

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE  
CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE –  
MESTRADO/DOUTORADO

**ANA CAROLINE BARBOSA RETAMEIRO**

**EFEITOS DO TRATAMENTO DA CURCUMINA (*CURCUMA LONGA*)  
ASSOCIADA À PREDNISONA EM RATAS *WISTAR* EM PROCESSO DE  
ENVELHECIMENTO COM ARTRITE REUMATOIDE**

CASCAVEL-PR  
(abril /2024)

**ANA CAROLINE BARBOSA RETAMEIRO**

**EFEITOS DO TRATAMENTO DA CURCUMINA (*CURCUMA LONGA*)  
ASSOCIADA À PREDNISONA EM RATAS *WISTAR* EM PROCESSO DE  
ENVELHECIMENTO COM ARTRITE REUMATOIDE**

TESE apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Doutorado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biociências e Saúde.

Fatores que Influenciam a Morfofisiologia  
Orgânica

ORIENTADORA: Lucinéia de Fátima  
Chasko Ribeiro

CASCADEL-PR  
(abril/2024)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Barbosa Retameiro, Ana Caroline

Efeitos do tratamento da curcumina (Curcuma longa) associada à prednisona em ratas Wistar em processo de envelhecimento com artrite reumatoide. / Ana Caroline Barbosa Retameiro; orientadora Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro; coorientadora Taciane Stein Leal. -- Cascavel, 2024.

98 p.

Tese (Doutorado Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em BioCiências e Saúde, 2024.

1. Artrite. 2. morfometria. 3. junção neuromuscular. 4. imuno-histoquímica. I. Chasko Ribeiro, Lucinéia de Fátima, orient. II. Stein Leal, Taciane, coorient. III. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Reitoria

CNPJ 78.680.337/0001-84

Rua Universitária, 1619, Jardim Universitário

Tel.: (45) 3220-3000 - Fax: (45) 3225-4590 - www.unioeste.br

CEP: 85819-110 - Cx. P.: 701

Cascavel - PARANÁ



## **ANA CAROLINE BARBOSA RETAMEIRO**

Efeitos do tratamento da curcumina (*Curcuma longa*) associada à prednisona em ratas Wistar em processo de envelhecimento com artrite reumatoide.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências e saúde, área de concentração Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde, linha de pesquisa Fatores que influenciam a morfofisiologia orgânica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente



LUCINEIA DE FATIMA CHASKO RIBEIRO

Data: 22/04/2024 10:28:28-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador(a) - Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Documento assinado digitalmente



ROSE MEIRE COSTA

Data: 22/04/2024 10:03:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rose Meire Costa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Documento assinado digitalmente



RAFAEL ANDRADE MENOLLI

Data: 22/04/2024 10:58:28-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rafael Andrade Menolli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Documento assinado digitalmente



KATYA NALIWAIKO

Data: 21/04/2024 20:30:38-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Katya Naliwaiko

Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Documento assinado digitalmente



GUSTAVO PETRI GUERRA

Data: 15/04/2024 07:38:27-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Gustavo Petri Guerra

Universidade Federal do Pampa

(UNIPAMPA)

Cascavel, 12 de abril de 2024

## DEDICATÓRIA

Dentro das capacidades e poderes manifestados por seres que viveram e sobreviveram neste planeta, a consciência se manifestou possibilitando a reflexão sobre memórias e formas anteriormente capturadas poeticamente como lendas e mitos de todas as espécies. Então, a coisa mais poderosa que possuímos, penso eu, é a capacidade de pensar e correlacionar informações de forma a compreender, dentro das nossas limitações, a riqueza da realidade ao nosso redor.

Nós poderíamos viver em uma ilha plácida de ignorância no meio de mares obscuros tomados pelo infinito do universo, sem viajar muito longe, nos mantendo na segurança do desconhecido. No entanto, as ciências, cada uma avançando em sua própria direção, nos lançou a luz e mostrou a realidade que, muitas vezes pode ser aterrorizante, devido a percepção da nossa posição em meio a grandeza, pequenez, infinitude e finitude de onde vivemos. Ao mesmo tempo, nos abre muitas perspectivas para entendermos um pouco mais sobre nós, e sobre a vastidão tão diversa em que estamos inseridos.

Dedico este estudo à luz, à capacidade de pensar, à ciência.

*“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca,  
não aprendo nem ensino.”*

Paulo Freire.

## AGRADECIMENTOS

A imaginação pode ser algo singular, mas a realização dos nossos sonhos é sempre resultado de um trabalho coletivo. Com este sonho não foi diferente, tive muita ajuda, aprendizado, participação, carinho e suporte até aqui. Portanto, agradeço primeiramente à minha família: minha mãe, Joventina de Jesus Barbosa Retameiro, meu pai, Luiz Carlos Retameiro, minha irmã, Bruna Barbosa Retameiro e à minha avó Judith Rosa de Jesus, mulher forte e guerreira, que partiu no primeiro ano desta jornada, mas sempre esteve presente, me dando forças, através de memórias únicas que foram criadas em todos os anos em que viveu ao nosso lado.

Agradeço também à minha orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, à minha primeira orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Célia Cristina Leme Beu e as Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup>: Marcia Miranda Torrejais, Angélica Soares e Rose Meire Costa, ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Gladson Ricardo Flor Bertolini e à Dr<sup>a</sup> Taciane Stein, por também terem participado do meu processo de orientação na graduação e na pós-graduação.

Expresso, ainda, minha imensa gratidão à todas as professoras e professores que tive ao longo da vida, em especial à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Tereza Bittencourt Guimarães, por todos os ensinamentos e por sempre dar apoio e suporte para todos seus alunos, em todos os momentos. Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Eliseu Vieira Dias, que nos ensinou sobre os mistérios do universo e do cosmos, retornou para ele no início deste ano, e estará para sempre em nossas memórias.

Agradeço, ainda, à Celeste da Rocha Paiva, à Graselha e toda a equipe do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, ao Jurandyr Pimentel Neto, às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Katya Naliwaiko, Carolina Panis e Thais Soprani, aos Prof<sup>s</sup> Dr<sup>s</sup> Adriano Polican Ciena e Rafael Menoli, pelo apoio técnico e científico. Enfim, a todos os meus mestres: obrigada por dedicarem seu tempo, paciência e sabedoria a mim e a diversas outras pessoas, tornando possível o processo de aprendizado.

Ressalto, também, minha eterna gratidão a todos que fizeram parte e me auxiliaram no processo deste trabalho, seja de forma técnica, sendo minhas amigas e amigos ou ambos: Taciane Stein, Suellen Scarton e Bebê Ísis

Scarton, Diego Francis, Carolina De Toni, Sabrina Menegon, Aline Reginato, Ana Luiza Peretti, Caroline Friedrich, Milara Moi, Beatriz Daudt, Nathan Bezerra, Renan Crespi, Laís Panno, Rafaela Bremm, Rafaella Lima, Jean Vetorazzi, Pâmela Silva, Alana Ludemila, Aldair Casagrande, Hellen Rambo, Fernanda Eduarda, Mylena Campos, Bárbara Zanardini, Leanna Macarini, Juliana Souza, Thais Schnauffer, Lilian Pradal, Edicléia Freitas, Flávia Heloísa, Gabriella Capellaro, Fernanda Teixeira, Letícia Massochim, Cristiane Marcon, amigos do Muay Thai e todos que dividem ou já dividiram o espaço do laboratório comigo. Obrigada por sempre estarem presentes em minha vida, em momentos bons e ruins, de trabalho e de descontração, me aceitarem como eu sou e tornarem tudo mais leve em todas as circunstâncias.

Agradeço, também, aqueles que não falam nossa língua, mas que entendem perfeitamente a linguagem do amor incondicional: meus animais de estimação. Em especial à minha filha felina, Serafine, que nos deixou no início deste ano, após 17 anos de companheirismo e carinho em todos os momentos.

Por fim, a todos que estiveram presentes direta ou indiretamente ao longo destes anos: MUITO OBRIGADA!

*“Se consegui enxergar além, foi porque pude me apoiar em ombros de gigantes”*

*Isaac Newton.*

## RESUMO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória, autoimune e sistêmica que tem maior prevalência em mulheres na faixa etária entre 40 e 50 anos de idade, e afeta, principalmente, articulações sinoviais e estruturas periarticulares. O tratamento padrão inclui o uso de glicocorticoides, dentre estes, a prednisona (PD), que possui inúmeros efeitos colaterais associados como: distúrbios gastrointestinais, cardiovasculares, endócrinas, neuropsiquiátricas, dermatológicas, oculares e imunológicas. Sendo assim, terapias alternativas, incluindo o uso de suplementação com fitoterápicos, como a cúrcuma (CM), têm sido testadas, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiartríticas. No presente trabalho, analisamos o efeito da suplementação com CM no tratamento com PD na funcionalidade do membro pélvico, aspectos morfológicos, inflamatórios e imunológicos da articulação tíbio-femoral e suas estruturas periarticulares e nos aspectos histomorfométricos e imuno-histoquímicos do músculo reto femoral. Para isso, trinta ratas *Wistar* com 18 meses de idade foram distribuídas em seis grupos: controle (CG), artrite (AG), artrite CM (AC), artrite PD dose baixa (APDB), artrite PD dose alta (APDA) e artrite PD dose baixa e CM (APDBC). A AR experimental foi induzida com injeção de Completo Adjuvante de *Freund* na cavidade da articulação tíbio femoral direita. O tratamento com PD (2 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia) e CM (100 mg/kg/dia), pelo método de gavagem, foi administrado por 14 dias consecutivos. Os aspectos funcionais de força de preensão, limiar nociceptivo, propriocepção e capacidade articular, foram avaliados no membro pélvico; as avaliações imunológicas, imuno-histoquímicas e histomorfométricas foram realizadas no plasma sanguíneo, linfonodo poplíteo, músculo reto femoral e articulação tíbio femoral, respectivamente. Para a análise estatística foi utilizado o teste de modelos lineares generalizados, no programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS). O nível de significância considerado foi de  $p=0,05$ . Os grupos AC e APDB tiveram melhora na força de preensão e função motora. Quando comparados com GC, AC e APDBC tiveram efeitos positivos nas concentrações de lipoperoxidação ( $p=0,2$ ;  $p=0,69$ ), fator de necrose tumoral  $\alpha$  ( $p=0,080$ ;  $p=0,346$ ) e migração leucocitária ( $p=0,013$ ). Nos aspectos morfológicos e semiquantitativos da articulação tíbio femoral, aspectos inflamatórios das estruturas e musculatura

periarticulares, AC e APDBC tiveram os resultados mais promissores. Em relação a análise histomorfométrica e imuno-histoquímica do musculo reto femoral, APDBC apresentou os melhores aspectos morfológicos ( $p < 0,0001$ ). Sendo assim, foi possível concluir que a suplementação de 100 mg/kg/dia de CM, no tratamento com sub dose de 2mg/kg/dia de PD restaurou a capacidade funcional, aspectos inflamatórios, imunológicos e histomorfométricos em ratas idosas com AR experimental, se assemelhando a dose padrão do medicamento utilizado no tratamento da doença.

Palavras-Chave: junção neuromuscular; imuno-histoquímica; fator de necrose tumoral; morfometria, tumérico.

## ABSTRACT

### **Title: Effects of Curcumin (*Curcuma longa*) Treatment Associated with Prednisone in Aging Wistar Rats with Rheumatoid Arthritis.**

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory, autoimmune and systemic disease that is more prevalent in women aged between 40 and 50 years old, and mainly affects synovial joints and periarticular structures. Standard treatment includes the use of glucocorticoids, including prednisone (PD), which has numerous associated side effects such as: gastrointestinal, cardiovascular, endocrine, neuropsychiatric, dermatological, ocular and immunological disorders. Therefore, alternative therapies, including the use of supplementation with herbal medicines, such as curcumin (CM), have been tested, due to its anti-inflammatory, antioxidant and antiarthritic properties. In the present work, we analyzed the effect of CM supplementation in PD treatment on the functionality of the hind paw, morphological, inflammatory and immunological aspects of the tibiofemoral joint and its periarticular structures and on the histomorphometric and immunohistochemical aspects of the rectus femoris muscle. For this, thirty 18-month-old female Wistar rats were distributed into six (APLD), arthritis PD high-dose (APHD) and arthritis PD low-dose and CM (APLDC). The experimental RA was induced by a complete Freund's adjuvant injection (CFA) into the right tibiofemoral joint cavity. The treatment with PD (2mg/kg/day and 10mg/kg/day) and CM (100mg/kg/day), using gavage method, was performed for 14 consecutive days. The functional aspects of grip strength, nociceptive threshold, proprioception and joint capacity, were evaluated in the pelvic limb; immunological, immunohistochemical and histomorphometric evaluations were performed in blood plasma, popliteal lymph node, rectus femoris muscle and tibio femoral joint, respectively. For statistical analysis, the generalized linear model test was used in the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) program. The significance level was set as  $p=0.05$ . The groups AC and APLD had improvements in grip strength and motor function. When compared to GC, AC and APLDC had positive effects on the concentrations of lipoperoxidation ( $p=0.2$ ;  $p=0.69$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  ( $p=0.080$ ;  $p=0.346$ ) and leukocyte migration ( $p=0.013$ ). In the morphological

and semiquantitative aspects of the tibiofemoral joint, inflammatory aspects of the periarticular structures and muscles, AC and APLDC had the most promising results. Regarding histomorphometric and immunohistochemical analysis of the rectus femoris muscle, APDBC showed the best morphological aspects ( $p < 0.0001$ ). Therefore, it was possible to conclude that supplementation with 100 mg/kg/day of CM, in treatment with low dose of 2mg/kg/day of PD restored functional capacity, inflammatory, immunological and histomorphometric aspects in old female rats with experimental RA, resembling the standard dose of the medication used to treat the disease.

