

## **METOTREXATO E CURCUMINA NANOENCAPSULADA PROMOVEM FIBROSE NO FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS A ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE**

Leonardo José Afonso de Carvalho Ito (PIC/UEM), Karile Cristina da Costa Salomão (Co-orientadora), Nilza Cristina Buttow (Orientadora). Email: [lito41447@gmail.com](mailto:lito41447@gmail.com)

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Morfológicas, Maringá, PR

**Área e subárea do conhecimento:** Morfologia, Histologia,

**Palavras-chave:** Adjuvante completo de Freund, Artrite reumatóide; fibrose hepática.

### **RESUMO**

A artrite reumatoide (AR) é uma doença articular inflamatória crônica, caracterizada pela infiltração de células inflamatórias e autoanticorpos na membrana sinovial de diversas articulações. Como doença autoimune, a AR não apenas afeta as articulações, mas também pode causar manifestações sistêmicas, como disfunção hepática, podendo ocasionar fibrose. A curcumina, um produto natural com efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, têm mostrado potencial para a melhora do quadro da artrite. E o uso de formulações como nanoemulsões têm sido promissoras pelo aumento da biodisponibilidade. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA), usando curcumina livre (CL) ou curcumina nanoemulsificada (CN) de forma isolada ou em associação com metotrexato (MTX) sobre o acúmulo de colágeno no tecido hepático. Os animais foram divididos em sete grupos: controle (CONT), AIA, AIA+CL, AIA+CN, AIA+MTX, AIA+CL+MTX e AIA+CN+MTX. A dose de Curcumina foi de 30 mg/Kg administrados diariamente e de MTX de 1 mg/Kg semanalmente. O fígado foi corado com *Picrosirius red*. Os resultados mostraram que o grupo artrítico sem tratamento e o tratado com CL não tiveram alteração do colágeno. No entanto, os outros tratamentos provocaram aumento de colágeno. O tratamento com MTX associado ou não e a CN promovem fibrose no fígado. Desta forma, o uso de MTX isolado ou associado com Curcumina livre ou em nanoemulsão devem ser utilizados com prudência e novos estudos devem ser realizados para avaliar o grau de segurança do uso destes medicamentos.

### **INTRODUÇÃO**

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica que afeta cerca de 1% da população mundial, sendo uma das principais causas de incapacidade física e comprometimento da qualidade de vida. No Brasil, estima-se que aproximadamente 2 milhões de pessoas sejam afetadas por essa condição (SOCIETY, M. *et al.*, 2022), que impõe uma carga significativa ao sistema de saúde devido aos custos associados ao tratamento e à perda de produtividade. O tratamento da AR envolve o uso de fármacos imunossupressores, como o MTX, que é amplamente utilizado como tratamento de primeira linha devido à sua eficácia em controlar a inflamação articular e retardar a progressão da doença. No entanto, um dos efeitos adversos graves associados ao uso prolongado do metotrexato e de outros

imunossupressores é o risco de desenvolvimento de fibrose hepática (EDE VAN, M. *et al.*, 2017), uma condição que pode evoluir para cirrose e falência hepática. Essa complicação destaca a necessidade urgente de desenvolver e avaliar novos métodos terapêuticos que possam controlar a AR de maneira eficaz, como a curcumina livre ou nanoencapsulada (AMALRAJ, M. *et al.*, 2017), minimizando ao mesmo tempo os efeitos colaterais a curto e longo prazo (PARVIZ, M. *et al.*, 2012) já amplamente estabelecidos, como, dentre elas, a fibrose hepática.

A busca por terapias mais seguras é essencial para melhorar o conhecimento sobre diferentes formas possíveis de tratamento da AR, buscando oferecer aos pacientes tratamentos que maximizem os benefícios clínicos enquanto minimizam os riscos de complicações graves a longo prazo, sendo esse estudo de grande importância, dado a prevalência dessa doença em um contexto populacional e tendo impacto significativo no sistema de saúde. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do uso isolado ou da associação da curcumina na forma livre ou em nanoemulsão e do MTX nas fibras colágenas hepáticas de ratos *Holtzman* com artrite induzida por adjuvante.

