

MANIFESTAÇÃO EXTRAINTestinal DA RETOCOLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR TNBS EM RATOS WISTAR E A RESPOSTA AO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA

Lucimara Rodrigues Carobeli¹, Débora dos Anjos Weber Luz², Camila Quaglio Neves², Odinei Hess Gonçalves³, Ciomar Aparecida Bersani Amado⁴, Maria Raquel Marçal Natali⁵

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá - UEM. Bolsista PIBIC/CNPq. lucimaracarobeli@gmail.com

²Doutoranda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá-UEM – Bolsista CAPES

³Docente, Departamento Acadêmico de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

⁴Docente, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá-UEM

⁵Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá-UEM. mrmnatali@gmail.com

RESUMO

Manifestações extraintestinais de doenças inflamatórias intestinais são frequentes sendo o fígado um dos seus principais alvos. Terapias com anti-inflamatórios naturais são uma alternativa aos tratamentos convencionais e formulações com nanopartículas melhoram a biodisponibilidade. O objetivo deste trabalho foi constatar a manifestação extraintestinal da doença inflamatória intestinal no fígado e verificar se o tratamento com nanopartículas de curcumina previne tais manifestações. Ratos com colite experimental induzida por enema de ácido trinitrobenzenosulfônico e ratos não colíticos que receberam enema com salina, foram tratados com água ou nanopartículas de curcumina (25mg/kg) por 7 dias. Após o período experimental realizou-se a eutanásia retirando o fígado para pesagem e realização de análises do estado inflamatório por meio de detecção da atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase e do estado oxidativo, por meio da detecção da atividade das enzimas glutathione S-transferase, catalase e superóxido dismutase e dos níveis de glutathione reduzida e peroxidação lipídica. A colite experimental foi capaz de reduzir o peso do fígado, aumentar a atividade da mieloperoxidase e da N-acetilglucosaminidase, reduzir a atividade da catalase e da glutathione S-transferase, comparado ao grupo controle ($p < 0,5$), indicando quadro de inflamação e estresse oxidativo. O tratamento com nanopartículas de curcumina foi capaz de evitar o surgimento destas alterações comparado ao grupo não tratado ($p < 0,05$). Conclui-se que o fígado apresentou alterações bioquímicas decorrentes da colite experimental e o tratamento com as nanopartículas de curcumina mostrou-se eficaz na prevenção destas alterações.

PALAVRAS-CHAVE: Colite; Estresse oxidativo; Fígado.

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs), que incluem a doença e de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU), possuem a desregulação imunológica como principal etiologia (FARZAEI et al, 2015). Muitos pacientes relatam a ocorrência de manifestações extraintestinais (MEI) (VAVRICKA et al, 2015) devido ao rompimento das junções formadoras da barreira intestinal, principalmente na RCU, levando ao extravasamento de infiltrados inflamatórios (MOURA et al, 2016) e até mesmo de bactérias intestinais para outros órgãos do corpo (VAVRICKA et al, 2015).

Entre os órgãos mais acometidos pela MEI estão a pele, articulações, olhos, trato hepatobiliar, rins, pulmões e sistema vascular (VAVRICKA et al, 2015).

A curcumina é um pigmento rico em polifenóis extraído da *Curcuma longa*, apresentando propriedades anti-inflamatórias (JACOB et al, 2007) e antioxidantes (KUMAR et al, 2007). Porém, *in natura* possui baixa solubilidade e biodisponibilidade.

O encapsulamento em nanopartículas visa aumentar sua disponibilidade no organismo e permitir o uso de doses menores, otimizando o tratamento (ROCHA et al, 2014). Como o processo inflamatório está envolvido nas MEI o uso de um produto natural anti-inflamatório e antioxidante vem ser uma alternativa na prevenção dos danos sistêmicos gerados pela DII.

O objetivo deste estudo foi avaliar as MEI da DII no fígado, por meio da pesagem do órgão, análises do estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios no tecido e verificar

se o tratamento com nanopartículas de curcumina via gavagem, foi capaz de prevenir estes danos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UEM (nº 22342171116). Utilizou-se 40 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), com 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UEM, distribuídos em 5 grupos (n=8): CC: Controle; SA: enema salina, gavagem água; SN: enema salina, gavagem nanopartículas de curcumina; TA: enema TNBS, gavagem água e TN: enema TNBS, gavagem nanopartículas de curcumina.