Key-words: neuromuscular junction; immunohistochemistry; tumor necrosis factor; morphometry; turmeric.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Resultados do teste de tempo de elevação da pata em segundos...	47
Figura 2: Resultados dos testes funcionais de força de preensão, plano inclinado e <i>Von Frey</i> , entre grupos ao longo das avaliações e dentro dos grupos ao longo das avaliações.....	50
Figura 3: Resultados do edema em centímetros.....	52
Figura 4: Resultados da lipoperoxidação e inflamação microscópica.	53
Figura 5: Fotomicrografias das articulações tíbio-femorais de ratas <i>Wistar</i> fêmeas de 18 meses, coradas com HE e resultados morfológicos semiquantitativos.....	56
Figura 6: Fotomicrografias das estruturas periarticulares das articulações tíbio-femorais de ratas <i>Wistar</i> fêmeas de 18 meses, coradas em HE, e resultados morfológicos semiquantitativos.....	58
Figura 7: Fotomicrografias do músculo Reto Femoral de ratas <i>Wistar</i> fêmeas, de 18 meses em secção transversal coradas com HE e médias de danos no tecido muscular do músculo Reto Femoral.....	60
Figura 8: Fotomicrografias do músculo Reto Femoral de ratas <i>Wistar</i> fêmeas de 18 meses em secção transversal coradas com HE e morfometria do fuso muscular.....	62
Figura 9: Resultado da análise morfométrica do músculo Reto Femoral.....	64
Figura 10: Fotomicrografias do músculo Reto Femoral de ratas <i>Wistar</i> fêmeas de 18 meses em secção transversal coradas com <i>picrosirius red</i> e quantificação de colágeno.....	66
Figura 11: Fotomicrografias e análise morfométrica da região pós-sináptica da junção neuromuscular com imunomarcação.....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Scores para avaliação morfológica da articulação tíbio-femoral e estruturas periarticulares.....41

Tabela 2: Massa corpórea em gramas (g) na primeira e segunda semanas de experimento e a diferença da pesagem (g) entre os dois períodos.....45

## LISTA DE ABREVIATURAS

a	Valor de escore
AC	Artrite Curcumina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ADH	Hormônio Antidiurético
AG	Grupo Artrite
AP-1	Proteína ativadora 1
APHD	Artrite Prednisona Dose Alta
APLD	Artrite Prednisona Dose Baixa
APLDC	Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina
AR	Artrite Reumatoide
ARE	Elemento de resposta antioxidante
BSA	Soro Albumina Bovino
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
CFA	Completo Adjuvante de <i>Freund</i>
CG	Grupo Controle
CM	Curcumina
Cm	Centímetros
COX-2	Ciclooxigenase-2
CRH	Fator Liberador de Corticotrofina
CRP	Proteína C Reativa
DMARDs	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Teste de reações antígeno-anticorpo detectáveis por reações enzimáticas
EV0	Avaliação 0
EV1	Avaliação 1
EV2	Avaliação 2
EV3	Avaliação 3
EV4	Avaliação 4
EVs	Avaliações
FLS	Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos
G	Gramas
GIMP	GNU <i>Image Manipulation Program</i>
H/E	Hematoxilina/Eosina
HLA	Complexo principal de histocompatibilidade
IL17	Interleucina 17
Kg	Quilograma
Mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
NFK $\beta$	Fator Nuclear Kappa Beta
Nrf2	Fator de transcrição regulador da

°C	expressão de genes antioxidantes
PBS	Graus Celsius
PD	Tampão Fosfato
	Prednisona
RANK	Proteínas ativadoras de receptores do
RANKL	NFκβ
RGC	Receptores do NF κβ ligante
RLU	Receptores de glicocorticoides
ROS	Unidades de luz relativa
RPM	Espécies reativas de oxigênio
SPSS	Rotações Por Minuto
TCA	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TEP	Ácido Tricloroacético
TNFα	Tempo de Elevação da Pata
UNIOESTE	Fator de necrose tumoral alfa
w	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
μg	Fator de importância
MI	Micrograma
Mm	Microlitro
μm <sup>2</sup>	Micrômetro
	Micrômetros quadrados

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>22</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. ARTRITE REUMATOIDE.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. ARTRITE E ENVELHECIMENTO .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. AÇÃO DA ARTRITE REUMATOIDE NAS ARTICULAÇÕES .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4. EFEITOS DA ARTRITE REUMATOIDE EM ESTRUTURAS PERIARTICULARES .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4.1. Ação da artrite reumatoide no tecido ósseo .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4.2. Ação da artrite reumatoide no tecido muscular.....</b>	<b>28</b>
<b>3.5. TRATAMENTO PARA ARTRITE REUMATOIDE E O USO DE GLICOCORTICOIDES: PREDNISONA .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6. USO DA CURCUMINA COMO SUPLEMENTAÇÃO NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE.....</b>	<b>33</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. PROTOCOLOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.2. Indução da artrite experimental.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.3. Suplementação com curcumina no tratamento com prednisona. 36</b>	
<b>4.1.4. Avaliações funcionais e aferimento de edema articular .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.5. Avaliação da incapacidade articular através do tempo de elevação da pata (TEP).....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.6. Força de preensão.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.7. Plano inclinado .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.8. Von Frey .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.9. Edema articular .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2. EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3. ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE LIPOPERÓXIDOS NO PLASMA SANGUÍNEO.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4. CONTAGEM TOTAL DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL A ATRAVÉS DO TESTE DE REAÇÕES ANTÍGENO-ANTICORPO DETECTÁVEIS POR REAÇÕES ENZIMÁTICAS (ELISA).....</b>	<b>39</b>
<b>4.6. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E FOTODOCUMENTAÇÃO DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-FEMORAL.....</b>	<b>40</b>

4.7. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-FEMORAL E ESTRUTURAS PERIARTICULARES .....	40
4.8. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E FOTODOCUMENTAÇÃO EM MICROSCOPIA DE LUZ DO MÚSCULO RETO FEMORAL.....	41
4.9. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO MÚSCULO RETO FEMORAL .....	42
4.10. AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO MÚSCULO RETO FEMORAL.....	42
4.11. IMUNO-HISTOQUÍMICA DO MÚSCULO RETO FEMORAL.....	43
4.12. HISTOMORFOMETRIA DAS JUNÇÕES NEUROMUSCULARES DO MÚSCULO RETO FEMORAL.....	43
4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
5. RESULTADOS.....	44
5.1. MASSA CORPÓREA.....	44
5.2. AVALIAÇÕES FUNCIONAIS.....	46
5.2.1. Tempo de elevação da pata .....	46
5.2.2. Força de preensão .....	48
5.2.3. Plano inclinado .....	48
5.2.4. <i>Von Frey</i> .....	49
5.3. ASPECTOS INFLAMATÓRIOS.....	51
5.3.1. Aspecto inflamatório macroscópico- edema .....	51
5.3.2. Aspectos inflamatórios microscópicos – Contagem de migração total de leucócitos e quantificação das concentrações de Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ .....	53
5.4. ASPECTO OXIDATIVO – CONCENTRAÇÕES DE LIPOPEROXIDAÇÃO NO PLASMA SANGUÍNEO .....	53
5.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-FEMORAL E ESTRUTURAS PERIARTICULARES .....	54
5.5.1. Análise morfológica qualitativa e semiquantitativa da articulação tíbio-femoral .....	54
5.5.2. Análise semiquantitativa das características inflamatórias de estruturas periarticulares e musculatura periarticular das articulações tíbio-femorais .....	57
5.6. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO MÚSCULO RETO FEMORAL ..	59
5.6.1. Análise morfológica.....	59
5.6.2. Análise histomorfométrica do fuso muscular .....	61
5.6.3. Análise morfométrica geral.....	63
5.6.3. Análise morfométrica de colágeno .....	65
5.6.4. Morfometria das junções neuromusculares.....	67
6. DISCUSSÃO .....	69
7. CONCLUSÃO .....	79

<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>97</b>
<b>ARTIGO I .....</b>	<b>98</b>
<b>ARTIGO II .....</b>	<b>98</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica e autoimune, uma desordem sintomática que ocorre quando o sistema imune erroneamente ataca moléculas ou células saudáveis do organismo (Wang *et al.*, 2015), o que ocorre mais frequentemente em mulheres entre 40 e 50 anos de idade (Kumar *et al.*, 2013) e resulta, predominantemente, em inflamação sinovial de várias articulações, causando dor, redução da mobilidade e menor qualidade de vida (Lu *et al.*, 2018). Ultimamente, o número de pessoas acometidas pela AR está aumentando juntamente com o aumento da expectativa de vida e envelhecimento da população (Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019).

As manifestações histopatológicas que ocorrem nas articulações estão relacionadas com a inflamação mediada pelo sistema imunológico por meio de ativação, proliferação e liberação de citocinas pró-inflamatórias e também por infiltração contínua de células inflamatórias na membrana sinovial levando à sinovite, estando associada com a ativação de macrófagos precursores de osteoclastos, o que leva à erosão, destruição e deformação da articulação e, conseqüentemente, o comprometimento da cartilagem articular (Wang *et al.*, 2019). Todas essas complicações resultam em limitações funcionais e biomecânicas, comprometendo a articulação e os tecidos periarticulares, como o muscular (Stenstrom; Minor, 2003).

Quando não controlada, a atividade contínua de células imunes leva à inflamação crônica das articulações periféricas, e à hiperplasia de células sinoviais estimula a liberação de mais citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ), ocasionando ainda mais danos articulares (Bhosale; Richardson, 2008). Essa inflamação crônica está diretamente relacionada com o aumento do estresse oxidativo (Smallwood *et al.*, 2018), também conhecido como desequilíbrio redox, descrito como uma condição em que a quantidade de espécies reativas de oxigênio aumenta ao longo do tempo, seja pelo aumento de sua produção, pela redução das ações antioxidantes, ou pela combinação de ambos (Malstrom *et al.*, 2017), o que leva ao comprometimento da sinalização redox e do controle dos danos

moleculares, alterando o equilíbrio e gerando repercussões nos tecidos afetados (Sies *et al.*, 2017).

A persistência desta condição pode levar às complicações sistêmicas extra articulares, como a sarcopenia que progride para a atrofia muscular, perda de mobilidade (Kumar *et al.*, 2013) e grande comprometimento funcional (Lu *et al.*, 2018). A perda de massa muscular pode afetar todo o organismo e, neste sentido, a análise do tecido muscular também se torna um aspecto importante na avaliação da progressão da AR (Kamada *et al.*, 2021).

A AR não tem cura, portanto, o principal objetivo do seu tratamento é reduzir a dor articular induzida pela inflamação nas articulações e distensões musculares, de forma a compreender os mecanismos subjacentes envolvidos em sua patogênese (Abramoff *et al.*, 2020). O tratamento padrão é feito com fármacos que envolvem o uso de imunossupressores e glicocorticoides. Estudos têm mostrado que a idade e o gênero do indivíduo podem influenciar na escolha do tratamento, de forma que, pacientes que estejam passando pelo processo de envelhecimento são mais comumente direcionados ao tratamento com glicocorticoides (Oishi *et al.*, 2018) e a prednisona (PD), é um dos mais prescritos (Li *et al.*, 2017).

A alta incidência de prescrição da PD ocorre devido a sua capacidade de inibição na secreção de citocinas pró-inflamatórias (Li *et al.*, 2017). No entanto, existem algumas preocupações em relação ao consumo desta medicação, uma vez que, seu uso a longo prazo pode causar muitos efeitos colaterais (Daily *et al.*, 2016) como infecções, danos gastrointestinais e perda de tecido ósseo e muscular (Lemmey *et al.*, 2016). Sendo assim, existe a necessidade da busca por tratamentos alternativos para controlar os danos causados pela AR.

Alguns estudos têm focado em medicamentos fitoterápicos para reduzir o perfil inflamatório de pacientes com doenças autoimunes (Sadeghi *et al.*, 2020). Os efeitos imunomoduladores destas terapias têm sido alcançados na maioria das investigações científicas, o que pode ser atribuído, principalmente, à influência que possuem nas vias inflamatórias relacionadas ao estresse oxidativo (Shabgah *et al.*, 2021).

A curcumina (CM) (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil-1,6-heptadieno-3,5-diona) é comumente utilizada, na forma de extrato seco ou *in natura*, na

culinária indiana e asiática como tempero, devido ao seu sabor e como corante natural para os alimentos, devido sua coloração alaranjada/amarelada. Além disso, também tem sido usada há milhares de anos, por suas propriedades medicinais, que incluem sua capacidade de agir como um composto anti-inflamatório, antioxidante e antiartrítico (Ibáñez; Blázquez, 2020). Desta forma, este princípio ativo, que é o principal componente da cúrcuma (*Curcuma longa*) e pertencente à família *Zingiberaceae*, tem se mostrado capaz de diminuir marcadores inflamatórios em doenças autoimunes (Hallajzadeh *et al.*, 2019) e consequente diminuição de sintomas causados por estas patologias (Li *et al.*, 2020).

Em suma, aparentemente a curcumina possui potencial terapêutico para o tratamento da AR e tem sido sugerida, não só como uma monoterapia, mas também como terapia suplementar associada a drogas antirreumáticas (Asteriou *et al.*, 2018). Essa propriedade imunomoduladora pode levar a redução de dor articular, recuperação de danos no tecido muscular e restauração da funcionalidade (Henrotin *et al.*, 2013). Porém, os achados relacionados à influência nas concentrações de interleucinas e TNF  $\alpha$ , por exemplo, permanecem inconsistentes (Sadeghi *et al.*, 2020). Além disso, em contraste com suas várias propriedades promissoras, o composto possui baixa solubilidade, o que leva à diminuição da sua biodisponibilidade (Dei Cas; Ghidoni, 2019) e também ainda existem lacunas sobre sua toxicologia ou dosagem apropriada e forma de administração.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do tratamento com 2 mg/kg/dia (Kevin *et al.*, 2020), 10 mg/kg/dia de PD e 2mg/kg/dia de PD suplementado com 100 mg/kg/dia de extrato seco de cúrcuma (Nonose *et al.*, 2014), mimetizando a forma comumente utilizada pela população, na funcionalidade do membro pélvico, aspectos inflamatórios, histomorfométricos e imunohistológicos da articulação tíbio-femoral e do músculo reto femoral de ratas *Wistar* fêmeas, em processo de envelhecimento e com AR induzida por Completo Adjuvante de Freund (CFA).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Analisar os efeitos da suplementação com extrato seco de CM no tratamento com sub dose de PD em aspectos funcionais do membro pélvico, imunológicos, morfológicos e do sistema antioxidante no plasma sanguíneo, na articulação tíbio femoral e do tecido muscular periarticular em modelo de AR em ratas *Wistar* com 18 meses de idade.

