

## ASSOCIAÇÃO DE CURCUMINA LIVRE OU EM NANOEMULSÃO E METOTREXATO AUMENTA A POPULAÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES NO JEJUNO DE RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

Arthur Girardi Francalin Laureano (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Nilza Cristina Buttow (Orientador). E-mail: ncbuttow@uem.br

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

**Área e subárea do conhecimento: Ciências biológicas, Morfologia / Histologia.**

**Palavras-chave:** Sialomucinas; sulfomucinas; inflamação.

### RESUMO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória de caráter autoimune e progressiva que afeta o tecido sinovial de diversas articulações, provocando alterações inflamatórias sistêmicas. O fármaco mais empregado é o metotrexato (MTX), um imunomodulador com grandes efeitos adversos, alta citotoxicidade e perda de eficiência ao longo do tempo. Compostos naturais com efeitos terapêuticos anti-inflamatórios e antioxidantes como a curcumina têm sido explorados para sinergismos a fim de maximizar a terapia. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com curcumina livre ou em nanoemulsão isoladas ou em associação com MTX sobre as células caliciformes do jejuno de ratos artríticos induzidos por adjuvante. Trinta e cinco ratos *Holtzman* foram submetidos à AR por adjuvante completo de Freund e tratados com MTX, curcumina livre e em nanoemulsão; após o período experimental, o jejuno foi coletado e lâminas histológicas foram coradas com PAS, Alcian Blue pH 1.0 e 2.5 e foram analisadas. Os resultados demonstraram que o sinergismo desses fármacos promove manutenção das populações de células caliciformes neutras e ácidas quando comparadas com os controles, porém elas aumentam quando comparadas com os AIA tratados com curcumina de forma isolada. Conclui-se que associação de curcumina e MTX no tratamento de AR aumenta a densidade de células caliciformes que secretam mucinas neutras e ácidas. E novos estudos são necessários para avaliar se estes resultados estão relacionados com a modulação da microbiota intestinal.

### INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica e progressiva que afeta o tecido sinovial de diversas articulações, apesar de possuir etiologia pouco elucidada, trata-se de uma doença autoimune com alterações sistêmicas frente à inflamação disseminada; alguns marcadores para AR já foram identificados, como a imunoglobulina A (IgA) encontrada principalmente de forma precoce, sugere

participação da imunidade de mucosas, na etiopatogenia da doença. A principal hipótese sugere que a perda da homeostasia da barreira mucosa pode ser responsável pelo desenvolvimento da AR, tornando antígenos do lúmen altamente imunogênicos, levando à formação de autoanticorpos. A principal ferramenta que mantém essa homeostasia da imunidade de mucosas é sua barreira de muco, que atua como proteção físico-química contra antígenos do lúmen intestinal. Estas mucinas são compostas principalmente por esqueletos de carbonos sintetizados, armazenados e secretados pelas células caliciformes do epitélio. Estas podem ser divididas em mucinas neutras e ácidas (sialomucinas e sulfomucinas) as quais desempenham diferentes papéis e podem ser reguladas desde metabólitos da microbiota comensal até citocinas inflamatórias. A disfunção desse mecanismo leva à diversas alterações morfofisiológicas de órgãos, incluindo, a perda de tolerância à antígenos próprios (Deplancke; Gaskins, 2001). Atualmente, o tratamento padrão para AR é medicamentoso, sendo o metotrexato (MTX) altamente prescrito e de alta toxicidade. O uso de substâncias naturais como agentes sinérgicos tem se mostrado uma alternativa interessante para diminuição da dose, toxicidade e aumento dos efeitos terapêuticos dessas medicações; a curcumina é um composto extraído da *Curcuma longa*, tem efeito anti-inflamatório e antioxidante. Seu uso isolado ou sua associação com MTX pode ser benéfica, potencializando a terapêutica; no entanto, possui baixa biodisponibilidade na forma natural (lipofílica), o que leva à exploração de seus efeitos na forma farmacêutica de nanoemulsão hidrofílica. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da AR sobre as células caliciformes que expressam mucinas ácidas e neutras no jejuno de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante, bem como avaliar o sinergismo entre MTX e curcumina livre ou em nanoemulsão.

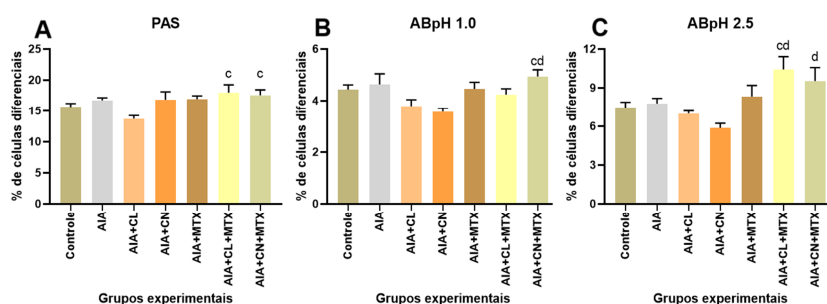
## MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM nº 2012070222). Trinta e cinco ratos albinos machos da linhagem *Holtzman* com 50 dias de vida foram mantidos a temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , e com ração NUVILAB® e água à vontade. Foram separados em 7 grupos experimentais (n=5): Grupos Controle; Artríticos (AIA); AIA tratados com curcumina livre (AIA+CL); AIA tratados com nanoemulsão de curcumina (AIA+CN); AIA tratados com MTX (AIA+MTX); AIA tratados com MTX e curcumina livre (AIA+CL+MTX); AIA tratados com MTX e nanoemulsão de curcumina (AIA+CN+MTX). A dosagem da Curcumina livre ou em nanoemulsão foi de 30 mg/kg de peso e do MTX foi de 1 mg/Kg. A nanoemulsão de curcumina foi adquirida em parceria com a Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto. A indução da artrite foi realizada via Adjuvante Completo de Freund (CFA) com uma injeção intradérmica na pata esquerda. Entre o 7º e 29º dia os animais foram tratados, via gavagem, de acordo com as variáveis definidas: Controle e AIA receberam água diariamente em quantidade equivalente às medicações dos demais grupos. Após o período experimental os 35 animais foram eutanasiados com dose letal de Ketamina e Xilazina® (180 mg/kg de peso corporal e 30 mg/Kg