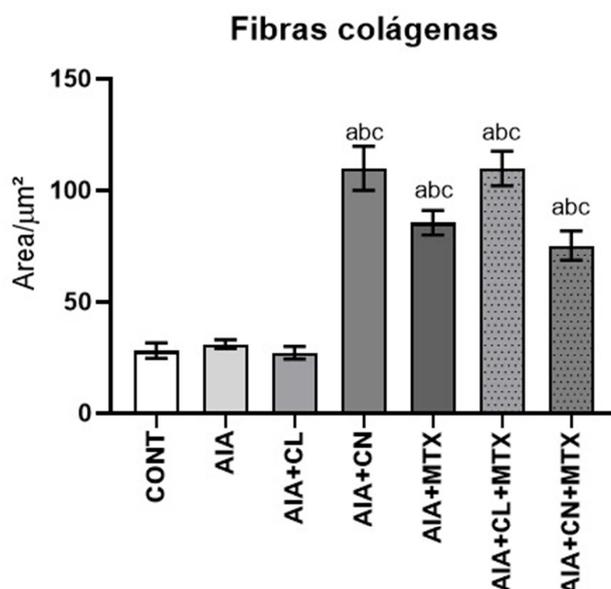
## MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA-UEM), sob o número 20120702222. Foram utilizados ratos da linhagem *Holtzman*, com 50 dias de idade. Os animais foram distribuídos em sete grupos experimentais (n=6): controle (CONT), artrítico (AIA), artrítico tratado com curcumina livre (AIA+CL), artrítico tratado com curcumina nanoemulsificada (AIA+CN), artrítico tratado com metotrexato (AIA+MTX), artrítico tratado com curcumina livre e metotrexato (AIA+CL+MTX), e artrítico tratado com curcumina nanoemulsificada e metotrexato (AIA+CN+MTX). A dose de Curcumina foi de 30 mg/Kg administrados diariamente e de MTX de 1 mg/Kg semanalmente. O tratamento foi administrado por via gavagem, do 7º ao 29º dia após a indução da artrite, e no 30º dia foi realizada a eutanásia dos animais. As nanopartículas foram desenvolvidas em colaboração com a Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto.

Para as análises histológicas, no 30º dia de tratamento, os animais foram eutanasiados, e os fígados foram removidos, fixados em paraformaldeído a 4% e armazenados em álcool 70%. Posteriormente, os órgãos foram desidratados em uma série de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram feitos em um micrótomo e corados com *Picrosirius red*. Foram capturadas 30 imagens por animal com um microscópio óptico (NIKON® Eclipse 80i), e essas imagens foram utilizadas para a quantificação do colágeno na região periférica às veias centrolobulares. As imagens foram analisadas utilizando o software Image Pro Plus versão 4.5.0.29. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prisma v.7.05. Os dados não seguiram uma distribuição normal, portanto, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns. O valor de *p* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na análise de fibras colágenas no tecido hepático (Figura 1), o grupo AIA e AIA+CL não apresentaram diferença quando comparados com o grupo CONT. No entanto, quando comparamos os grupos AIA+CN ( $p < 0,0001$ ), AIA+MTX ( $p < 0,0001$ ), AIA+CL+MTX ( $p < 0,0001$ ) e AIA+CN+MTX ( $p < 0,0001$ ) observou-se um aumento significativo de fibras colágenas quando comparado aos grupos CONT, AIA e AIA+CL. Com trinta dias de artrite não houve aumento do colágeno, contudo, nossos resultados demonstram que o tratamento com MTX provoca fibrose, assim como observado em outros estudos (EDE VAN, M. *et al.*, 2017). Apesar do grupo AIA não apresentar aumento de colágeno no período de tempo avaliado neste estudo, observou-se que a Curcumina na forma livre também não afetou a síntese do colágeno. E podemos observar que ela foi mais benéfica do que na forma de nanoemulsão que ocasionou aumento significativo de colágeno. A administração da CN visa aumentar a biodisponibilidade da curcumina que é responsável pelo aumento da absorção e dos níveis da curcumina na circulação possibilitando desta forma um maior aproveitamento desta substância. No entanto, neste estudo a CN promoveu aumento de colágeno, assim como o MTX. Todos os grupos tratados com MTX isolado ou associados com Curcumina apresentaram aumento de colágeno, indicando que nem mesmo a CL é capaz de reduzir a síntese do colágeno quando associada com o MTX. Estes achados devem ser analisados com cautela sendo necessário mais estudos para avaliar se ocorrem alterações em outros parâmetros que justificariam a interrupção do tratamento.