### 2.2. Objetivos Específicos

Identificar os efeitos da suplementação com 100 mg/kg/dia de extrato seco de CM no tratamento com 2 mg/kg/dia de PD em modelo experimental de AR promovido por CFA, em ratas *Wistar* com 18 meses de idade, nos seguintes parâmetros:

- Aspectos funcionais em relação à força de preensão, propriocepção, nocicepção e tempo de elevação da pata;
- Nos aspectos inflamatórios macroscópicos e microscópicos por meio da análise do edema, de marcadores inflamatórios com TNF $\alpha$  no linfonodo poplíteo, e contagem total de leucócitos no líquido sinovial da articulação tíbio femoral;
- Nos aspectos oxidativos através da análise de lipoperoxidação no plasma sanguíneo;
- Nos aspectos morfológicos gerais da articulação tíbio femoral e estruturas periarticulares;
- Nos aspectos morfológicos gerais do tecido muscular e das junções neuro musculares (JNM) do músculo reto femoral;
- Nos aspectos histomorfométricos do tecido muscular e JNM do músculo reto femoral.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. ARTRITE REUMATOIDE

A AR é uma doença autoimune, sistêmica, crônica e com etiologia desconhecida (Kourilovitch *et al.*, 2014) que afeta aproximadamente 1% da população mundial e é distribuída universalmente. No entanto, sabe-se que ocorre predominantemente em mulheres e, geralmente, entre a quarta e quinta décadas de vida (Viatte *et al.*, 2013).

A patogênese deste tipo de artrite ainda não foi completamente desvendada, no entanto, sabe-se que como muitas outras doenças de caráter autoimune, existem interações entre fatores genéticos e ambientais. Sobre os fatores genéticos já é esclarecido que há interferência e alteração nos mecanismos moleculares de genes que regulam respostas inflamatórias do organismo (Burton *et al.*, 2007). Dentre os riscos ambientais associados ao desenvolvimento da AR, destacam-se: tabagismo, alcoolismo, lactação prolongada, situação socioeconômica, região de nascimento (Liao *et al.*, 2009), má nutrição, gravidez frequente, menopausa, sofrimento psicológico, ansiedade, tuberculose, ataques de reumatismo agudo (Tufts, 2012) e, infecção ambiental por bactéria ou vírus (Kapale *et al.*, 2017).

As primeiras e principais manifestações clínicas desta condição são configuradas, por poli artralgia intermitente que evolui para inflamações simétricas de pequenas e grandes articulações sinoviais, principalmente nas mãos e nos pés, causando dor crônica, rigidez matinal e edema nestas estruturas (Kourilovitch *et al.*, 2014). Estas características são causadas por inflamação e hiperplasia sinovial que evoluem de forma gradual causando destruição de tecidos adjacentes como cartilagens, ossos, tendões e músculos (Joshi, 2012).

As manifestações articulares levam à diminuição de massa e força muscular e inibição direta da contração de grupos musculares adjacentes, o que pode comprometer a integridade biomecânica da articulação e de tecidos que a circundam, resultando em, além de dor, padrões de movimentos que, geralmente, não oferecem energia suficiente e limitam a capacidade de locomoção do indivíduo podendo levar a movimentos reduzidos e até à

imobilização (Tufts, 2012).

Todas estas características clínicas levam a impactos significantes na qualidade de vida do indivíduo (Giles *et al.*, 2008), podendo acometer atividades do dia-a-dia, bem como as laborais (Abell *et al.*, 2005), distúrbios psicológicos e instabilidade social, o que pode levar a custos diretos e individuais ou indiretos e públicos, devido ao maior gasto com saúde, o que mostra sua grande importância social. Além disso, com o aumento da expectativa de vida da população mundial, houve também, crescimento concomitante da incidência de doenças autoimune, uma vez que estes indivíduos são mais susceptíveis a esse tipo de patologia devido ao processo de imunossenescência, o que mostra a necessidade de maiores investigações neste aspecto.

### **3.2. ARTRITE E ENVELHECIMENTO**

O aumento da expectativa de vida da população mundial está atrelado ao maior envelhecimento dos indivíduos e a maior incidência de doenças autoimunes, devido ao envelhecimento e degeneração do sistema imunológico (Safiri *et al.*, 2019).

Esta relação causal com a deterioração da imunidade nos leva à compreensão do risco de sucumbir ao descontrole celular, malignidade ou infecção. O que torna necessário a compreensão de como as doenças autoimunes, degenerativas do tecido e o processo de envelhecimento imunológico estão relacionados (Weyand *et al.*, 2014).

O sistema imunológico muda com a idade por meio de um processo conhecido como imunossenescência. Em pacientes com AR, este processo é acelerado e prematuro (Lindstrom; Robinson, 2010) e afeta tanto o sistema imunológico inato quanto o adaptativo. O sistema imunológico inato torna-se não especificamente ativo com a idade, contribuindo assim para o aumento da inflamação crônica e comorbidades (Chalan *et al.*, 2015).

O sistema imunológico adaptativo torna-se funcionalmente prejudicado e sofre alterações fenotípicas com a idade, contribuindo para a quebra da tolerância imunológica que também contribui para aumento de prevalência de

doenças imunes (Chalan *et al.*, 2015). Em particular, as células senescentes são caracterizadas pela secreção de várias citocinas inflamatórias, que afetam a função da célula em si, e leva à senescência induzida por estresse oxidativo nas células circundantes (Krtolica; Campisi, 2002).

Neste sentido, preocupações sobre os eventos adversos podem influenciar decisões sobre as terapias utilizadas, muitas vezes preferindo uma abordagem menos agressiva e efetiva em pacientes com idade avançada, (Fraenkel; Rabidou; Dhar, 2006) de forma que se torna necessária a busca por estratégias terapêuticas voltadas à eliminação de células senescentes, ou interrupção do microambiente inflamatório causado por estes fatores, e que mostrem benefícios para o tratamento de doenças e para promover a regeneração de tecidos nesta faixa etária (Melo; Ribeiro; Logarinho, 2019). Para que isso seja possível, é necessário compreender os mecanismos de ação da doença nas diferenças estruturas acometidas no organismo.

### **3.3. AÇÃO DA ARTRITE REUMATOIDE NAS ARTICULAÇÕES**

Embora a patogênese precisa do desenvolvimento da AR ainda não seja conhecida, acredita-se que as deformações e destruição dos tecidos articulares ocorram devido a característica autoimune da doença, ou seja, células do sistema imunológico que deveriam atacar elementos externos, acometem, erroneamente, tecidos saudáveis do próprio corpo, como se fossem células invasoras, liberando substâncias que provocam inflamação (Kapale *et al.*, 2017). Os mecanismos envolvidos no recrutamento de células inflamatórias para o interior da membrana sinovial têm sido extensivamente estudados (Bartok; Firestein, 2010).

Os fatores genéticos e a presença de autoanticorpos colocam a hipótese de que a imunidade adaptativa esteja no centro da patogênese inicial. Em indivíduos com AR, há alteração na expressão de genes reguladores do complexo principal de histocompatibilidade (HLA), promotores de citocinas inflamatórias e de sinalização de células T (Gregersen *et al.*, 1987).

Pacientes com AR possuem alterações nas células T regulatórias associados ao aumento da expressão de proteínas como: TNF $\alpha$ , fator nuclear kappa  $\beta$  (NFK  $\beta$ ) e interleucinas que são dependentes de sinalização, estímulo,

ativação e diferenciação de células T (Klareskog *et al.*, 2008). O aumento expressivo de células T ocasionam acúmulo de células inflamatórias na articulação e vice versa, uma vez que a membrana sinovial na AR contem células mieloides abundantes e células dendríticas que expressam citocinas, moléculas HLA e moléculas coestimuladoras que são necessárias para a ativação das células T e a apresentação do antígeno (Lebre *et al.*, 2008).

A sinovite ocorre quando os leucócitos se infiltram no compartimento sinovial. O acúmulo de leucócitos reflete principalmente a migração, e não a proliferação local. A migração celular é habilitada pela ativação endotelial dos pequenos vasos sinoviais, o que aumenta a expressão de moléculas de adesão. Assim, a angiogênese, que é induzida por condições hipóxicas e citocinas, e linfangiogênese, que limita a saída celular, são características dos primeiros e estágios estabelecidos de sinovite (Szekanecz *et al.*, 2009).

Além de fatores genéticos, fatores ambientais podem ocasionar citrulinização de componentes de resposta imune do organismo fazendo uma integração das duas respostas para promover remodelação e danos aos tecidos levando a loops de *feedback* positivo mediados pelas interações entre leucócitos, fibroblastos sinoviais, condrócitos e os produtos moleculares de dano (McInness; Shett, 2011).

Essas mudanças de microambiente, combinados com reorganização profunda da arquitetura sinovial e ativação local de fibroblastos, permitem o acúmulo de tecido inflamatório na articulação sinovial, fazendo com que as células do sistema imunológico formem uma camada fibrosa de tecidos anormais, chamada *pannus* (Kapale *et al.*, 2017). Esta camada promove destruição da rede de colágeno do tipo II, um processo que altera o conteúdo de glicosaminoglicanos e a retenção de água que leva diretamente à disfunção biomecânica. Outras enzimas da matriz degradam agregam e, assim, diminuem mais a integridade da cartilagem (Firestein, 2003), de forma que o seu formato e alinhamento é perdido resultando em deformações, e danos aos ligamentos adjacentes (Firestein, 2003; Kapale *et al.*, 2017).

A própria cartilagem articular tem potencial regenerativo limitado. Os condrócitos são regulados fisiologicamente por formação e clivagem de matriz por influência das citocinas sinoviais e intermediários de nitrogênios reativos, a cartilagem é progressivamente privada de condrócitos, que sofrem apoptose.

Esses processos acabam levando, além da destruição da superfície da cartilagem, ao estreitamento do espaço articular (Firestein, 2003).

No entanto, o principal alvo é a membrana sinovial, e seu espessamento causam danos irreversíveis à cápsula e à cartilagem articular, uma vez que essas estruturas são repostas pelo *pannus* e, abaixo deste arranjo, a cartilagem fica corroída e destruída e as articulações se tornam fixas devido a estrutura espessa e endurecida, o que resulta no edema, modificação do tecido articular e, devido ao desuso, na atrofia de estruturas adjacentes, como: pele, ossos, músculos, tendões, nervos e, ainda, podem acometer o tecido conectivo de vasos sanguíneos (Firestein, 2003).

O maior acometimento desta estrutura ocorre devido à hiperplasia no processo inflamatório com grande número de células imune, que configuram sinovite (Firestein, 2003), resultando em proliferação celular, neovascularização e formação de folículos linfoides germinativos (Bartok; Firestein, 2010), hiperemia sinovial, proliferação de sinoviócitos invasivos semelhantes a fibroblastos que resistem à apoptose e aumento na propriedade de aderência e invasão, infiltração de leucócitos, resposta neoangiogênica associada (Bottini, 2013), alterações na função dos linfócitos T e B, produção anormal de citocinas e anticorpos como: citocinas pró-inflamatórias, TNF $\alpha$ , interleucinas e proteína C reativa (CRP) (Bugatti *et al.*, 2014) o que leva ao *feedback positivo* que continua alimentando o ciclo de inflamação (Firestein, 2003), se este ciclo persistir, os efeitos da doença se estendem para estruturas periarticulares.

### **3.4. EFEITOS DA ARTRITE REUMATOIDE EM ESTRUTURAS PERIARTICULARES**

Como já exposto anteriormente, a AR é uma doença sistêmica que afeta primeiramente e principalmente as articulações sinoviais. No entanto, esta estrutura é composta de diferentes tipos de tecido e, por isso, é considerada um órgão. Sendo assim, um trauma ou uma doença, como a AR, que afeta um tecido no seu interior, vai acarretar em efeitos nas estruturas adjacentes (Archer *et al.*, 2003). Portanto, o curso progressivo e crônico da

doença, além de acometer a membrana sinovial e a cartilagem articular, acaba causando danos também aos ossos, tendões e músculos (Joshi *et al.*, 2012).

#### **3.4.1. Ação da artrite reumatoide no tecido ósseo**

Após as células do sistema imune migrarem para a membrana sinovial das articulações, o sistema imune adaptativo mostra respostas em indivíduos que já possuem predisposição genética. Caso as células dendríticas e células T migrarem para nódulos linfáticos, locais extra articulares passam a ser afetados. Pode ocorrer a ativação da imunidade inata e adaptativa de forma paralela, que pode contribuir para os padrões de crise e remissão dos sintomas (Firestein, 2003).

Estudos mostram que as concentrações de TNF $\alpha$ , células T e B e Interleucina 17 (IL17) influenciam diretamente na progressão de danos cartilagosos e ósseos (Lubberts *et al.*, 2003). Uma vez que estes podem causar maior expressão das proteínas ativadoras de receptores do NF $\kappa$ B (RANK) e ativador de receptores do NF  $\kappa$ B ligante (RANKL) (Kurz *et al.*, 2015), que regulam a reabsorção óssea e fazem a mediação da maturação e ativação dos osteoclastos e diminuição da ação da osteoprotegerina (OPG) (Kurz *et al.*, 2015). Se esta ativação persistir, tecidos musculares adjacentes também passam a ser afetados.

