

AVALIAÇÃO DO USO DE CURCUMINA LIVRE OU NANOENCAPSULADA E METOTREXATO SOBRE O PLEXO MIOENTÉRICO DO ÍLEO DE RATOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

Jhonatan da Silva Fernandes (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Karile Cristina da Costa Salomão, Nilza Cristina Buttow (Orientadora). E-mail: jhonatan.sf15@gmail.com

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

Morfologia/Histologia

Palavras-chave: adjuvante de Freud; *curcuma longa*; intestino delgado.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR), além de afetar as articulações, pode comprometer o sistema nervoso entérico, resultando em neurodegeneração intestinal. Este estudo investigou os efeitos da curcumina livre, nanoencapsulada e do metotrexato (MTX) sobre os neurônios HuC/D e nNOS do plexo mioentérico do íleo de ratos com AR induzida por adjuvante. Os resultados mostraram que, embora a AR aumente a densidade de neurônios mioentéricos, essa alteração está associada à degeneração estrutural, evidenciada pela redução da área celular e da parede intestinal. Os tratamentos com curcumina e MTX apresentaram efeitos neuroprotetores, preservando a morfologia neuronal, com destaque para os grupos que receberam terapias combinadas. A associação de curcumina nanoencapsulada ao MTX promoveu os efeitos mais expressivos, sugerindo uma ação sinérgica entre as propriedades anti-inflamatórias da curcumina e a imunomodulação do MTX. Esses achados indicam que a curcumina constitui uma estratégia terapêutica promissora como adjuvante no controle da inflamação entérica associada à AR, com potencial para reduzir efeitos adversos dos tratamentos convencionais.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica que acomete cerca de 1% da população (Orsini *et al.*, 2023), sobretudo mulheres pós-menopausa e homens de meia idade. Além do comprometimento articular, a inflamação pode atingir o trato gastrointestinal, levando a alterações na mucosa e no sistema nervoso entérico. O metotrexato (MTX), principal fármaco no tratamento, apresenta eficácia, mas está associado a efeitos colaterais hepáticos, gastrointestinais e cardiovasculares, o que pode comprometer a adesão ao tratamento (Sugimori *et al.*, 2008). Nesse contexto, a curcumina, composta da *Curcuma longa* com ação anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora, desponta como alternativa, embora sua baixa biodisponibilidade limite o uso terapêutico. A nanoemulsão surge como estratégia para potencializar sua absorção e eficácia. Este estudo avaliou os efeitos

da curcumina livre e nanoencapsulada, isoladas ou combinadas ao MTX, sobre o plexo mioentérico do íleo de ratos com AR induzida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEM (CEUA nº. 2012070222). Foram utilizados 42 ratos albinos *Holtzman* machos (50 dias de idade, $n=6/\text{grupo}$), mantidos a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 h, com ração Nuvilab® e água *ad libitum*. Após 5 dias de ambientação, os animais foram distribuídos em sete grupos experimentais: Controle (C) – água (veículo); Artrítico (AIA) – veículo; AIA+CL – curcumina livre; AIA+CN – nanopartículas de curcumina; AIA+MTX – metotrexato; AIA+CL+MTX – curcumina livre associada a MTX; AIA+CN MTX – nanopartículas de curcumina associadas a MTX. As doses de curcumina livre ou nanoencapsulada foram de 30 mg/kg/dia e de MTX de 1 mg/kg/semana. A artrite foi induzida no dia 0 por injeção intradérmica, na pata posterior esquerda, com 100 μL de CFA contendo 5% de *Mycobacterium tuberculosis* inativadas. O edema de pata foi avaliado diariamente até o sexto dia com pletismógrafo digital, confirmando a indução da artrite. Os tratamentos iniciaram no dia 7, por gavagem, até o dia 29. No dia 30, realizou-se eutanásia com cetamina (180 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg), seguida de coleta do íleo, fixação em paraformaldeído 4% (pH 7,4) e armazenamento em PBS. Para a imunohistoquímica, a mucosa e submucosa foram removidas, obtendo-se preparados totais da túnica muscular. Foi realizada recuperação antigênica em tampão citrato-acetato a 92°C por 15 min, seguida de bloqueio com BSA 2% + soro de cabra 10%. As amostras foram incubadas por 48 h com anticorpos primários anti-HuC/D e anti-nNOS, e por 2 h com anticorpos secundários Alexa Fluor 488 e 546. Após lavagens, as lâminas foram montadas com glicerol + PBS. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (20 $\times$), capturando-se 30 campos aleatórios por animal. A densidade neuronal (neurônios/ cm^2) e a área de 100 corpos celulares por animal foram determinadas com Image Pro Plus 3.0. A análise estatística foi realizada no Statistica 7.1 e GraphPad Prism 3.1, com teste de Fisher, considerando-se $p<0,05$ como significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação morfoquantitativa do plexo mioentérico do íleo, por meio da imunomarcagem de neurônios HuC/D e nNOS, evidenciou poucas alterações significativas entre os grupos experimentais. Na densidade de neurônios HuC/D, não houve alterações quando comparado o grupo AIA com o grupo C e quanto aos tratamentos houve diferença no grupo AIA+MTX quando comparado com o grupo AIA (Figura 1.A). Em relação aos neurônios nitrérgicos (nNOS), verificou-se um aumento significativo no grupo AIA em relação ao controle, bem como aumento da densidade neuronal no grupo AIA+CN+MTX em relação ao grupo C e ao AIA+MTX. (Figura 1.B). Esses resultados demonstram que a AIA após 30 dias de indução, não foi capaz de promover alteração significativa na densidade da população geral de

