



Uso de Curcumina Reduz a Produção de Colágeno Hepático Provocado pela Artrite Induzida por Adjuvante em Ratos *Holtzman*

Camila Rodrigues Thom¹, Karile Cristina da Costa Salomão², Melissa Cumani Aragão³, Gabriela Barone Volce da Silva⁴, Renata Fonseca Vianna Lopez⁵, Nilza Cristina Buttow⁶

¹Mestranda pelo Programa de Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil. Email: camilarthom@gmail.com

²Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

³Mestra pelo Programa de pós-graduação em Biociências e Fisiopatologias da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

⁴Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

⁵Docente. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil

⁶Docente do Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

Resumo: A artrite reumatoide (AR) é uma doença que causa inflamação sistêmica e pode acometer outros órgãos como o fígado. O metotrexato (MTX) é um dos medicamentos mais utilizado para o tratamento da AR principalmente devido ao seu baixo custo. No entanto, ele também pode levar a alterações hepáticas, piorando o quadro de pacientes com AR. O uso de adjuvantes vem sendo estudado para minimizar tanto o efeito da AR quanto do MTX, como é o caso da curcumina. Porém, apesar da curcumina possuir diversos efeitos benéficos, a mesma possui baixa biodisponibilidade, e uma forma de reverter essa situação, é através da formulação de nanoemulsões de curcumina. Este trabalho avaliou os efeitos do tratamento de curcumina em sua forma livre (CL), nanoemulsão de curcumina (CN) e do MTX, seja em monoterapia ou em associação em fígado de ratos Holtzman. A indução da Artrite foi realizada com o adjuvante completo de Freund, que mimetiza os efeitos da artrite, promovendo então a artrite induzida por adjuvante (AIA). O fígado desses animais foi avaliado através de cortes histológicos e corados com Picrosirius red. Nossos resultados demonstraram que tanto o uso de CL e CN em monoterapia foram eficazes na redução da produção de colágeno provocada pela AIA e o MTX, demonstrando que a curcumina pode ser um aliado no tratamento para combater efeitos provocados pela AR. Os resultados obtidos demonstraram que tanto a curcumina livre (CL) quanto a nanoemulsão de curcumina (CN), quando administradas em monoterapia, foram eficazes na redução da deposição de colágeno hepático induzida pela artrite e pelo tratamento com metotrexato (MTX). Esses achados sugerem que a curcumina, especialmente em sua forma livre, pode representar uma estratégia terapêutica promissora para mitigar os efeitos colaterais hepáticos associados à artrite reumatoide e ao uso prolongado de MTX. Assim, a utilização da curcumina, particularmente na forma livre, surge como um potencial adjuvante no manejo da AR, contribuindo para a proteção hepática e melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: *Curcuma longa*; nanoemulsões; histologia; fígado

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica de caráter autoimune, a qual afeta majoritariamente as articulações, gerando dor, desconforto, destruição das articulações e consequentemente, prejudicando a qualidade de vida de pacientes portadores da doença (1). Mas, apesar das articulações serem o principal local afetado, relatos trazem que pacientes com AR também podem desenvolver alterações sistêmicas, afetando assim, outros órgãos, como é o caso do fígado (2).

O fígado é o maior órgão interno do corpo, localizado no hipocôndrio direito e protegido pelas costelas. É um órgão dividido em duas grandes porções, a direita e esquerda, e duas porções menores centrais, quadrado e caudado (3). É um órgão composto por células chamadas hepatócitos, células de Kupffer e células de Ito, sendo esta última, localizado no espaço de Disse, e que quando ativadas, são potente células produtoras de fibras colágenas, logo, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da fibrose hepática (4).



Quanto aos tratamentos utilizados para AR, o principal medicamento é o metotrexato (MTX), uma droga pertencente a classe dos medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARD), que possui ação anti-inflamatória e reparo das articulações (5). Apesar de tudo, o MTX já foi demonstrado possuir diversos efeitos colaterais, bem como o aumento da produção de colágeno hepático (6). Pacientes com AR possuem até 23% de chance de desenvolverem fibrose hepática, e o MTX poderia exacerbar ainda mais esse efeito (7).

Tendo isso em vista, a medicina vem buscando o potencial de compostos naturais como adjuvante, que possam tanto tratar da AR como reduzir os efeitos colaterais do MTX, e a curcumina vem apresentando efeitos promissores para tal (8).

Encontrada no rizoma da *Curcuma longa*, a curcumina é utilizada na medicina chinesa a milênios para o tratamento de feridas e inflamações, devido sua ação antioxidante e anti-inflamatória (9). Porém, a mesma não possui uma boa biodisponibilidade, limitando sua ação. Uma solução para isso, seria o uso de nanoemulsões de curcumina para melhorar a biodisponibilidade da mesma (10).