#### **3.4.2. Ação da artrite reumatoide no tecido muscular**

Indivíduos com AR apresentam altas concentrações séricas e articulares de TNF  $\alpha$ , este que é mediador central na perda de proteína muscular, uma vez que atua estimulando fibroblastos sinoviais, como condrócitos e osteoclastos, os quais liberam metaloproteinases que levam a danos aos tecidos (Walsmith; Roubenoff, 2002).

No geral sabe-se que o excesso de produção desta citocina altera o balanço entre degradação e síntese de proteína do tecido muscular. O mecanismo preciso que leva à essa situação ainda não é completamente elucidado, mas pode envolver a alteração nos fatores de transcrição tanto no

tecido muscular quanto na produção e regulação de hormônios, como é o caso da insulina, que pode ter ação de atividade periférica reduzida direcionando, até mesmo, à caquexia, uma vez que o metabolismo energético do organismo fica totalmente desbalanceado (Santo *et al.*, 2018).

É importante evidenciar que as proteínas miofibrilares como a actina e a miosina são constantemente transformadas no corpo, ou seja, estão constantemente sendo degradadas em seus aminoácidos constituintes e repostas por síntese proteica. A taxa geral de degradação e síntese em cada célula deve ser equilibrada, pois alterações contínuas nos dois processos podem resultar em perda acentuada de massa celular para o organismo como um todo. Esses dinamismos têm funções regulatórias importantes e possibilitam adaptações para novas condições fisiológicas, como em injúrias e infecções, que é o que ocorre em indivíduos com AR (Lecker *et al.*, 1999).

Em casos em que a AR já está promovendo degradações nas articulações e a mobilidade já se encontra reduzida, há consequente diminuição da atividade física. Este fator associado à predisposição genética pode levar a perda muscular e aumento de tecido adiposo que, por sua vez, aumenta ainda mais as concentrações circulantes de TNF  $\alpha$ , produzidos pelos adipócitos. Este quadro predispõe o organismo para resistência à insulina e maior perda muscular, o que reforça o ciclo negativo de perda de músculo e ganho de gordura, podendo evoluir para: obesidade caquética, fraqueza muscular, mobilidade física ainda menor, aumento do risco de infecção, doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e osteoartrite (Challal *et al.*, 2016). A AR não tem cura, no entanto, diante de todos os sintomas e manifestações clínicas descritas, é necessário que a doença seja tratada, de forma a trazer maior qualidade de vida ao indivíduo afetado.

### **3.5. TRATAMENTO PARA ARTRITE REUMATOIDE E O USO DE GLICOCORTICOIDES: PREDNISONA**

O tratamento se inicia com o diagnóstico prematuro e monitoramento da progressão da doença (Mota *et al.*, 2011). Na prática clínica, a terapia padrão pode incluir uso de medicamentos anti TNF  $\alpha$ , como a leflunomida (Azevedo *et al.*, 2016); anti-inflamatórios e analgésicos, entre os quais se

destacam paracetamol e dipirona; drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs), um dos mais utilizados são os glicocorticoides, principalmente metotrexato (Azevedo *et al.*, 2016), e PD (Hua *et al.*, 2020). Essas drogas conferem apenas alívio temporário, não interferindo na progressão da doença e devem ser administradas com muita cautela, pois em doenças crônicas trazem inúmeros efeitos colaterais que incluem: risco de sonolência, depressão sensorial, dependência (Benucci *et al.*, 2017), osteoporose, infecções, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doenças gastrointestinais, glaucoma, entre outros (Black *et al.*, 2016).

Glicocorticoides são hormônios esteroides produzidos pelo organismo, mais especificamente nas zonas reticular e intermediária do córtex da glândula suprarrenal e estão envolvidos em diversas funções fisiológicas, principalmente na adaptação em situações de estresse, seu representante natural é o cortisol ou hidrocortisona (Gurgel *et al.*, 2022).

Sua síntese é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela hipófise anterior, ou adeno-hipófise, em resposta a liberação, pelo hipotálamo, do neuropeptídeo denominado fator liberador de corticotrofina (CRH). O hormônio antidiurético (ADH), a ocitocina e as catecolaminas podem influenciar o ritmo circadiano da secreção de ACTH, assim como estados de febre, hipoglicemia, estresse e alteração do ciclo de sono-vigília (Da Câmara *et al.*, 2021).

As formulações sintéticas são desenvolvidas pela indústria farmacêutica e são muito semelhantes aos naturais. Os fármacos mais conhecidos são: cortisona, hidrocortisona, beclometasona, betametasona, dexametasona, metilprednisolona, triancinolona e PD. Esses fármacos exercem profundos efeitos sobre quase todos os sistemas orgânicos e, em decorrência de suas ações diversificadas, encontram-se entre as classes de substâncias mais amplamente utilizadas na terapêutica (Damiani *et al.*, 2001). Apresentam poderosos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (Bavaresco *et al.*, 2005).

A história destes fármacos é inseparável da história de especialidades médicas como a reumatologia. Sua importância está ligada não só a melhora da qualidade de vida, como também a sobrevida de pacientes com doenças que apresentam características autoimunes em sua etiopatogênese. No

entanto, desde os primeiros estudos que mostraram excelente resposta anti-inflamatória da cortisona em pacientes com AR (Polley *et al.*, 1976), já havia sido observado que seu uso não era isento de importantes efeitos adversos, principalmente, quando utilizados indiscriminadamente em doses altas por longos períodos (KIRCK *et al.*, 2002).

Embora sua denominação tenha origem em seu efeito característico sobre o metabolismo dos carboidratos, atuam praticamente sobre todos os tecidos, uma vez que agem como fatores de transcrição, alterando expressão dos genes alvo em resposta a um sinal hormonal específico (Herbert *et al.*, 2006)

O mecanismo fundamental que promove a transativação ou a transrepressão gênica inicia-se com o hormônio, que é lipofílico, cruzando a membrana citoplasmática da célula-alvo por difusão passiva. No citoplasma, se ligam a receptores proteicos específicos, denominados receptores de glicocorticoides (RGC), que são proteínas citoplasmáticas com estrutura que contém domínios comuns a outros membros da família de receptores nucleares (Wright *et al.*, 1993).

O complexo glicocorticoide- receptor sofre transformação estrutural e se torna capaz de penetrar no núcleo celular, no qual se liga a regiões promotoras de certos genes, os elementos responsivos, induzindo a síntese, não somente de proteínas anti-inflamatórias, mas também de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico (como as que promovem a glicogênese). Esse processo é chamado de transativação (Song *et al.*, 2005).

Outro mecanismo genômico sobre o qual atuam é chamado de transrepressão, em que monômeros de moléculas e receptores interagem com fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o NF $\kappa$ B, por interação proteína- proteína e promovem efeito inibitório de suas funções. Por essa via, por exemplo, a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas, TNF $\alpha$  e prostaglandinas são reduzidas (Song *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que a maior parte dos efeitos anti-inflamatório e imunossupressor, são desencadeados por mecanismos de transrepressão, enquanto grande parte dos efeitos adversos é relacionada aos mecanismos de transativação (Hu *et al.*, 2017).

Dentre os sintéticos, a PD é um dos mais utilizados no tratamento da AR. É ministrada, geralmente, na combinação com outras drogas modificadoras da doença, mostrando mais efeitos benéficos do que na monoterapia (Asteriou *et al.*, 2018). Foi demonstrado que doses altas administradas pelas vias intravenosa, intramuscular ou oral por três dias, produzem melhora no quadro clínico e características laboratoriais da AR e há evidências de benefício duradouro. Sabe-se, também, que doses mínimas de PD ministradas para AR inicial é efetiva com o mínimo de efeitos colaterais. Porém, quando a AR é controlada com doses baixas, pode ocorrer precipitação de um surto da doença. Para conter isto, o método de redução gradual foi mostrado em alguns estudos para obter a menor dose que manterá o controle da doença com o mínimo de efeitos colaterais possíveis (Polley *et al.*, 1976).

Os efeitos colaterais são diversos e incluem alterações em padrões fisiológicos como: alterações no metabolismo energético como um todo através de aumento de glicose sérica, resistência à insulina, redução da síntese proteica, aumento do catabolismo muscular e aumento do glicogênio hepático; depressão das funções reprodutivas e da síntese de hormônios sexuais; Interferência na absorção intestinal de cálcio prejudicando a absorção de vitamina D; Supressão da resposta imune do tipo I; Supressão relativa da resposta imune do tipo II humoral e modulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica a diversas substâncias (Klippel *et al.*, 2001). E, ainda, alterações em padrões celulares como: Supressão de síntese de corticotrofina, gonadotrofina, ACTH, hormônio do crescimento, estrógeno e testosterona; Mudanças na síntese, liberação e ação de neurotransmissores; Supressão de osteoblastos e produção de osteoprotegerina; Atrofia de fibras musculares do tipo IIB, diminuição da síntese de colágeno (Klippel *et al.*, 2001) e síndrome de *Cushing*, que causa uma série de sintomas como: ganho de peso, retardo de crescimento, obesidade, acnes, estrias e hipertensão (Bista; Beck, 2014).

Sendo assim, o uso de abordagens terapêuticas alternativas ou associadas aos medicamentos têm sido testadas. Nas últimas décadas, tentativas bem sucedidas de compreender melhor os mecanismos moleculares de ação de alguns produtos naturais têm despertado interesse em seu uso terapêutico na prática clínica, pois, a maioria dos experimentos com esses produtos, até então, não mostraram efeitos adversos ou se mostraram eficazes

com doses muito abaixo do limiar tóxico (Mukherjee; Wahile, 2006). Dentre estes, destaca-se a CM, componente da *Curcuma longa*, principalmente por apresentar efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antiartríticos (Ibáñez; Blázquez, 2020).

### **3.6. USO DA CURCUMINA COMO SUPLEMENTAÇÃO NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE**

O tumérico (*Curcuma Longa*) é uma raiz de cor amarela, proveniente da família do gengibre (*Zinbiberaceae*) nativa do Sul da Ásia e cultivada extensivamente ao longo da Ásia e da África (Blumenthal *et al.*, 2011). Essa raiz passa pelo processo de secagem, até virar pó, para ser comercializada, tradicionalmente como alimento, mais especificamente como tempero, para o mundo todo (Hallajzadeh *et al.*, 2019). Além de ser usada para dar cor e sabor para alimentos como queijo e manteiga, ainda é utilizada na indústria de cosméticos e, como remédio, tem sido usada em diferentes tratamentos ao longo dos séculos, por grande parte da população mundial (Hallajzadeh *et al.*, 2019).

Os medicamentos derivados de plantas têm desempenhado um papel fundamental nos cuidados de saúde de muitas culturas, antigas e modernas (Newman; Cragg, 2007). É usada em todo o oriente, principalmente pela medicina tradicional indiana e chinesa especialmente como anti-inflamatório (Aggarwal *et al.*, 2003) e muitos dos seus efeitos têm sido confirmados por pesquisas científicas ao longo dos anos. Estes efeitos incluem: antioxidantes, anti-inflamatórios, anticarcinogênico, antimicrobiano, hepatoprotetor, trombossupressor, cardiovascular, hipoglicêmico e antiartrítico (Shabgah *et al.*, 2021).

Pesquisas realizadas com o composto mostram, até então, que é um produto seguro em estudos com animais e humanos (Lao *et al.*, 2006) e não mostraram toxicidade no uso. Além disso, há evidências que sugerem que a CM possui ampla gama de alvos moleculares, o que apoia a teoria de que esta pode influenciar em várias cascatas bioquímicas e moleculares. Entre eles estão fatores de transcrição, fatores de crescimento e seus receptores,

citocinas, enzimas e genes que regulam a proliferação celular e apoptose (Camacho-Barquero *et al.*, 2007).

Sendo assim, a CM tem sido indicada para o tratamento de condições crônicas como: neurodegenerativas como no caso da doença de *Alzheimer*, devido sua capacidade de proteção a agentes neurotóxicos; câncer devido aos seus efeitos anticarcinogênicos e em doenças inflamatórias autoimunes, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e por agir em vários alvos, incluindo NFK $\beta$ , TNF $\alpha$  e caspases (Pari *et al.*, 2008), estes que estão diretamente ligados a patogênese da AR.

Os tratamentos para AR têm como objetivo reduzir os sintomas da doença através da diminuição da atividade inflamatória e, como já apontado, várias evidências sugerem que a CM tem vários alvos moleculares e pode agir tanto diretamente através de proteínas e indiretamente modulando a expressão gênica e, portanto, parece se mostrar como uma alternativa ou uma suplementação viável no tratamento da doença (Camacho-Barquero *et al.*, 2007).

No entanto, por mais que seja amplamente utilizada contra várias doenças e tenha mostrado eficácia, seu uso clínico tem sido questionado devido a sua baixa biodisponibilidade e baixa meia vida depois da sua administração oral (Anand *et al.*, 2007). Sendo assim, é importante a realização de estudos que investiguem ação do composto como monoterapia ou dos efeitos que podem produzir ao serem utilizada em associação com outros medicamentos.

Diante da literatura exposta, levanta-se o questionamento sobre quais são os efeitos tratamento com a CM associada à PD em ratas *Wistar* com AR experimental em processo de envelhecimento e, acredita-se, na hipótese de que a associação de CM com PD poderá potencializar os efeitos do fármaco.

## 4. METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA nº 77-19/2020) (Anexo I) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e foi conduzido de acordo com os princípios éticos da Associação Internacional do Estudo da Dor (Zimmermann, 1983).

Os animais foram randomizados em grupos compostos de ratas *Wistar* fêmeas, com 18 meses de idade e que foram mantidas em temperatura controlada de  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro e escuro de 12:12. Para as análises funcionais e histomorfométricas, 30 ratas foram divididas nos seguintes grupos (n=5): Grupo Controle (CG), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcumina (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD) e Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Para as análises imunohistoquímicas, 18 animais foram agrupados da mesma forma, porém com n=3 para cada grupo.