respectivamente; via intramuscular); o intestino foi coletado, fixado em Paraformaldeído 4% (pH7.4) e armazenados em etanol 70%. Os órgãos foram embebidos em parafina e posteriormente seccionados em cortes histológicos semi-seriados, com espessura de 5 µm. Três lâminas/animal foram confeccionadas para contagem das células caliciformes secretoras de mucinas neutras (PAS), sulfomucinas (Alcian Blue pH 1.0) e sialomucinas (Alcian Blue pH 2.5). As lâminas foram analisadas (em duplo-cego) em um microscópio óptico Olympus CX31, na objetiva de 40x, os núcleos das células foram contados, com um contador manual, entre a base da cripta e o ápice da vilosidade, de forma que a próxima contagem não fosse imediatamente consecutiva à anterior. Uma média de 30 vilos foram contabilizados por animal para entregar um total de cerca de 2500 células totais, das quais foram calculados o índice, em porcentagem, das células positivas em comparação com as células totais. As análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prisma v.8.05*. Com análises de variância *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey em casos com distribuição normal, com resultados expressos em média ± erro padrão, onde, o valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a figura 1, o índice de células caliciformes secretoras de mucinas neutras (coradas com PAS) apresentou um aumento significativo nos grupos AIA+CL+MTX e AIA+CN+MTX em comparação com o grupo AIA+CL ( $p=0,0190$ ;  $p=0,0419$ ). Já o índice de células caliciformes secretoras de sulfomucinas (ABpH 1.0) teve aumento significativo do grupo AIA+CN+MTX em comparação com os grupos AIA+CL e AIA+CN ( $p=0,0485$ ;  $p=0,0108$ ). E por fim, o índice de células caliciformes secretoras de sialomucinas (ABpH 2.5) expressou aumento significativo entre o grupo AIA+CN+MTX em comparação com o grupo AIA+CN ( $p=0,0108$ ) enquanto o grupo AIA+CL+MTX expressou aumento significativo contra os grupos AIA+CL e AIA+CN ( $p=0,0192$ ;  $p=0,0010$ ).



**Figura 1 – Índice de células caliciformes** – (A) Ácido Periódico de Schiff; secretoras de mucinas neutras (B) Alcian Blue pH 1.0; secretoras de sulfomucinas (C) Alcian Blue pH 2.5; secretoras de sialomucinas. Legenda: (c) diferença estatística em relação ao grupo AIA+CL; (d) diferença estatística em relação ao grupo AIA+CN. Dados expressos pela média dos índices em porcentagem ± erro padrão.

No jejuno podemos observar que a AIA não promoveu alteração nas células caliciformes quando comparada com os animais controle. O tratamento com a curcumina livre ou em nanoemulsão demonstrou uma tendência a redução dessas células, no entanto, quando elas foram associadas com o MTX, em sua maioria, aumentaram as três subpopulações de células caliciformes. Sabe-se que tanto a Curcumina (Shen *et al.* 2017) quanto o MTX (Serrano-Miranda, 2022) modulam a microbiota e esta tem um papel importante na produção de mucinas visando proteger o intestino contra bactérias patogênicas (Ofelio, *et al.* 2019). Desta forma, as alterações na microbiota que são afetadas por estes fármacos de forma isolada são diferentes quando elas são administradas juntas, essa associação pode afetar negativamente a microbiota promovendo aumento das células visando promover maior proteção do epitélio.

## CONCLUSÕES

A associação de curcumina livre ou em nanoemulsão e MTX no tratamento de AR aumenta a densidade de células caliciformes que secretam mucinas neutras e ácidas. Estudos sobre a microbiota intestinal podem ajudar a elucidar se este aumento é ocasionado pela modulação dessas bactérias pelo sinergismo da curcumina e MTX.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro à pesquisa e a equipe do DCM/UEM.

## REFERÊNCIAS

DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1131S-1141S, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ajcn/73.6.1131S>>. Acesso em: 27 ago. 2023.

SERRANO-MIRANDA, E. G. El intestino-microbiota en los ejes reguladores del metabolismo. **Pinelatioamericana**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 225–239, 2022. Disponível em: <<https://revistas.unc.edu.ar/index.php/pinelatam/article/view/38949>>. Acesso em: 28 ago. 2023

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

OFELIO, C. *et al.* Histochemistry of goblet cells and micro-computed tomography to study the digestive system in the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*.

32º Encontro Anual de Iniciação Científica  
12º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



23 e 24 de Novembro de 2023

**Aquaculture**, v. 502, p. 400–409, mar. 2019. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.048>>. Acesso em: 30/08/2023