Logo, este trabalho visa avaliar os efeitos da artrite induzida por adjuvante (AIA), dos tratamentos com curcumina livre, nanoemulsificada de MTX, em monoterapia e em associação, no fígado de ratos *Holtzman* quanto aos parâmetros de colágeno.

MATERIAL E MÉTODOS

As nanoemulsões foram preparadas pela Faculdade de Farmácia da USP (Ribeirão Preto), e as mesmas foram constituídas de duas fases, uma oleosa, contendo triglicerídeos de cadeia média, fosfatidicolina de ovo e óleo de semente de uva. E uma fase aquosa contendo água e polissorbato 80. Ambas as fases foram aquecidas (separadamente), e feita a solubilização total da fosfatidicolina, foi adicionado a curcumina.

Referente aos animais, o projeto foi aprovado pelo comitê de ética através do protocolo de número 2012070222. Foram adquiridos 42 ratos *Holtzman*, que foram divididos em 7 grupos em um n=6, como descrito na tabela 1. Os animais passaram pelo período de adaptação claro/escuro, receberam água e ração *ad libitum*. A AIA foi induzida no dia 0 e a partir do 7 dia se iniciou os tratamentos.

Tabela 1. Divisão dos grupos de tratamento

Grupos	Tratamento
CONT	2,5ml/água/dia
AIA	2,5ml/água/dia
AIA+CL	30mg/kg/dia
AIA+CN	30mg/kg/dia
AIA+MTX	1mg/kg/semana
AIA+MTX+CN	1mg/kg/semana e 30mg/kg/dia
AIA+MTX+CL	1mg/kg/semana e 30mg/kg/dia

Grupo controle (CONT), grupo com artrite induzida por adjuvante (AIA), grupo AIA tratado com curcumina livre (AIA+CL), grupo AIA tratado com curcumina nanoemulsificada (AIA+CN), grupo AIA tratado com MTX (AIA+MTX), grupo AIA tratado com MTX e curcumina livre (AIA+MTX+CL) e grupo AIA tratado com MTX e curcumina nanoemulsificada (AIA+MTX+CN).

O período experimental teve duração de 30 dias. Sendo que, o dia zero foi realizada a indução da artrite através do Adjuvante completo de Freund, que é composto pelo *Mycobacterium tuberculosis* inativado pelo calor. Foi aplicado por meio de injeção intradérmica na pata posterior esquerda dos animais. Os tratamentos se iniciaram no 7º dia e se mantiveram até o 29º dia. A eutanásia foi realizada no 30º dia, no qual os animais foram pesados e receberam dose letal de ketamina e xilazina. Foi feito então a laparotomia e a retirada do fígado. O órgão foi limpo com PBS e fixado em paraformaldeído.

Após fixado, o fígado passou pelo processo de desidratação, feito com uma bateria crescente de álcoois; clarificação, através do uso de xilol; incluídos em parafina e enfim, feito os cortes histológicos. Foram feitos cortes semi-seriados de 5 µm (micrótomo Leica®) que posteriormente foram submetidas a coloração de *Picrosirius red* para quantificação de colágeno tipo I, tipo III e total (soma do colágeno I e III). Foram capturadas 35 campos aleatórios por animal, no qual foi considerado a porcentagem da área contendo colágeno em relação a área total. As imagens foram capturadas com o uso de um filtro polarizador (Nikon C-SP 757253 Japan) e microscópio óptico (Nikon® Eclipse 80i). Todas as imagens foram capturadas em objetiva de 40x e analisadas no software *Image pro-plus*.

Para as análises estatísticas, foram utilizados os programas *Statistica 12* (teste de Fisher) e o programa *Prism 8.01* para criação dos gráficos. Valores $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos

RESULTADOS E DISCUSSÃO



A figura 1 mostra a proporção de colágenos do tipo I, III e total. Podemos observar que a análise de colágeno do tipo I e total, mostrou um aumento significativo nos grupos AIA, AIA+MTX, AIA+CL e AIA+CN. A fibrose hepática já foi relatada em pacientes com artrite reumatoide (AR), sendo que o metotrexato (MTX) pode agravar esse quadro (7). Dentre os mecanismos envolvidos, destaca-se a progressão da doença hepática associada à ativação das células de Ito (também conhecidas como células estreladas hepáticas), as quais são responsáveis pela síntese de colágeno. A ativação dessas células pelo MTX pode resultar no aumento do depósito de matriz extracelular, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento da fibrose hepática. (11).