A colite experimental foi induzida via enema com solução contendo 0,3 ml de ácido trinitrobenzenosulfônico (15 mg) em 0,3 ml de etanol 30% (MORRIS et al, 1989) e nos grupos salina realizou-se enema com 0,6 ml de solução salina 0,9%. Durante sete dias foi administrado via gavagem uma dose de 25 mg/kg de nanopartículas de curcumina nos grupos SN e TN e 0,5 mL de água nos grupos SA e TA. Após esse período os animais foram eutanasiados para coleta do fígado.

Após pesagem, o órgão foi lavado em PBS, congelado em nitrogênio líquido e conservado em freezer -80 °C. A reação para quantificação da atividade da MPO foi realizada na presença de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio e interrompida por acetato de sódio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm. A atividade da NAG foi detectada na presença de tampão citrato e solução de 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminidase sendo interrompida com tampão glicina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O)/mg de proteína para ambas as análises.

A reação para determinar a atividade da enzima glutationa S-transferase (GST) foi realizada na presença de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e GSH diluídos em tampão fosfato e potássio. A leitura realizada em espectrofotômetro a 340 nm, usando o coeficiente de extinção de 9.6 mM⁻¹cm⁻¹. Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi detectada em uma solução contendo tampão TRIS-HCL e EDTA diluído em Tris, água milli-Q e H₂O₂ 30%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm e os resultados expressos em μmol/min/mg de proteína.

Para a detecção da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi utilizado tampão TRIS-HCl EDTA misturado ao pirogalol sendo a reação interrompida com ácido clorídrico. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (405 nm). Os resultados foram comparados com o controle (tampão TRIS-HCl EDTA com pirogalol sem incubação + média sem amostra sem incubação), sendo este valor igual a 100%. A quantidade de proteína que inibiu a reação em 50% (IC₅₀) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

Os níveis de glutationa reduzida (GSH) foram determinados na presença do ácido tricloroacético 12% e tampão TRIS-HCl. A reação foi iniciada com 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico, com leitura em espectrofotômetro (412 nm). Os valores individuais foram interpolados em uma curva padrão de GSH, expressos em μg GSH/g tecido.

Os níveis de peroxidação lipídica (LOOH) foram determinados por meio do ensaio de oxidação de ferro II na presença de xilenol laranja (JIANG et al., 1991) em meio reacional. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (560 nm), usando o coeficiente de extinção de 4.3 mm⁻¹cm⁻¹ e os resultados expressos em mmol/g de tecido.

As análises estatísticas foram realizadas pelo software Graph Pad Prism® 5.0. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Sminov. Aplicou-se a análise de Variância (One-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão com nível de significância de 5% (p < 0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A colite induzida por TNBS em ratos Wistar promoveu a redução significativa do peso do fígado, sendo detectado um quadro inflamatório pelo aumento da atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase comparados ao grupo controle. O tratamento com as nanopartículas de curcumina foi capaz de prevenir estas alterações nos três parâmetros analisados (Tabela 1).

Tabela 1. Peso do fígado (g) e parâmetros inflamatórios (MPO e NAG) analisados no fígado dos ratos dos grupos controle (C), salina-água (SA), salina-nanopartículas de curcumina (SN), TNBS-água (TA) e TNBS- nanopartículas de curcumina (TN).

	PESO DO	MPO	NAG
	FÍGADO(g)	D.O/mg proteína	D.O/mg proteína
CC	12,62±0,60	0,36±0,12	3,40±0,35
SA	11,91±0,77	0,32±0,07	3,10±0,65
SN	11,60±0,76	0,41±0,11	2,93±0,66
TA	8,64±0,63 ^{a,b,c}	1,95±0,70 ^{a,b}	8,93±4,68 ^{a,b,c}
TN	11,05±0,50 ^d	0,37±0,07 ^d	3,25±0,77 ^d

MPO- mieloperoxidase, NAG- N-acetilglucosaminidase. ^a p<0,05 comparado ao grupo CC; ^b p<0,05 comparado ao grupo SA; ^c p<0,05 comparado ao grupo SN; ^d p<0,05 comparado ao grupo TA. One way Anova e pós-teste de Tukey, n=5. Resultados expressos em média ± desvio padrão.