neurônios, no entanto, o uso do MTX demonstrou uma redução desta população e no caso de um tempo experimental maior este medicamento poderá ter um efeito mais expressivo nesta redução da densidade neuronal. Já na subpopulação nitrérgica este aumento pode ser consequência de uma mudança de fenótipo devido ao processo inflamatório observado nesta patologia. Isso sugere que, em fases iniciais ou intermediárias da doença, a inflamação sistêmica ainda não gera perda neuronal expressiva, mas altera o fenótipo e a morfologia dessas células. Esses achados reforçam que a inflamação sistêmica da AR repercute no sistema entérico, conforme descrito por Piovezana Bossolani *et al.* (2019).

Quanto ao perfil celular dos neurônios HuC/D, constatou-se acentuada redução no grupo AIA em comparação ao controle e aos grupos tratados. Todos os tratamentos mostraram efeito protetor sobre essa população neuronal, sem diferenças relevantes entre eles (Figura 1.C). Por fim, na análise da área celular dos neurônios nNOS, o grupo AIA apresentou significativa redução em relação ao controle. Os tratamentos com CL e CN foram capazes de amenizar a redução da área do perfil neuronal, contudo ainda permaneceram com valores inferiores ao grupo controle e preservaram parcialmente a integridade neuronal, tendo menor eficácia que o MTX. Já as terapias combinadas também evidenciaram efeito neuroprotetor relevante (Figura 1-D). Destaca-se que os tratamentos combinados obtiveram melhores respostas, sugerindo efeito sinérgico entre a modulação imunológica do MTX e a ação antioxidante da curcumina, em concordância com evidências recentes sobre terapias integradas em AR (Banji *et al.*, 2011).

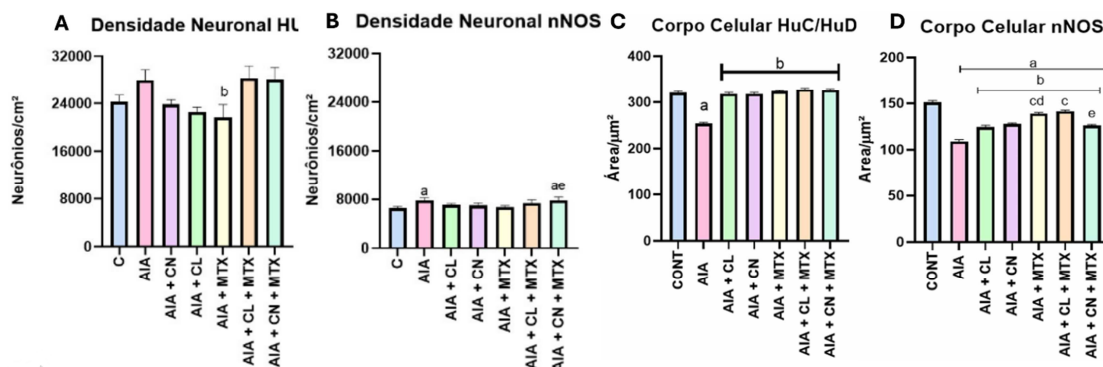


Figura 1 – Densidade e área do corpo celular de neurônios HuC/D e nNOS do plexo mioentérico do íleo de ratos Holtzman. (A) Densidade neuronal HuC/D. (B) Densidade neuronal nNOS. (C) Área do corpo celular de neurônios HuC/D. (D) Área do corpo celular de neurônios nNOS. Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$).

CONCLUSÕES

Os achados indicam que a artrite reumatoide experimental induz alterações morfológicas no sistema nervoso entérico, com especial impacto sobre os neurônios nitrérgicos. O MTX, embora eficaz clinicamente, pode reduzir a densidade neuronal, reforçando suas limitações. A curcumina, tanto na forma livre quanto nanoencapsulada, apresentou efeito protetor sobre a integridade neuronal,

especialmente no que se refere ao perfil celular, e quando associada ao MTX potencializou os efeitos benéficos, sugerindo ser uma estratégia terapêutica complementar promissora para reduzir os efeitos colaterais do MTX e preservar a homeostase neuronal entérica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Araucária pelo apoio financeiro para a realização deste projeto, por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

REFERÊNCIAS

BANJI, D. et al. Synergistic activity of curcumin with methotrexate in ameliorating Freund's Complete Adjuvant-induced arthritis with reduced hepatotoxicity in experimental animals. **Phytomedicine**, [S.l.], v. 18, n. 10, p. 880–885, 2011.

ORSINI, L. S. et al. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 1, p. 1-13, 2023.

PIOVEZANA BOSSOLANI, G. D. et al. Rheumatoid arthritis induces enteric neurodegeneration and jejunal inflammation, and quercetin promotes neuroprotective and anti-inflammatory actions. **Life Sciences**, v. 238, p. 116956, dez. 2019.

SUGIMORI, S. et al. Evaluation of small bowel injury in patients with rheumatoid arthritis by capsule endoscopy: Effects of anti-rheumatoid arthritis drugs. **Digestion**, v. 78, n. 4, p. 208–213, 2008.