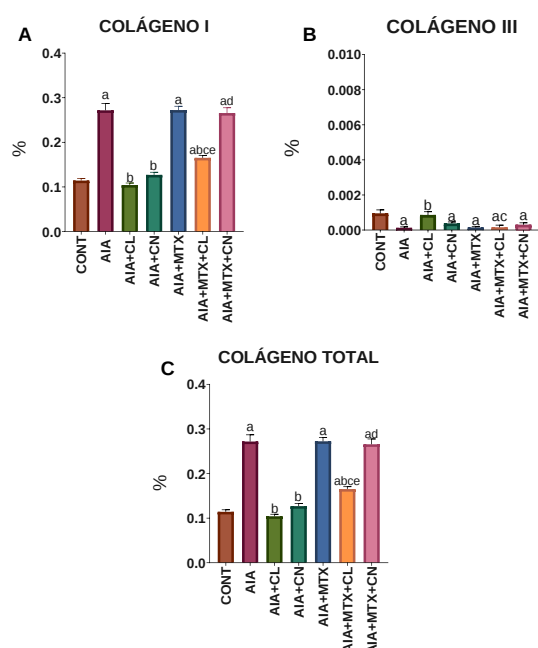


Figura 1. Porcentagem de colágeno tipo I (A), II (B) e III (C)

No entanto, quando utilizamos a monoterapia com CL e CN, observa-se que houve redução do depósito de colágeno, inibindo então a fibrogênese hepática, resultados que corroboram com outras pesquisas. Experimentos com curcumina já demonstraram que a mesma é capaz de inibir ativação e proliferação das células de Ito (12). Testes *in vitro* demonstram também que a curcumina é capaz de atuar a nível gênico, reduzindo a produção de colágeno tipo I.

Apesar dos efeitos positivos do tratamento isolado da CL e CN para redução de colágeno, a associação entre ambas com o MTX não promoveu o mesmo desfecho quanto a monoterapia. Sendo que a curcumina livre quando associada ao MTX foi mais eficiente do que na forma de nanoemulsão. Demonstrando uma possível interação entre o medicamento e o adjuvante,

principalmente da CN não sendo capazes de reduzir o aumento da produção de colágeno causada pela MTX.

CONCLUSÃO

Os dados indicam que a AR induzida e o tratamento com MTX aumentam a deposição de colágeno hepático, favorecendo a fibrose. A curcumina, tanto na forma livre (CL) quanto nanoemulsionada (CN), em monoterapia, foi eficaz na redução desse acúmulo, provavelmente por inibir a ativação das células de Ito. No entanto, sua associação com o MTX não apresentou o mesmo efeito protetor, especialmente na forma nanoemulsionada, sugerindo uma possível interação negativa entre os compostos. Esses achados destacam o potencial da curcumina como adjuvante, mas reforçam a necessidade de mais estudos sobre sua combinação com o MTX.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao laboratório de Inflamação da Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao laboratório de Histotécnica animal da UEM e ao laboratório de Bacteriologia médica da UEM.

REFERÊNCIAS

1. Venetsanopoulou AI, Alamanos Y, Voulgari P V., Drosos AA. Epidemiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis Development. *Mediterr J Rheumatol* [Internet]. 2023 Dec;34(4):404. Available from: http://mjrheum.org/assets/files/792/file525_1799.pdf
2. Das S, Padhan P. An Overview of the Extraarticular Involvement in Rheumatoid Arthritis and its Management. *J Pharmacol Pharmacother* [Internet]. 2017 Jul 1;8(3):81–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29081614>
3. Cotoi CG, Quaglia A. Normal Liver Anatomy and Introduction to Liver Histology. In: *Textbook of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*. Springer International Publishing; 2016. p. 609–12.
4. Enzan H, Himeno H, Hiroi M, Kiyoku H, Saibara T, Onishi S. Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microsc Res Tech*. 1997;39(4):336–49.
5. Zhao Z, Hua Z, Luo X, Li Y, Yu L, Li M, et al. Application and pharmacological



- mechanism of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2022;150(March):113074. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113074>
6. Ezhilarasan D. Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms. Vol. 458, *Toxicology*. Elsevier Ireland Ltd; 2021.
 7. Rouhi A, Hazlewood G, Shaheen AA, Swain MG, Barber CEH, Rouhi A, et al. Review Prevalence and risk factors for liver fibrosis detected by transient elastography or shear wave elastography in inflammatory arthritis: a systematic review. Vol. 35, *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2017.
 8. Deng W, Du H, Liu D, Ma Z. Editorial: The Role of Natural Products in Chronic Inflammation. *Front Pharmacol*. 2022 Apr 29;13(April):1–3.
 9. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur J Cancer*. 2005;41(13):1955–68.
 10. Teo A, Goh KKT, Lee SJ. Nanoparticles and Nanoemulsions. In: *Functional Foods and Dietary Supplements*. Wiley; 2014. p. 405–35.
 11. Wang W, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2018;158:502–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.027>
 12. Bruck R, Ashkenazi M, Weiss S, Goldiner I, Shapiro H, Aeed H, et al. Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. *Liver Int*. 2007 Apr;27(3):373–83.