

ASSOCIAÇÃO DE CURCUMINA LIVRE OU NANOEMULSÃO E METOTREXATO NÃO ALTERAM DANOS HEPÁTICOS EM RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

Mayara Oliveira Brandão Souza (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Nilza Cristina Buttow (Coorientadora) Maria Raquel Marçal Natali (Orientadora). E-mail: mrmnatali@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Histologia.

Palavras-chave: hepatócitos; fígado; morfometria.

RESUMO

A Artrite reumatóide (AR) é uma inflamação autoimune e crônica que atinge especialmente as articulações. Entre as formas de tratamento da doença pode-se citar o metotrexato (MTX), que apesar de eficaz está associado a efeitos colaterais. Por essa razão, o uso de adjuvantes, como a curcumina, ao tratamento da AR pode ser benéfico. Assim este trabalho tem como objetivo analisar os efeitos do uso isolado e da associação de MTX e curcumina (livre e nanoemulsificada) em ratos com artrite induzida por adjuvante. O tratamento foi realizado com 35 ratos divididos em 7 grupos: controle (C) e Artrítico (AIA): água; Artrítico com curcumina livre (ACL): 30mg/kg/dia de curcumina livre; Artrítico tratado com nanoemulsão de curcumina (ACN): 30 mg/kg/dia de curcumina em nanoemulsão; Artrítico tratado com MTX (AM): 1 mg/kg/semana MTX; Artrítico tratado com curcumina livre e MTX (ACLM): associação de curcumina livre e MTX; Artrítico tratado com nanoemulsão de curcumina e MTX (ACNM): associação de nanoemulsão de curcumina e MTX. Trinta dias após a indução da artrite, os animais foram eutanasiados, o fígado coletado, pesado, fixado e processado para análise histológica. Avaliou-se a densidade e área de hepatócitos. Na área dos hepatócitos e peso do fígado, todos os animais artríticos apresentaram redução em relação ao controle, além disso ACLM e ACNM também reduziram a área do hepatócito em relação a AIA. A densidade foi maior no ACNM em relação ao C. Apesar desse esquema terapêutico aparentemente não amenizar os danos hepáticos da AR, mais estudos podem ser considerados para confirmar esses achados.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) trata-se de uma doença inflamatória autoimune e crônica que agride preferencialmente a membrana sinovial, causando problemas ósseos e cartilagenosos, que podem acarretar inflamação sistêmica com potencial de causar dano articular irreversível (Lee *et al.*, 2001). Manifestações extra articulares são