**Figura 1. Quantificação de fibras colágenas no fígado de ratos Holtzman.** Grupos (n=5): CONT: controle; AIA: artrite induzida por adjuvante; AIA+CL: artrite induzida por adjuvante + curcumina livre; AIA+CN: artrite induzida por adjuvante + curcumina nanoemulsificada; AIA+MTX: artrite induzida por adjuvante + metotrexato; AIA+CL+MTX: artrite induzida por adjuvante + curcumina livre + metotrexato; AIA+CN+MTX: artrite induzida por adjuvante + curcumina nanoemulsificada + metotrexato. Dados não paramétricos, teste Kruskal- Wallis e pós teste de Dunn's; resultados expressos em mediana ± intervalo de confiança. (a) Grupo com  $< 0.05$  vs grupo CONT; (b) Grupo com  $p < 0.05$  vs grupo AIA; (c) Grupo com  $p < 0.05$  vs grupo AIA+CL.

## CONCLUSÃO

A AIA não é capaz de promover alteração na quantidade de colágeno no fígado 30 dias após sua indução. A curcumina livre também não altera a quantidade de colágeno, no entanto, as formulações de nanoemulsão de curcumina e para todos os grupo tratados com MTX contendo ou não curcumina induz aumento da quantidade de colágeno. Estes achados sugerem a necessidade de uma investigação mais aprofundada sobre o uso do MTX e da curcumina na forma nanoencapsulada, para avaliar melhor a segurança dessas formulações no tratamento da artrite reumatoide. Futuros estudos devem explorar possíveis mecanismos de ação da curcumina nanoencapsulada que possam levar à fibrose, assim como variáveis experimentais que possam ter influenciado este resultado. E ainda uma avaliação de outros parâmetros que sejam também relevantes para danos hepáticos devem ser averiguados para analisar o grau de segurança para o uso do MTX.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os profissionais do laboratório de histotécnica animal e às minhas orientadoras, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nilza Cristina Buttow e M<sup>a</sup> Karile Cristina da Costa Salomão pelas instruções dos procedimentos de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

EDE VAN. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*. 2017 [cited 2024 Jan 11];44(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11710708/>

Parviz Khajehdehi, Batol Zanjanejad, Elham Aflaki, MohamadAli Nazarinia, Azad F, Malekmakan L, et al. Oral Supplementation of Turmeric Decreases Proteinuria, Hematuria, and Systolic Blood Pressure in Patients Suffering From Relapsing or Refractory Lupus Nephritis: A Randomized and Placebo-controlled Study. *Journal of Renal Nutrition* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2024 May 23];22(1):50–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21742514/>

Amalraj A, Varma K, Jacob J, Chandradhara Divya, Kunnumakkara AB, Stohs SJ, et al. A Novel Highly Bioavailable Curcumin Formulation Improves Symptoms and Diagnostic Indicators in Rheumatoid Arthritis Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Two-Dose, Three-Arm, and Parallel-Group Study. *Journal of Medicinal Food* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2024 April 24];20(10):1022–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28850308/>

SOCIETY BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. *Artrite Reumatoide*. Disponível em: <https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/artrite-reumatoide/>. Acesso em: 01 abril. 2024.