### 4.1. PROTOCOLOS

#### 4.1.2. Indução da artrite experimental

O modelo experimental de artrite foi induzido por uma injeção intradérmica pré-sensibilizada de 50  $\mu\text{l}$  de CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*) na base da cauda dos animais nos grupos AG, AC, APLD, APHD e APLDC. No entanto, o grupo CG recebeu uma injeção de solução salina (cloreto de sódio 0,9%). Sete dias após a primeira injeção na cauda, foi administrada uma injeção intra-articular de 50  $\mu\text{l}$  (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*) de CFA ou solução salina. Ambas as injeções foram administradas na articulação tíbio-femoral direita após tricotomia e assepsia da área com álcool iodado (1%) (Gomes *et al.*, 2013).

#### **4.1.3. Suplementação com curcumina no tratamento com prednisona**

O protocolo de tratamento para os grupos AC, APLD, APHD e APLDC começou 24 horas após a injeção intra-articular e foi realizado durante 14 dias consecutivos pelo método de gavagem. Os animais foram pesados antes da injeção intra-articular e novamente, após uma semana de experimento, para ajustar as doses administradas. O grupo AG recebeu dose padrão de água; AC, 100 mg/kg/dia de extrato seco de CM (*Curcuma longa*) (Nonose *et al.*, 2014); APLD, 2 mg/kg/dia (Masibo *et al.*, 2020) de PD; APHD, 10 mg/kg/dia (Zhang *et al.*, 2015) de PD; e APLDC, 100 mg/kg/dia (Nonose *et al.*, 2014) de extrato seco de CM (*Curcuma longa*) + 2 mg/kg/dia de PD.

#### **4.1.4. Avaliações funcionais e aferimento de edema articular**

Os animais foram submetidos à manipulação simulada, para adaptação ao estímulo em todos os equipamentos de avaliação funcional, por 3 dias. Em seguida, foram submetidos a 4 momentos de avaliação. A Avaliação 0 (EV0) foi realizada no dia da primeira sensibilização na base da cauda. A Avaliação 1 (EV1), um dia após a injeção intra-articular, e as Avaliações 2 (EV2), 3 (EV3) e 4 (EV4) ocorreram alternadamente a cada dois dias. Os resultados obtidos em todas as EVs foram registrados como uma média de 3 testes consecutivos (Tilson; Cabe, 1979).

#### **4.1.5. Avaliação da incapacidade articular através do tempo de elevação da pata (TEP)**

A incapacidade articular foi avaliada usando o protocolo descrito por Tonussi (1994), utilizando um equipamento composto por um cilindro com 30 cm de altura e 30 cm de diâmetro, coberto com malha trançada de aço inoxidável. O equipamento foi conectado aos animais por meio de sapatilhas metálicas que foram fixadas na pata traseira direita via fio condutor, e ao computador no programa *Rise Step*. O animal caminhou no cilindro pelo período de um minuto para que a perda da função de suporte do membro afetado pudesse ser registrada, ou seja, o tempo total que a pata traseira sensibilizada permaneceria sem tocar a superfície do cilindro. Esse tempo é

chamado de tempo de elevação da pata (TEP), registrado em segundos e usado para quantificar a incapacidade articular (Bertolini *et al.*, 2012).

#### **4.1.6. Força de preensão**

A força de preensão do membro pélvico foi avaliada usando um medidor de força de preensão (*Insight*, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) em todos os animais, conforme descrito por (Bertelli; Mira, 1995). Os animais foram posicionados de forma que agarrassem uma grade conectada a um transdutor de força com a pata traseira direita e, em seguida, fossem puxados pela cauda com força crescente até que a preensão fosse perdida. O dispositivo forneceu a força em gramas (g) exercida pelo animal, e esta foi registrada como a média de três testes consecutivos. A pata traseira esquerda foi imobilizada pela mão do avaliador para evitar interferências.

#### **4.1.7. Plano inclinado**

A função motora foi avaliada usando um plano inclinado (*Insight*, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O teste mediu a capacidade do animal de permanecer no topo de uma rampa cuja inclinação aumentava 5° a cada 5 segundos. A pontuação do teste do plano inclinado foi definida pelo ângulo máximo alcançado por cada animal enquanto permanecia na rampa sem escorregar por pelo menos 5 segundos. As medidas foram realizadas com o animal posicionado no plano transversal (posição vertical) (Yonemori *et al.*, 1998).

#### **4.1.8. Von Frey**

Para avaliar o limiar nociceptivo, foi utilizado um analgesímetro digital de filamento de *Von Frey* (*Insight*, Ribeirão Preto, São Paulo). O animal foi colocado em uma caixa elevada com revestimento de malha de ferro no assoalho, o que permitia o posicionamento do filamento perpendicularmente à região plantar da pata traseira, com pressão crescente até que o animal

retirasse o membro, o que fornece a alodinia mecânica (g) dos roedores (Chaplan *et al.*, 1994).

#### **4.1.9. Edema articular**

A mensuração do edema articular é considerada uma característica macroscópica importante da AR (Vijayalaxmi *et al.*, 2015) e é um método utilizado para analisar a indução e gravidade da doença. Após a imobilização dos animais com uma flanela (Gomes *et al.*, 2013), as medidas foram realizadas através da verificação do diâmetro da articulação tíbio-femoral direita (eixo médio-lateral), em centímetros, usando um paquímetro manual não digital (*Mister*, Brasil).

#### **4.2. EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS**

No 15<sup>o</sup> dia após a indução da artrite experimental, os animais foram anestesiados usando injeções intraperitoneais de xilazina (Xilazin-Brasil) (12 mg/kg) e cetamina (Ketalar-Brasil) (95 mg/kg) e eutanasiados por decapitação com guilhotina. As amostras de sangue, líquido sinovial, linfonodo poplíteo, articulações tíbio-femorais e músculos reto femorais do membro pélvico direito foram coletados.

#### **4.3. ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE LIPOPERÓXIDOS NO PLASMA SANGUÍNEO**

No momento da eutanásia, o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca, e as amostras foram centrifugadas a 4000 rotações por minuto (RPM), por 15 minutos. Após a sedimentação, o plasma sanguíneo foi alíquotado, usando micropipeta, e criopreservado em um *ultrafreezer* a -80°C. A análise dos níveis de lipoperóxidos foi realizada usando quimiluminescência (Flecha *et al.*, 1991). Para isso, após descongelar e agitar a amostra, 125 µL de plasma sanguíneo foi adicionado a 855 µL de tampão fosfato. A essa primeira

solução, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de *tert-butil* para iniciar a reação quimioluminescente, que foi lida por luminômetro *GloMax* (TD 20/20 *Turner Designers*). Os resultados foram expressos em unidades de luz relativa (RLU), e a curva obtida foi usada como um indicador qualitativo de lipoperoxidação. Os resultados quantitativos foram obtidos após a integração da área sob a curva usando o *software OriginLab 7.5*, que forneceu os pontos máximos da curva.

#### **4.4. CONTAGEM TOTAL DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA**

Logo após a eutanásia, para a contagem total de migração de leucócitos, foi realizada uma lavagem no interior da cápsula articular da articulação tíbio-femoral do membro pélvico direito dos animais, com 100  $\mu\text{l}$  de solução fisiológica a 0,9%, contendo 4  $\mu\text{L}$  de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 5%, e a coleta do líquido sinovial foi realizada com uma micropipeta digital. Vinte  $\mu\text{L}$  do líquido da primeira coleta foi diluído em líquido de *Turck* (ácido acético glacial 2 mL, azul de metileno 1% e água destilada 98 ml), e a contagem total de leucócitos foi realizada usando uma câmara de *Neubauer* (células/ $\text{mm}^3$ ) (Queiroz Balbino *et al.*, 2006). O resultado foi expresso em células multiplicadas por  $10^4$  por  $\text{mm}^3$  (Células  $\times 10^4/\text{mm}^3$ ).

#### **4.5. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL A ATRAVÉS DO TESTE DE REAÇÕES ANTÍGENO-ANTICORPO DETECTÁVEIS POR REAÇÕES ENZIMÁTICAS (ELISA)**

Após a contagem de leucócitos, o membro pélvico direito do animal foi dissecado para a coleta dos linfonodos poplíteos. As células foram cultivadas em meio RPMI completo (RPMI suplementado com 5% de FCS, 20 mM de glutamina e 40 IU/mL de gentamicina) na presença de MBP (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os níveis de  $\text{TNF}\alpha$  nos sobrenadantes da cultura foram avaliados 48 horas depois por teste de reações antígeno-anticorpo detectáveis por reação enzimática (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (*Invitrogen*, São Paulo, SP, BR).

#### **4.6. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E FOTODOCUMENTAÇÃO DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-FEMORAL**

As articulações tíbio-femorais do membro pélvico direito foram coletadas e submetidas aos protocolos histológicos padrão, fixadas em metacarn e descalcificadas em ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Após a descalcificação, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de álcoois, diafanizadas usando álcool n-butílico e incluídas em parafina histológica. Subsequentemente, foi realizada uma microtomia obtendo-se secções sagitais de 7 µm utilizando um micrótomo *Olympus* (R CUT 4055 Tóquio, Japão).

#### **4.7. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-FEMORAL E ESTRUTURAS PERIARTICULARES**

A análise histológica foi realizada para avaliar o efeito da inflamação na membrana sinovial, na cartilagem articular e nas estruturas periarticulares. Esta avaliação foi realizada utilizando escores semiquantitativos adaptados de Vidal *et al.*, 2018; Retameiro *et al.*, 2022; Zazula *et al.*, 2022 com padrões baseados nas principais patologias que causam alterações relacionadas aos processos inflamatórios provocados por lesões de AR, que podem resultar nas mudanças morfológicas analisadas (Tabela 1).

**Tabela 1: Scores para avaliação morfológica da articulação tíbio-femoral e estruturas periarticulares.**

SCORE DA CARTILAGEM ARTICULAR		SCORE DA MEMBRANA SINOVIAL		SCORE INFLAMATÓRIO PERIARTICULAR		SCORE DA MUSCULATURA PERIARTICULAR	
<i>Superfície da cartilagem</i>		<i>Camada íntima</i>		<i>Desordens inflamatórias</i>		<i>Desordens circulatórias</i>	
Estrutura da cartilagem	1. Superfície lisa	Camadas de sinoviócitos	1. Duas a três camadas 2. Mais de três camadas	Massa de células inflamatórias	1. Ausente	Infiltrado inflamatório	1. Ausente
	2. Irregular/Floculada	<i>Camada subíntima</i>			2. Presente		2. Presente
<i>Pannus</i>	1. Ausente	Angiogênese	1. Ausente	1. Pequena massa na membrana sinovial		<i>Fibras</i>	1. Poligonal
	2. Presente		2. Presente	2. Grande massa na membrana sinovial			2. Arredondada
<i>Organização da cartilagem</i>		Células inflamatórias no interior dos vasos	1. Ausente	1. Pequeno aglomerado de células circundando o periosteio			2. Atrofia
Condrócitos	1. Condrócitos organizados		2. Presente	2. Grande aglomerado de células circundando o periosteio			3. Vacuolização
	2. Condrócitos desorganizados			1. Pequeno aglomerado de células circundando a musculatura periarticular			2. Aumento de núcleos
<i>Tidemark</i>	1. Presente			2. Grande aglomerado de células circundando a musculatura periarticular		<i>Tecido conjuntivo</i>	
	2. Ausente					Hipertrofia	1. Ausente
Exposição do osso subcondral	1. Não exposto						2. Presente
	2. Exposto						

Tabela 1: Scores utilizados na avaliação semiquantitativa de secções histológicas na cartilagem articular, membrana sinovial e estruturas periarticulares da articulação tíbio-femoral de ratas *Wistar* com AR induzida por CFA (Retameiro *et al.*, 2022; Vidal *et al.*, 2018; Zazula *et al.*, 2022).

#### 4.8. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E FOTODOCUMENTAÇÃO EM MICROSCOPIA DE LUZ DO MÚSCULO RETO FEMORAL

Os músculos reto femorais do membro pélvico direito foram coletados e submetidos a rotina histológica padrão, fixados em metacarn. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de álcoois, diafanizadas usando xilol e incluídas em parafina histológica. Subsequentemente, foi realizada uma microtomia obtendo-se secções transversais de 7 µm utilizando um micrótomo *Olympus* (R CUT 4055 Tóquio, Japão). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliar os aspectos histomorfométricos dos músculos, e com *picrosirius red* para avaliar os tipos de colágenos. A fotodocumentação foi realizada através de um microscópio de luz (*Olympus DP71*, Tóquio, Japão) e um microscópio de luz polarizada (*Zeiss Axio Scope A1*, *Zeiss Industrial Metrology*, Alemanha).

#### 4.9. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO MÚSCULO RETO FEMORAL

A análise morfológica foi realizada para avaliar o efeito da inflamação no tecido muscular, utilizando padrões (Anexo II) baseados no tipo de alteração patológica de acordo com as principais patologias descritas por (DeGirolami; Smith, 1982) e adaptadas por (Zazula *et al.*, 2022). Esses tipos de alterações estão possivelmente relacionados aos processos inflamatórios causados por lesões de AR. Os processos de edema intersticial e hiperemia estão diretamente associados às cadeias dos processos inflamatórios e estão relacionados às mudanças morfológicas analisadas (Wosczyzna; Rando, 2018).

Dois valores foram usados para a avaliação quantitativa da histopatologia:

Fator de importância ( $w$ ), que leva em conta a importância patológica da alteração: 1 - Importância mínima, 2 - Importância moderada, 3 - Grande importância;

Valor de escore ( $a$ ), que varia de acordo com a extensão da alteração: (0) nenhuma, (2) mínima, (4) moderada e (6) ampla ocorrência.

Após obter esses valores, foi feito um cálculo matemático para as taxas de lesão para a avaliação total do tecido. O valor de escore para cada alteração ( $a$ ) é multiplicado pelo fator de importância ( $w$ ), resultando no índice de alteração ( $x = a \times w$ ). A soma de todos os  $x$  reflete a extensão da ocorrência desse padrão no tecido, revelando o índice total de dano.