menos características que as articulares, porém a AR acomete outros órgãos e sistemas, como o fígado podendo causar fibrose hepática e cirrose. Uma das principais formas de tratamentos da AR é o uso de metotrexato (MTX), que tem grande eficácia e um bom perfil de tolerância na doença, atuando como um agente anti-inflamatório e imunossupressor. Porém apresenta toxicidade, causando efeitos colaterais, como vômitos, náuseas, disfunção hepática, insuficiência renal e outras complicações gastrointestinais. Ainda não se tem conhecimento completo dos mecanismos de hepatotoxicidade do MTX, porém estudos clínicos elucidam que possivelmente se deve ao estresse oxidativo, ocorrido pelo acúmulo do complexo MTX-poliglutamato nos hepatócitos, diminuindo os níveis de ácido fólico e consequentemente causando necrose hepática (Sahindokuyucu-Kocasari *et al*, 2021). Com base nesses efeitos colaterais o uso de produtos naturais vem crescendo por apresentarem bons resultados como adjuvantes. A curcumina, por exemplo, é derivada da cúrcuma e possui efeitos variados, como atividade anti-inflamatória e antioxidante. Ensaio já mostraram que a curcumina é segura mesmo em doses elevadas, e seu uso em nanoemulsões aumenta sua biodisponibilidade farmacológica (AKABERI M *et al.*, 2021). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento isolado e da associação com MTX e curcumina (livre ou em nanoemulsão) no fígado de ratos submetidos a artrite induzida por adjuvante, por meio da análise de densidade e área total de hepatócitos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/UEM, nº 20120702222. Aos 50 dias de idade, 35 ratos *Holtzman*, foram fornecidos pelo Biotério Central da UEM e divididos em 7 grupos experimentais (n=5): Controle (C); Artrítico induzido por adjuvante (AIA); Artrítico tratado com curcumina livre (ACL); Artrítico tratado com nanoemulsão de curcumina (ACN); Artrítico tratado com MTX (AM); Artrítico tratado com curcumina livre e MTX (ACLM); Artrítico tratado com nanoemulsão de curcumina e MTX (ACNM). Todos os animais foram tratados por gavagem gástrica. Além disso, as nanoemulsões foram produzidas em parceria com a Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto. A indução da artrite foi realizada por meio de injeção intradérmica na pata posterior esquerda dos animais com 0,1 ml do adjuvante completo de Freund (CFA). O tratamento, iniciou-se 7 dias após a indução da artrite. Os grupos C e AIA receberam o volume de água equivalente aos outros grupos; a dose de Curcumina livre ou nanoencapsulada foi de 30mg/kg de peso diariamente; o MTX foi administrado na dose de 1mg/kg uma vez por semana. Posteriormente, no 30º dia após a indução da artrite, os ratos foram pesados e eutanasiados com Ketamina (270 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg). O fígado foi coletado e fixado em paraformaldeído 4% e armazenado em álcool 70%. As amostras foram processadas histologicamente e coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) para análise morfométrica. Foram capturadas 50 imagens de cada animal na objetiva de 40x. Por meio do programa ImagePro Plus, foram medidos 100 hepatócitos por rato e contabilizado o número de hepatócitos em

25 imagens por animal. Para isso, foi calculado o número de hepatócitos por área útil, ou seja, foi aplicada uma tarja/black sobre a veia centro lobular da imagem capturada e contabilizadas todas as células fora da tarja. Posteriormente realizou-se o cálculo da área total da imagem menos a área do *black/tarja*, e foi definida uma área útil de 86.600 μm^2 . Foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, os dados paramétricos submetidos à Análise de Variância *One-way* ANOVA, em seguida foi realizado o pós-teste de Tukey. Já os dados não paramétricos passaram pela análise de Kruskal-Wallis seguida pelo pós-teste de Dunns. Em todas as comparações estatísticas o nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 pode-se observar os resultados do número de hepatócitos (1-A), a área celular dos hepatócitos (1-B) e o peso do fígado (1-C). Sendo que na avaliação da área dos hepatócitos, todos os grupos artríticos apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo C. Os grupos ACLM e ACNM apresentaram também redução da área em relação ao grupo AIA. Nas análises de número de hepatócitos é possível observar que todos os grupos, exceto pelo ACLM, apresentaram aumento significativo em relação ao grupo C. Além disso, os grupos ACLM e ACLM diminuíram em relação ao grupo AIA. Outro achado é que ACL e ACN apresentaram mais hepatócitos que ACLM. E ACNM aumentou significativamente em relação a AM e ACLM. Por fim, tratando-se do peso do fígado, todos os grupos submetidos a artrite diminuíram a massa total hepática.

