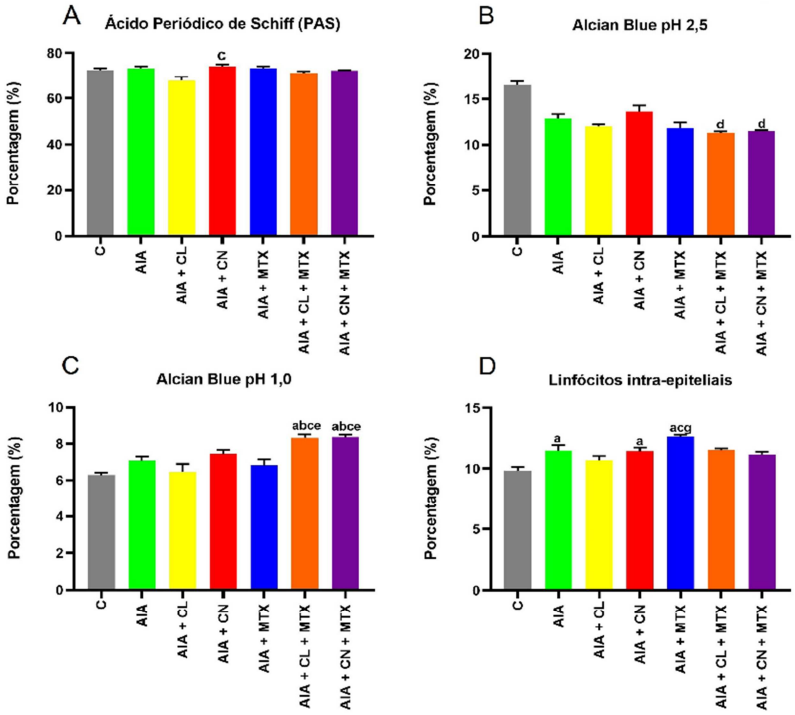

Figura 1. Quantificação de células caliciformes coradas com: (A) PAS; Alcian Blue pH 2,5 (B); Alcian Blue pH 1,0 (C); Quantificação de linfócitos intra-epiteliais (D). Resultados em porcentagem (%) e média ± erro padrão.

Houve redução significativa nas células caliciformes secretoras de sialomucinas no grupo AIA + CN + MTX em relação ao AIA + CN (Fig. 1B). Já as sulfomuncinas, foi observado o aumento de células caliciformes no grupo AIA + CL + MTX quando comparado com os grupos C, AIA, AIA + CL e AIA + MTX. E o grupo AIA + CN+ MTX também demonstrou aumento quando comparado com C, AIA E AIA + MTX (Fig. 1C). Estudos apontam que tanto o MTX (SERRANO-MIRANDA, 2022) quanto a

Curcumina (SHEN et al. 2017) modulam a microbiota podendo afetar as subpopulações de células caliciformes. Na análise de IEL's houve aumento significativo nos grupos AIA, AIA + CN e AIA + MTX quando comparado com o grupo C. O sinergismo entre o MTX e a curcumina reduziu esta subpopulação. O aumento de linfócitos IEL's com administração do MTX pode estar atrelada com o receptor de adenosina A2B (A2BR) expressa no íleo. O A2BR leva à diferenciação e aumento dos IEL´s em células pró-inflamatórias Th17 (FRIEDMAN, 2019). Todavia, quando o MTX está associado com a curcumina na forma livre ou nanoemulsão ocorre redução destas células.

Conclusão

A associação do MTX e da Curcumina livre ou em nanoemulsão reduz as sialomucinas e aumentam as sulfomucinas no íleo de ratos artríticos. A artrite e o MTX promovem aumento de IEL's, no entanto, o sinergismo do MTX com a curcumina reduz esta subpopulação. Os resultados sugerem que pode haver uma relação da barreira física ocasionada pelo aumento das células produtoras de sulfomucinas e a redução dos IEL's. Porém, mais estudos são necessários para avaliar outros parâmetros que podem estar relacionados com as observações encontradas nesse estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pelo apoio financeiro e a equipe do DCM/UEM.

Referências

BOSSOLANI, Gleison Daion Piovezana et al. Rheumatoid arthritis induces enteric neurodegeneration and jejunal inflammation, and quercetin promotes neuroprotective and anti-inflammatory actions. **Life sciences**, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320519308835>. Acesso em: 12 ago. 2023.

FRIEDMAN, Benjamin; CRONSTEIN, Bruce. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. **Joint bone spine**, v. 86, n. 3, p. 301-307, 2019. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297319X18301817>. Acesso em 22 ago. 2023.

SERRANO-MIRANDA, Ernestina G. El intestino-microbiota en los ejes reguladores del metabolismo. **Pinelatinoamericana**, v. 2, n. 3, p. 225-239, 2022. Disponível em: <file:///C:/Users/co062/Downloads/Serrano+Miranda.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2023

SCHERER, Hans Ulrich et al. The etiology of rheumatoid arthritis. **Journal of autoimmunity**, v. 110, p. 102400, 2020. Disponível em:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841119308431>. Acesso em: 12 ago. 2023.

SHEN, Liang *et al*. Regulative effects of curcumin spice administration on gut microbiota and its pharmacological implications. **Food & nutrition research**, 2017.Disponível<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/16546628.2017.1361780>. Acesso em: 28 ago. 2023.