#### 4.10. AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO MÚSCULO RETO FEMORAL

Para a análise histomorfométrica geral, a porção proximal do músculo reto femoral foi fixada em solução de metacarn e corada com H/E e *picrosirius red*. As secções transversais coradas com H/E foram usadas para a quantificação de núcleos, núcleos centrais, fibras musculares e capilares em 10 campos por animal.

Para cada campo, 10 fibras foram selecionadas para realizar medidas de área ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro maior e menor ( $\mu\text{m}$ ), e 10 núcleos foram selecionados para quantificar suas respectivas áreas ( $\mu\text{m}^2$ ). Os fusos musculares também

foram analisados através do diâmetro da cápsula ( $\mu\text{m}$ ) e área ( $\mu\text{m}^2$ ). Essas medidas foram realizadas utilizando o programa *Image-Pro Plus 6.0*.

As secções transversais coradas com *picrosirius red* foram usadas para a quantificação, em porcentagem de pixels (%), do colágeno total e seus diferentes tipos por cor, onde o tipo I era vermelho e o tipo III, verde, em 10 campos por animal, em relação ao colágeno total presente em cada campo. Essas mensurações foram realizadas utilizando o *GNU Image Manipulation Program* (GIMP 2.10.34).

#### **4.11. IMUNO-HISTOQUÍMICA DO MÚSCULO RETO FEMORAL**

As amostras do músculo reto femoral foram dissecadas e criofixadas em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), seccionadas longitudinalmente (10  $\mu\text{m}$  de espessura) (*Cryostat HM 505 E, MICROM™*). Tais secções foram posicionadas em lâminas silanizadas, tratadas previamente com solução de EDTA a 3%, e lavadas (3 x 5 min) em solução salina tamponada com fosfato (PBS), permeabilizadas em *Triton-X* 0,1% (10 min) e bloqueadas com PBS e 1% de albumina de soro bovino (BSA) (20 min). Posteriormente, as secções foram incubadas *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$  em uma solução contendo  $\alpha$ -bungarotoxina conjugada com rodamina (BTX; *Molecular Probes™, Eugene, OR-T-1175*), diluída 1:600 em PBS e 1% de BSA. As secções do músculo reto femoral foram, então, lavadas em PBS (3 x 5 min) antes de serem revestidas com *Prolong* (*Molecular Probes™, Eugene, OR-P10144*).

#### **4.12. HISTOMORFOMETRIA DAS JUNÇÕES NEUROMUSCULARES DO MÚSCULO RETO FEMORAL**

Para a análise da junção neuromuscular, foram utilizadas 30 imagens, para cada grupo experimental, obtidas por Microscópio de Fluorescência Totalmente Motorizado *Olympus BX61™* (Shinjuku, Japão) equipado com um Fluorescência UIS2. As imagens foram obtidas por meio de câmera monocromática *Orca-Flash 2.8* (Hamamatsu, Japão), com *software CellSens 11* (*Olympus™*) em ampliação de 1000X.

Posteriormente, o *software ImageJ™* foi utilizado para mensurar as variáveis da junção neuromuscular: área corada ( $\mu\text{m}^2$ ), área total ( $\mu\text{m}^2$ ), perímetro corado ( $\mu\text{m}$ ), perímetro total ( $\mu\text{m}$ ) e dispersão (%).

#### 4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão para todos os parâmetros testados. As avaliações funcionais (TEP, preensão, plano inclinado e *Von Frey*) e o edema foram analisados utilizando modelos lineares generalizados mistos, seguido pelo teste pós-teste de *Fisher* (LSD).

Para variáveis moleculares, morfológicas e histomorfométricas, foi utilizado modelo lineares generalizados mistos com pós-teste de *Sidak*. Essas análises foram realizadas no *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

Os dados de morfometria da junção neuromuscular foram analisados utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunn*, realizado com o *software GraphPad Prism™* 8.4.3.

O nível de significância estatística foi estabelecido em  $p = 0,05$ .

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. MASSA CORPÓREA

A massa corpórea dos animais apresentou diferença entre a primeira e a segunda semana, com perda de peso em todos os grupos ( $p=0,0004$ ). AG foi diferente de todos os grupos, com a maior perda (4,4% do peso inicial), seguido por APHD, com 2,7%, e APLD, com 2,5% de perda, sendo os grupos que mais se aproximaram de AG (APHD:  $p=0,048$ , APLD:  $p=0,031$ ). AC e APLDC apresentaram perdas de 1,4% e 1,2%, respectivamente, e foram estatisticamente iguais ao CG (AC:  $p=0,267$ , APLDC:  $p=0,423$ ), que teve apenas 0,35% de perda (Tabela 2).

**Tabela 2: Massa corpórea em gramas (g) na primeira e segunda semanas de experimento e a diferença da pesagem (g) entre os dois períodos.**

	<i>1ª semana</i>	<i>2ª semana</i>	<i>Diferença</i>
<b>CG</b>	280,8±15,6	279,8±15,6	-1±2 <sup>A</sup>
<b>AG</b>	288,67±31,9	276 ± 31,7	-12,7±2 <sup>C</sup>
<b>AC</b>	283,7±22,5	279,7±20,6	-4±3 <sup>AB</sup>
<b>APLD</b>	274,5±23,2	267,7±26,3	-6,8±5,9 <sup>B</sup>
<b>APHD</b>	273,8±15,4	266,5±13,3	-7,3±8,8 <sup>B</sup>
<b>APLDC</b>	269,7±18,2	266,5±17,7	-3,2±5,3 <sup>AB</sup>

Tabela 2: Estão indicados: Grupo Controle (CG), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcumina (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD) e Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Letras diferentes representam valores diferentes. Os valores são expressos como média ± DP. Foi utilizado um teste de modelo generalizado misto com pós-teste de *Fisher* (LSD) ( $p = 0,05$ ).

## 5.2. AVALIAÇÕES FUNCIONAIS

### 5.2.1. Tempo de elevação da pata

A avaliação da incapacidade articular mostrou diferenças entre as avaliações (Figura 1A-F), entre os grupos (Figura 1 G-K) ( $p < 0,0001$ ) e interação entre grupos e avaliações ( $p = 0,026$ ).

Dentro dos grupos, CG não apresentou diferença ao longo de todas as avaliações (Figura 1A). Todos os grupos com artrite tiveram um grande aumento nos valores de TEP em EV1, vinte e quatro horas após a injeção intra-articular ( $p < 0,0001$ ) (Figura 1B-F). AG (Figura 1B) manteve os mesmos valores até EV4 ( $p = 0,003$ ). APLD (Figura 1D) e APLDC (Figura 1F) retornaram aos valores iniciais em EV3 ( $p = 0,332$ ;  $p = 0,771$ ), os quais foram mantidos em EV4 ( $p = 0,184$ ;  $p = 0,666$ ). AC (Figura 1C) e APHD (Figura 1E) retornaram aos valores de EV0 em EV4 ( $p = 0,251$ ;  $p = 0,326$ ).

Em EV1 (Figura 1H), apenas AG apresentou diferença significativa em relação a CG ( $p = 0,006$ ). Em EV2 (Figura 1I), AG, AC, APLD, APHD ( $p < 0,0001$ ) e APLDC ( $p = 0,003$ ) tiveram valores maiores que CG. Em EV3 (Figura 1J), APLD ( $p = 0,523$ ) e APLDC ( $p = 0,672$ ) foram iguais a CG, e em EV4 (Figura 1K), AC ( $p = 0,412$ ), APLD ( $p = 0,318$ ), APHD ( $p = 0,705$ ) e APLDC ( $p = 0,572$ ) apresentaram valores iguais a CG.

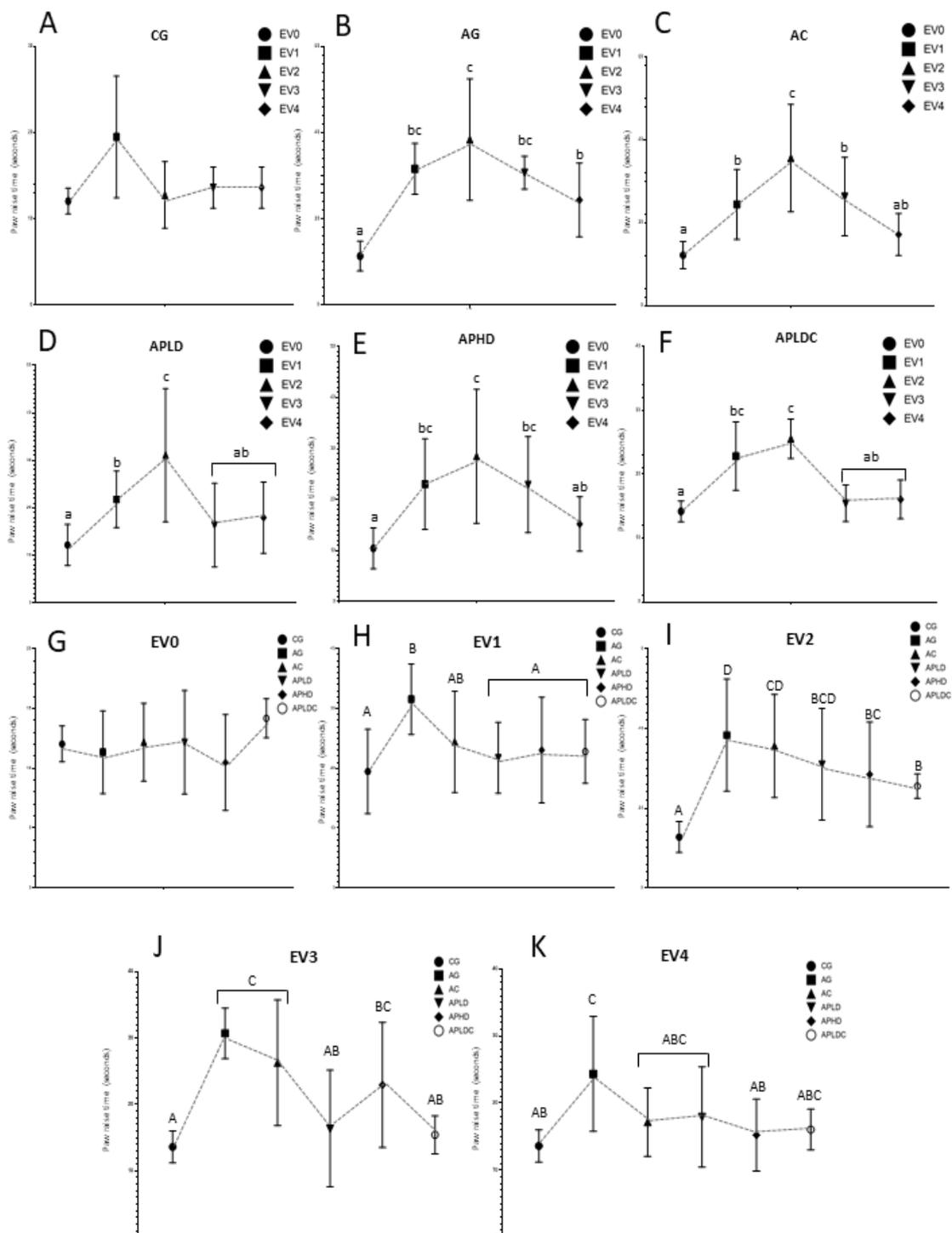


Figura 1: Resultados do teste de tempo de elevação da pata em segundos (s). Grupo Controle (CG), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcuma (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD), Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcuma (APLDC), Avaliação 0 (EV0), Avaliação 1 (EV1), Avaliação 2 (EV2), Avaliação 3 (EV3) e Avaliação 4 (EV4). Letras diferentes representam valores diferentes. Os valores estão expressos em média  $\pm$  DP. Foi utilizado um teste de modelos lineares generalizados mistos com pós-teste de Fisher (LSD) ( $p = 0,05$ ). A-F: resultados entre as avaliações. G-K: resultados entre os grupos.

### 5.2.2. Força de preensão

NA força de preensão não houve interação entre grupos e EVs ( $p=0,876$ ). No entanto, foram observadas diferenças entre os grupos ( $p<0,0001$ ) (Figura 2.1 A) e entre os EVs ( $p<0,0005$ ) (Figura 2.2 A-F).

Entre os grupos, todos diferiram do CG ( $p<0,0001$ ). AG teve o menor valor de força muscular, não estatisticamente diferente de APLD ( $p=0,139$ ), seguido por APHD. AC e APLDC, por outro lado, obtiveram valores mais próximos do CG (AC:  $p=0,0001$ , APLDC:  $p=0,0002$ ) (Figura 2.1 A).

Entre as avaliações, todos os grupos com artrite experimental (AG, AC, APLD, APHD e APLDC) apresentaram valores mais baixos em EV1, realizado 24 horas após a injeção intra-articular, e em EV2, quando comparados a EV0 (EV1:  $p<0,0002$ , EV2:  $p<0,0005$ ). E em EV4, os valores foram iguais a EV0 ( $p=0,827$ ) (Figura 2.2 A-F).

### 5.2.3. Plano inclinado

Na avaliação da função motora, realizada através do teste do plano inclinado, foram observadas diferenças entre os grupos ( $p=0,008$ ) (Figura 2.1 B-F), entre as avaliações ( $p<0,0008$ ) (Figura 2.2 G-L), e houve interação entre grupos e avaliações ( $p=0,007$ ).

Entre os grupos, em EV1, AC ( $p=0,003$ ), APLD ( $p=0,002$ ) e APHD ( $p=0,009$ ) tiveram valores reduzidos quando comparados com AG. Em EV2, AG ( $p=0,015$ ), APLD ( $p=0,009$ ) e APHD ( $p=0,0001$ ) foram diferentes de CG, enquanto AC ( $p=0,060$ ) e APLDC ( $p=0,089$ ) já mostraram recuperação nos valores. Em EV3, todos os grupos tratados tiveram os mesmos valores que CG (AC:  $p=0,259$ , APLD:  $p=0,187$ , APHD:  $p=0,710$ , APLDC:  $p=0,256$ ). Em EV4, APLD teve uma nova queda nos valores e diferiu de CG ( $p=0,005$ ), assim como AG ( $p=0,024$ ), que manteve valores baixos em todos os EVs. Por outro lado, AC ( $p=0,256$ ), APHD ( $p=0,850$ ) e APLDC mantiveram valores iguais ao CG (Figura 2.1 B-F).