A MPO é uma enzima encontrada principalmente nos neutrófilos e a NAG nos lisossomas dos macrófagos, sendo ambos marcadores de inflamação tecidual. A capacidade anti-inflamatória da curcumina deve-se a alta capacidade de interação com várias moléculas envolvidas nas vias inflamatórias (FARZAEI et al, 2015).

Entre os parâmetros indicadores de estresse oxidativo houve redução da atividade da CAT e GST comparado ao grupo CC (p<0,05). O tratamento com as nanopartículas de curcumina foi capaz de prevenir estas alterações, protegendo o órgão de um quadro de estresse oxidativo, comparado ao grupo não tratado (p<0,05) (Tabela 2).

Tabela 2. Componentes antioxidantes analisados no fígado dos ratos dos grupos controle (C), salina-água (SA), salina-nanopartículas de curcumina (SN), TNBS-água (TA) e TNBS-nanopartículas de curcumina (TN).

	CAT	SOD	GST	GSH	LOOH
	µmol/min/mg de proteína	U SOD/mg ptn	Mmol/min/mg tecido	µg GSH/mg tecido	mol/g tecido
CC	0,17±0,017	0,17±0,027	0,11±0,020	266,9±19,99	47,57±1,52
SA	0,15±0,031	0,17±0,041	0,11±0,015	253,4±17,30	48,05±0,80
SN	0,15±0,023	0,17±0,019	0,11±0,012	252,7±11,11	48,66±1,51
TA	0,12±0,024 ^a	0,15±0,017	0,05±0,036 ^{a,b,c}	251,2±12,90	47,17±1,88
TN	0,14±0,021 ^d	0,18±0,018	0,09±0,008 ^d	257,6±18,18	45,76±2,73 ^c

^a p<0,05 comparado ao grupo CC; ^b p<0,05 comparado ao grupo SA; ^c p<0,05 comparado ao grupo SN; ^d p<0,05 comparado ao grupo TA. One way Anova e pós-teste de Tukey, n=5. Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Entre os mecanismos antioxidantes da curcumina destaca-se sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos, como ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais nitrito.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os danos gerados no colo após a indução da colite experimental com TNBS gerou uma manifestação extraintestinal com danos ao fígado dos ratos. Estes danos foram

configurados pela perda de peso do órgão, aumento da atividade das enzimas inflamatórias MPO e NAG e alteração na atividade das enzimas antioxidantes CAT e GST. O tratamento com nanopartículas de curcumina minimizou significativamente tais alterações, protegendo o fígado das injúrias causadas pela colite experimental.

REFERÊNCIAS

FARZAEI, M.H.; RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. The role of dietary polyphenols in the management of inflammatory bowel disease. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.16, n.3, p.196-210, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25601607>. Acesso: 05 ago 2019.

JACOB, A.; WU, R.; ZHOU, M.; WANG, P. Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR- γ activation. **PPAR Research**, 2007. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ppar/2007/089369/abs/>. Acesso: 04 ago 2019.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n.10, p. 853-6, 1991. Disponível em: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/BF02536169>. Acesso: 05 ago 2019.

KUMAR D.; MALIK, F.; BEDI, P.M.; JAIN, S. 2, 4-Diarylpyrano [3, 2-c] chromen-5 (4H)-ones as Antiproliferative Agents. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.64, n.5, p.399-409, 2016. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/64/5/64_c15-00958/_article/-char/ja/. Acesso: 05 ago 2019.

MORRIS, G. P., et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v.96, n.3, p.795-803, 1989. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016508589800794>. Acesso: 04 ago 2019.

MOURA, F.A., et al. Colonic and Hepatic Modulation by Lipoic Acid and/or N-Acetylcysteine Supplementation in Mild Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sodium Sulfate in Rats. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, v. 2016: 4047362, p.1-18, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/4047362/abs/>. Acesso: 05 ago de 2019.

ROCHA, B.A. et al. Curcumin encapsulated in poly-L-lactic acid improves its anti-inflammatory efficacy in vivo. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v.2, n.4, p.62-73, 2014. Disponível em: http://www.netjournals.org/z_AMPR_14_029.html. Acesso: 04 ago 2019.

VAVRICKA, S. R. et al. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.21, n.8, p. 19982-1992, 2015. Disponível em: <academic.oup.com/ibdjournal/article/21/8/1982/4602969>. Acesso: 05 ago 2019.