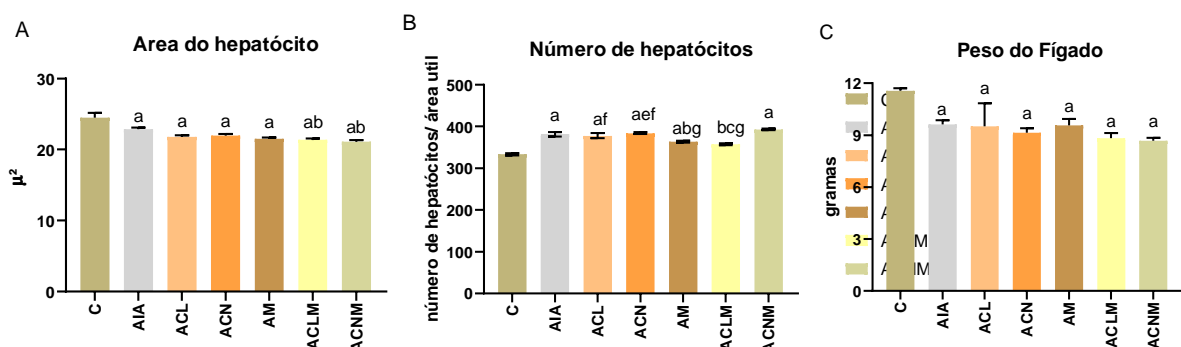


Figura 1 - Análises hepáticas. (A) Área dos hepatócitos; descritos em μm^2 . (B) Número de hepatócitos; calculados dentro de uma área útil de 86.600 μm^2 . (C) Peso fígado. (A e C) Análises realizadas por *One-way* ANOVA/Tukey, expressos em média \pm erro padrão ($n=5$ /grupo). (B) Análises realizadas por Kruskal-Wallis/Dunns, expressos em mediana \pm intervalo de confiança ($n=5$ /grupo). (^a) grupo estatisticamente diferente do grupo C. (^b) grupo estatisticamente diferente do grupo AIA. (^c) grupo estatisticamente diferente do grupo ACL. (^e) grupo estatisticamente diferente do grupo AM. (^í) grupo estatisticamente diferente do grupo ACLM. (^g) grupo estatisticamente diferente do grupo ACNM.

É provável que o aumento do número de hepatócitos seja um efeito compensatório da diminuição da área dos hepatócitos, fazendo com que estes fiquem mais concentrados. Além disso, nosso estudo corrobora a afirmação que mais de 90% de pacientes artríticos apresentam anormalidades hepáticas (Ebert *et al.*, 2011), com a diminuição da área dos hepatócitos e atrofia hepática nos ratos artríticos.

Demonstrando que o presente esquema terapêutico não foi capaz de amenizar os danos da artrite no fígado. Contudo ainda existem mais análises que podem ser realizadas, a fim de confirmar se realmente o uso isolado e a associação de curcumina com MTX pode ser útil para amenizar os danos de uma artrite severa.

CONCLUSÕES

Dentro de um modelo de artrite severa, o uso de 30 mg/kg de curcumina (livre ou nanoemulsificada) e/ou MTX não modifica a atrofia de hepatócitos, aumento do número de hepatócitos e a redução do peso do fígado gerado pela AIA. Contudo ainda se trata de um tratamento que precisa ser melhor estudado, pois outros parâmetros importantes ainda podem ser avaliados para comprovar sua eficácia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica Também ao laboratório de Inflamação e Histotécnica animal da UEM que possibilitaram esse experimento e a todos que de alguma forma contribuíram para que essa pesquisa acontecesse.

REFERÊNCIAS

AKABERI, M., SAHEBKAR, A., EMAMI, S.A. Turmeric and Curcumin: From Traditional to Modern Medicine. **Studies on Biomarkers and New Targets in Aging Research in Iran**, vol. 1291, pp. 15–39, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-56153-6_2>. Acesso em 29 de agosto, 2023

EBERT, E.C., HAGSPIEL, K.D. Gastrointestinal and Hepatic Manifestations of Rheumatoid Arthritis. **Digestive Diseases and Sciences**. Vol. 56, 295–302, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10620-010-1508-7>>. Acesso em 30 de agosto, 2023.

KEW, M.C. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. **Lancet**. vol. 355(9204): 591-2, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)00219-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)00219-6)>. Acesso em 25 de agosto, 2023.

LEE, DM; WEINBLATT, ME. Rheumatoid arthritis. **Lancet**. Vol. 11; 358:903, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)06075-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)06075-5)>. Acesso em 20 de agosto, 2023.

SAHINDOKUYUCU-KOCASARI F, AKYOL Y, OZMEN O, ERDEMLI-KOSE S, GARLI S. Apigenin alleviates methotrexate-induced liver and kidney injury in mice. **Human and Experimental Toxicology**. Vol. 40(10):1721-1731, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/09603271211009964>>. Acesso em 28 de agosto, 2023.