Dentro dos grupos ao longo dos EVs, AG, APLD e APLDC tiveram diminuição nos valores em EV1 (AG:  $p=0,002$ , APLD:  $p<0,0002$ , APLDC:  $p=0,003$ ), que se mantiveram até EV4 (AG:  $p=0,005$ , APLD:  $p<0,001$ , APLDC:

$p=0,038$ ). AC ( $p=0,002$ ) e APHD ( $p=0,002$ ) também tiveram valores reduzidos em EV1, mas APDH retornou aos valores iniciais em EV3 ( $p=0,090$ ), que se mantiveram até EV4 ( $p=0,446$ ), e AC em EV4 ( $p=0,186$ ). CG teve valores iguais em todos os EVs (Figura 2.2 G-L).

#### 5.2.4. *Von Frey*

O limiar nociceptivo, obtido por meio do teste de *Von Frey*, apresentou diferença entre os grupos ( $p<0,0001$ ) (Figura 2.1 G-K), avaliações ( $p<0,0008$ ) (Figura 2.2 M-R) e interação entre ambos ( $p<0,0002$ ).

Entre os grupos, todos os animais que sofreram indução de artrite tiveram redução nos valores de EV1 ( $p<0,0001$ ), que se manteve até a última EV. Porém, na EV4 todos os grupos tratados apresentaram valores superiores ao AG ( $p<0,0001$ ) e o APHD apresentou valores iguais ao GC ( $p=0,061$ ) (Figura 2.1 G-K).

Dentro dos grupos ao longo da EVS, foi possível perceber que GA e APLD tiveram diminuição dos valores de AV1 quando comparados a AV0 ( $p<0,0001$ ), que se manteve até AV4 (GA:  $p<0,0004$ , APLD:  $p=0,0001$ ). Isso também aconteceu com AC ( $p<0,0009$ ), APHD ( $p<0,0006$ ) e APLDC ( $p<0,0007$ ) em EV1. Porém, na EV4 AC ( $p=0,384$ ), APHD ( $p=0,769$ ) e APLDC ( $p=0,892$ ) retornaram aos valores iniciais (Figura 2.2 M-R).

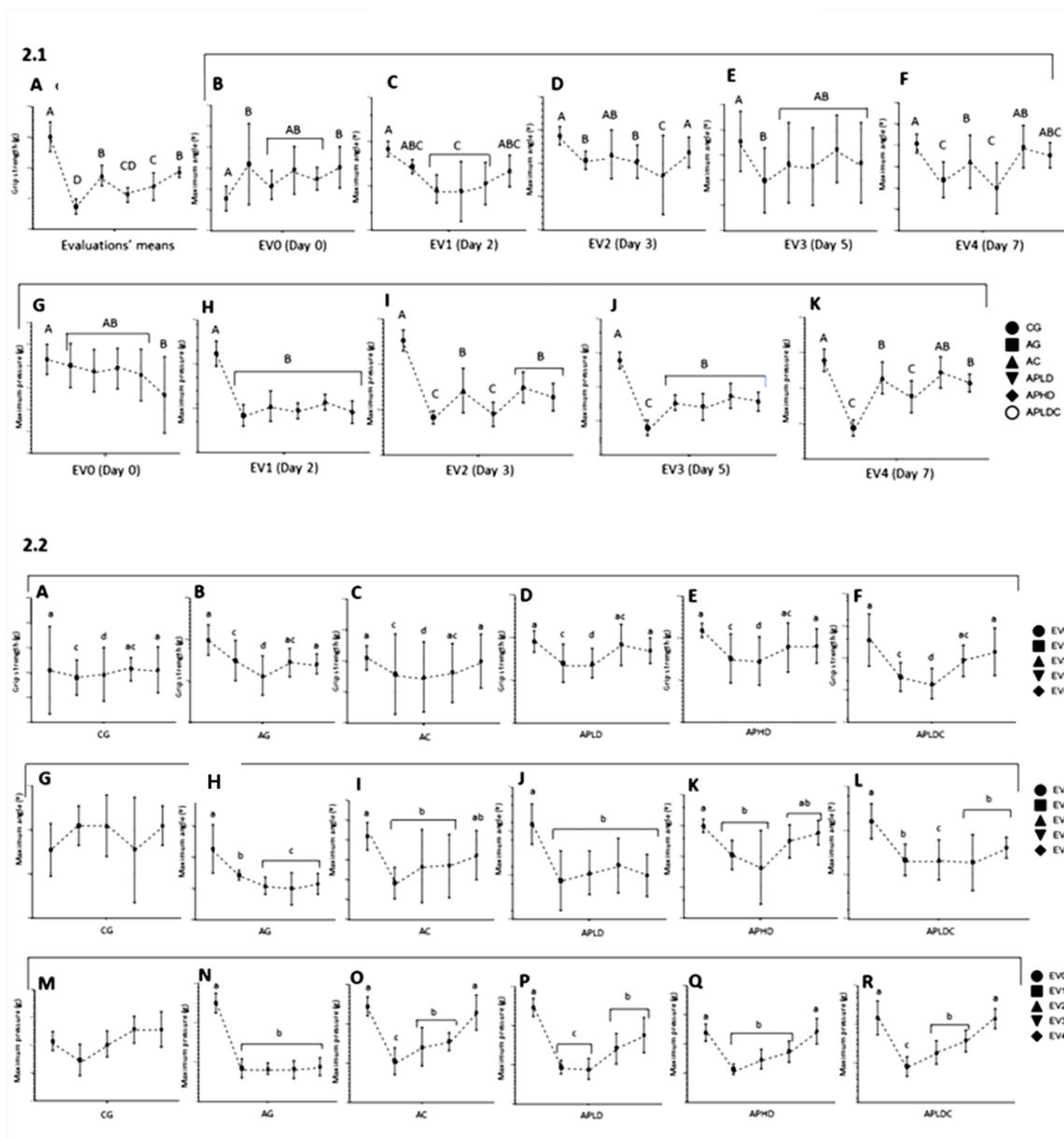


Figura 2: Estão indicados: Grupo Controle (CG), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcumina (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD), Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC), Avaliação 0 (EVO), Avaliação 1 (EV1), Avaliação 2 (EV2), Avaliação 3 (EV3) e Avaliação 4 (EV4). Letras diferentes representam valores diferentes. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. Foi utilizado teste de modelos lineares generalizados mistos com pós-teste de *Fisher* (LSD) ( $p = 0,05$ ). 2.1: Resultados dos testes funcionais entre grupos ao longo das avaliações. A: Força de preensão (g). B-F: Ângulo máximo alcançado pelos animais durante as avaliações no plano inclinado ( $^{\circ}$ ). G-K: Pressão máxima suportada pelos animais durante o teste de Von Frey (g). 2.2: Resultados dos testes funcionais dentro dos grupos ao longo das avaliações. A-F: Força de preensão (g). G-L: Ângulo máximo alcançado pelos animais durante as avaliações no plano inclinado ( $^{\circ}$ ). M-R: Pressão máxima suportada pelos animais durante o teste de *Von Frey* (g).

### 5.3. ASPECTOS INFLAMATÓRIOS

#### 5.3.1. Aspecto inflamatório macroscópico- edema

O diâmetro articular mostrou diferenças entre as avaliações (Figura 3 A-F) ( $p < 0,0003$ ), grupos (Figura 3 G-K) ( $p < 0,0007$ ) e interação entre grupos e avaliações ( $p < 0,0001$ ).

Dentro dos grupos, CG não apresentou diferença ao longo de todas as avaliações (Figura 3A). Todos os grupos com artrite tiveram grande aumento nos valores do diâmetro articular em EV1, 24 horas após a injeção intra-articular ( $p < 0,0001$ ) (Figura 3B-F). AG (Figura 3B) ( $p < 0,0001$ ), AC (Figura 3C) ( $p < 0,0001$ ), APLD (Figura 3D) ( $p < 0,0001$ ), APHD (Figura 3E) (EV1 e EV2:  $p < 0,0001$ ; EV3:  $p = 0,001$ ; EV4:  $p = 0,012$ ) e APLDC (Figura 3F) (EV1, EV2 e EV3:  $p < 0,0001$ ; EV4:  $p = 0,014$ ) não recuperaram os valores iniciais quando comparados a EV0.

Entre os grupos, em EV1 (Figura 3H), todos os grupos com artrite foram diferentes do CG ( $p < 0,001$ ), mas o AC foi o único diferente do AG ( $p = 0,039$ ). No EV2 (Figura 3I), os grupos com artrite mantiveram os valores mais altos que o CG ( $< 0,0001$ ), no entanto, o AC ( $p = 0,005$ ), APHD e APLDC ( $p < 0,0001$ ) também foram diferentes do AG, enquanto o APLD não foi ( $p = 0,60$ ). Em EV3 (Figura 3J), todos os grupos ainda foram diferentes do CG (AG, AC e APLD:  $p < 0,001$ ; APHD:  $p = 0,0012$ ; APLDC:  $p = 0,001$ ), porém todos os grupos tratados também foram diferentes de AG ( $p < 0,0001$ ). Em EV4 (Figura 3K), os grupos tratados mantiveram valores menores que o AG ( $p < 0,001$ ). Quando comparados ao CG; AG, AC, APLD ( $p < 0,001$ ) e APLDC ( $p = 0,044$ ) continuaram com diâmetros maiores, enquanto o APHD obteve valores iguais ( $p = 0,112$ ).

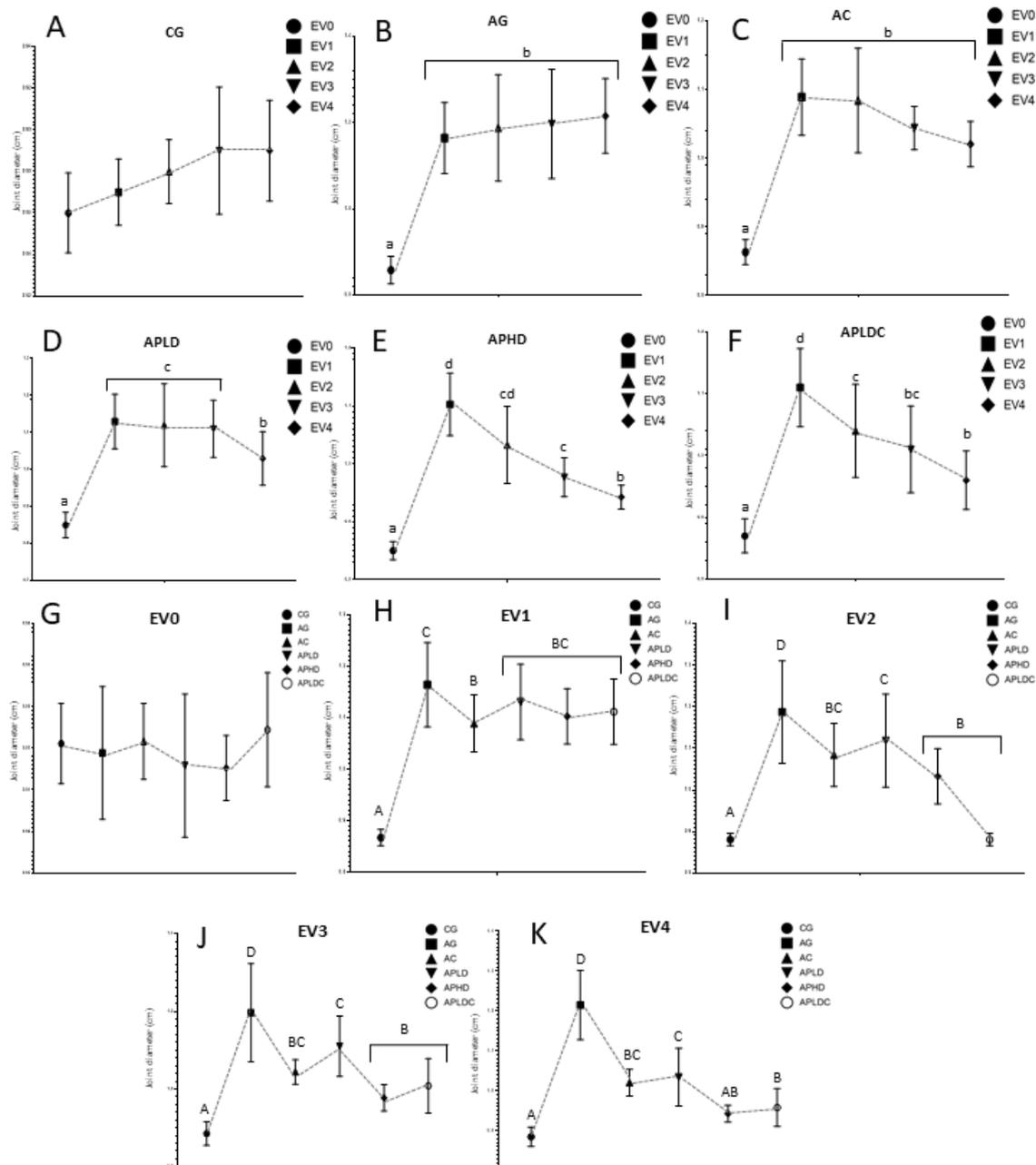


Figura 3: Resultados do edema em centímetros (cm). Grupo Controle (CG), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcumina (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD), Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC), Avaliação 0 (EV0), Avaliação 1 (EV1), Avaliação 2 (EV2), Avaliação 3 (EV3) e Avaliação 4 (EV4). Letras diferentes representam valores diferentes. Os valores estão expressos como média  $\pm$  DP. Foi utilizado o teste de modelos lineares generalizados com teste pós-teste de Fisher (LSD) ( $p = 0,05$ ). A-F: Resultados entre as avaliações. G-K: Resultados entre os grupos.

### **5.3.2. Aspectos inflamatórios microscópicos – Contagem de migração total de leucócitos e quantificação das concentrações de Fator de Necrose Tumoral $\alpha$**

No número total de leucócitos no líquido sinovial (Figura 4B), os grupos AG apresentaram a contagem mais alta: AG, AC, APLD ( $p=0,002$ ), APHD ( $p=0,010$ ) e APLDC ( $p=0,013$ ). No entanto, APHD e APLDC ( $p=0,004$ ) foram diferentes de AG, enquanto AC ( $p=0,883$ ) e APLD ( $p=0,557$ ) não diferiram.

Na quantificação do TNF  $\alpha$  (Figura 4C), APLD e APHD apresentaram as concentrações mais altas ( $p<0,0001$ ), AG também diferiu do controle ( $p=0,007$ ). Por outro lado, AC ( $p=0,080$ ) e APLDC ( $p=0,346$ ) tiveram concentrações iguais às do CG.

### **5.4. ASPECTO OXIDATIVO – CONCENTRAÇÕES DE LIPOPEROXIDAÇÃO NO PLASMA SANGUÍNEO**

Ao avaliar as concentrações de peroxidação lipídica no plasma sanguíneo (Figura 4A), observou-se que o grupo AG apresentou o resultado mais alto em relação a todos os outros grupos. Comparado ao CG, AG ( $p<0,0001$ ) e APHD ( $p=0,035$ ) tiveram a maior diferença, enquanto AC ( $p=0,5$ ), APLD ( $p=0,506$ ) e APLDC ( $p=0,690$ ) estavam com as mesmas concentrações. Em relação às comparações com o AG; CG, APLDC ( $p<0,0001$ ), AC, APHD ( $p=0,005$ ) e APLD ( $p=0,001$ ) apresentaram valores mais baixos.

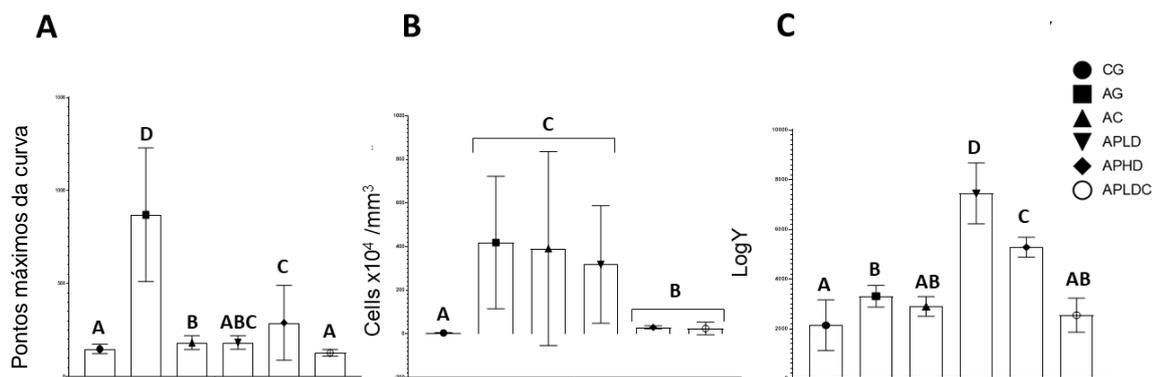


Figura 4: Resultados da lipoperoxidação e inflamação microscópica. Grupo Controle (CG), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcumina (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD), Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Letras diferentes representam valores diferentes. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. Foi utilizado o teste de modelos lineares generalizados com pós-teste de Fisher (LSD) ( $p = 0,05$ ). A: Resultados das concentrações de lipoperoxidação no plasma sanguíneo expressos através dos pontos máximos da curva. B: Resultados da contagem total de migração de leucócitos no líquido sinovial (Células  $\times 10^4$  /mm<sup>3</sup>). C: Resultados da quantificação do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  nos linfonodos poplíteos (Log Y).

## 5.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-FEMORAL E ESTRUTURAS PERIARTICULARES

### 5.5.1. Análise morfológica qualitativa e semiquantitativa da articulação tíbio-femoral

Na análise morfológica qualitativa e semiquantitativa, foi possível observar morfologia característica nos grupos CG, AC e APLDC. As cartilagens articulares do fêmur e da tíbia apresentavam superfícies articulares lisas e condrócitos organizados em quatro camadas celulares. Na zona superficial, as células foram identificadas com maior densidade e dispostas horizontalmente em grupos achatados. Na zona intermediária, os condrócitos assumiram forma arredondada e dispostas em grupos isóginos. Na zona profunda, os condrócitos estavam organizados em lacunas e separados da zona calcificada pela *tidemark*, uma linha basofílica. O osso subcondral também apresentou aparência normal tanto no fêmur (AC:  $p=1,00$  e APLDC:  $p=0,485$ ) quanto na tíbia (AC:  $p=0,670$  e APLD:  $p=0,658$ ) (Figura 5, A-B, G-H, P-Q e S-T).

Na membrana sinovial, foi possível notar morfologia característica com 2-3 camadas de células, sinoviócitos dos tipos A e B na íntima sinovial, e subíntima com predominância de células adiposas no CG (Figura 5, C e U). No entanto, os animais dos grupos AG, APLD e APHD, quando comparados ao

CG, apresentaram estrutura completamente degradada na cartilagem articular com superfície floculada, presença de *pannus*, condrócitos desorganizados e ausência da *tidemark* em alguns animais devido à exposição do osso subcondral, tanto no fêmur quanto na tíbia ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5, D-E, J-K, M-N e S-T).

Ainda em relação à membrana sinovial, também foi possível observar que esses mesmos grupos apresentavam grande espessamento da íntima com muitas camadas de células e a subíntima revelou angiogênese com muitos vasos sanguíneos, túrgidos de hemácias e com células inflamatórias no interior dos vasos ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5, F, L, O e U). E, embora nenhum dos grupos tivesse a mesma histologia do CG, o grupo AC foi diferente do AG (Figura 4, I e U) ( $p = 0,001$ ) e APLDC foi igual ao AC (Figura 5, R e U) ( $p = 0,057$ ).

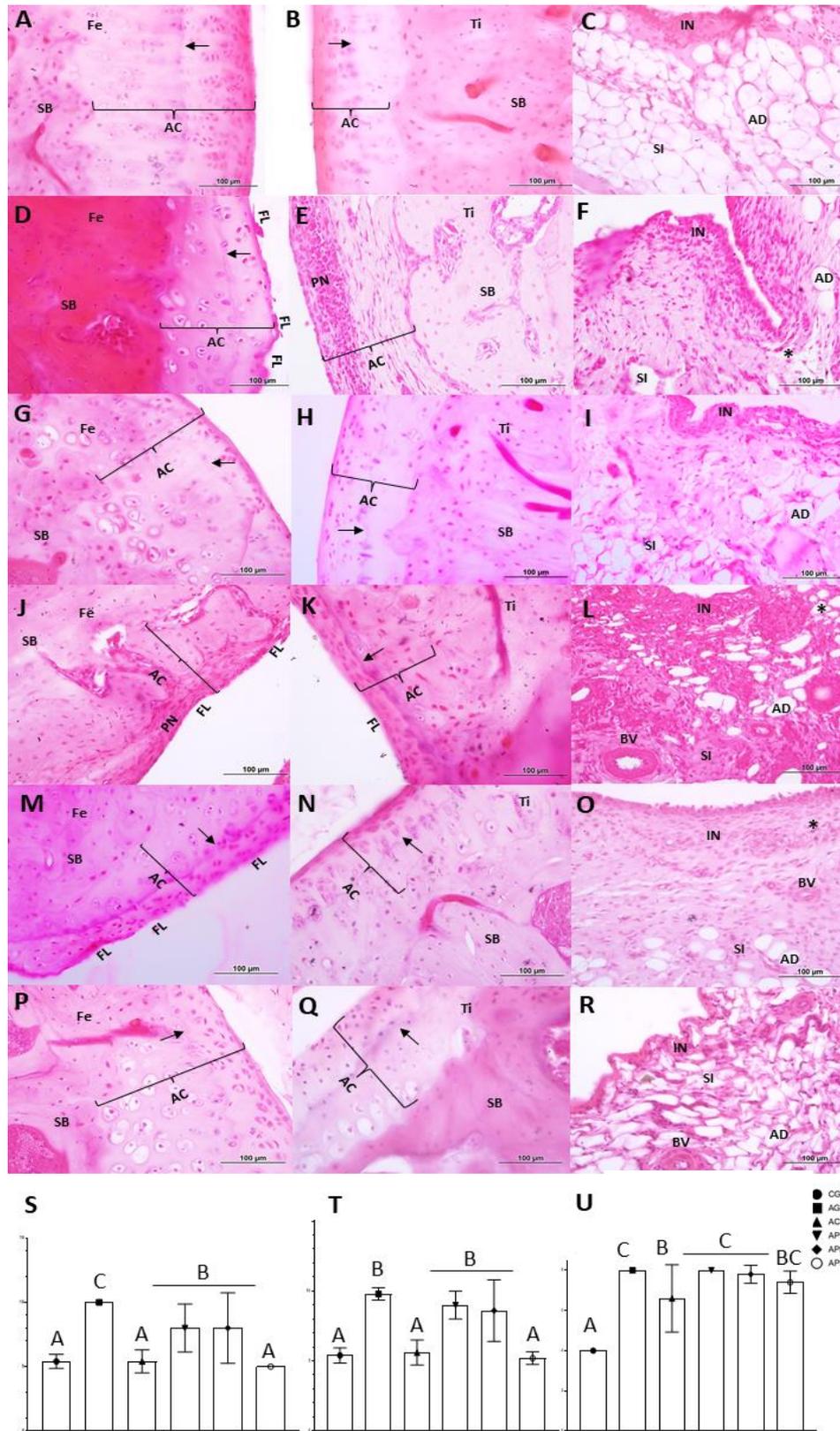


Figura 5: Fotomicrografias das articulações tíbio-femorais de ratas *Wistar* fêmeas de 18 meses, coradas com HE e resultados morfológicos semiquantitativos. A, D, G, J, M e P: Fotomicrografias da cartilagem articular do fêmur. B, E, H, K, N e Q: Fotomicrografias da cartilagem articular da tíbia. C, F, I, L, O e R: Fotomicrografias da membrana sinovial da articulação tibiofemoral. A-C: Grupo Controle; D-F: Grupo Artrite; G-I: Artrite Curcumina; J-L: Artrite Prednisona Dose Alta; M-O: Artrite Prednisona Dose Baixa; P-R: Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina. Indicações: fêmur (Fe), tíbia (Ti), cartilagem articular (AC), osso subcondral

(SB), *tidemark* (seta), floculação (FL), *pannus* (PN), camada íntima (IN), camada subíntima (SI), vasos sanguíneos (BV), adipócitos (AD) e infiltrado inflamatório (\*). S: Pontuações máximas da morfologia da cartilagem articular do fêmur; T: Pontuações máximas da morfologia da cartilagem articular da tíbia; U: Pontuações máximas da morfologia da membrana sinovial. Indicações: Grupo Controle (CG); Grupo Artrite (AG); Artrite Curcumina (AC); Artrite Prednisona Dose Alta (APHD); Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD); Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. Foi utilizado o teste de modelos lineares generalizados com pós-teste de *Sidak* ( $p = 0,05$ ).

### **5.5.2. Análise semiquantitativa das características inflamatórias de estruturas periarticulares e musculatura periarticular das articulações tíbio-femorais**

No grupo controle (CG), foi possível observar aspectos normais em toda a membrana sinovial (Figura 6A), no tecido ósseo (Figura 6B) e na musculatura periarticular, com fibras predominantemente poligonais, organizadas em fascículos de tecido conjuntivo, com núcleos periféricos, vasos sanguíneos e tecido nervoso com aparência característica (Figura 6C).

No entanto, em todos os animais artríticos, foi possível observar uma massa de células inflamatórias em algumas estruturas periarticulares do fêmur e da tíbia. Em AG (Figura 6 D-F), APLD (Figura 6J-L) e APHD (Figura 6M-O), essas células estavam organizadas como uma grande massa na membrana sinovial, rodeando o periósteo e a musculatura periarticular, configurando uma pontuação inflamatória mais alta quando comparada ao GC ( $p < 0,0001$ ). AC e APLDC também diferiram do CG ( $p < 0,0001$ ), mas AC foi diferente de AG (Figura 5G-I) ( $p = 0,002$ ) e APLC foi igual a AC ( $p = 0,110$ ) (Figura 6P-R), o que resultou em uma pontuação inflamatória mais baixa (Figura 6S).

Em relação à musculatura periarticular, AG (Figura 6F), APLD (Figura 6L), APHD (Figura 6O) e APLDC (Figura 6R) tiveram a pontuação mais alta (Figura 6T) quando comparados ao CG ( $p < 0,0001$ ) devido a distúrbios circulatórios, alterações nas fibras musculares e no tecido conjuntivo. AC também foi diferente do GC ( $p = 0,001$ ), mas mostrou alguma recuperação, sendo o único grupo que diferiu de AG nesses aspectos ( $p = 0,001$ ).

Considerando todos os aspectos semiquantitativos da articulação tíbio-femoral, os aspectos inflamatórios das estruturas periarticulares e as características da musculatura periarticular, a análise total mostrou que AG, APLD e APHD tiveram as pontuações mais altas quando comparados ao CG ( $p < 0,0001$ ). AC e APLDC foram iguais entre si ( $p = 0,105$ ) e também diferiram do

CG ( $p < 0,0001$ ), mas tiveram pontuação mais baixa quando comparados a AG, APLD e APHD ( $p < 0,0001$ ) (Figura 6U).

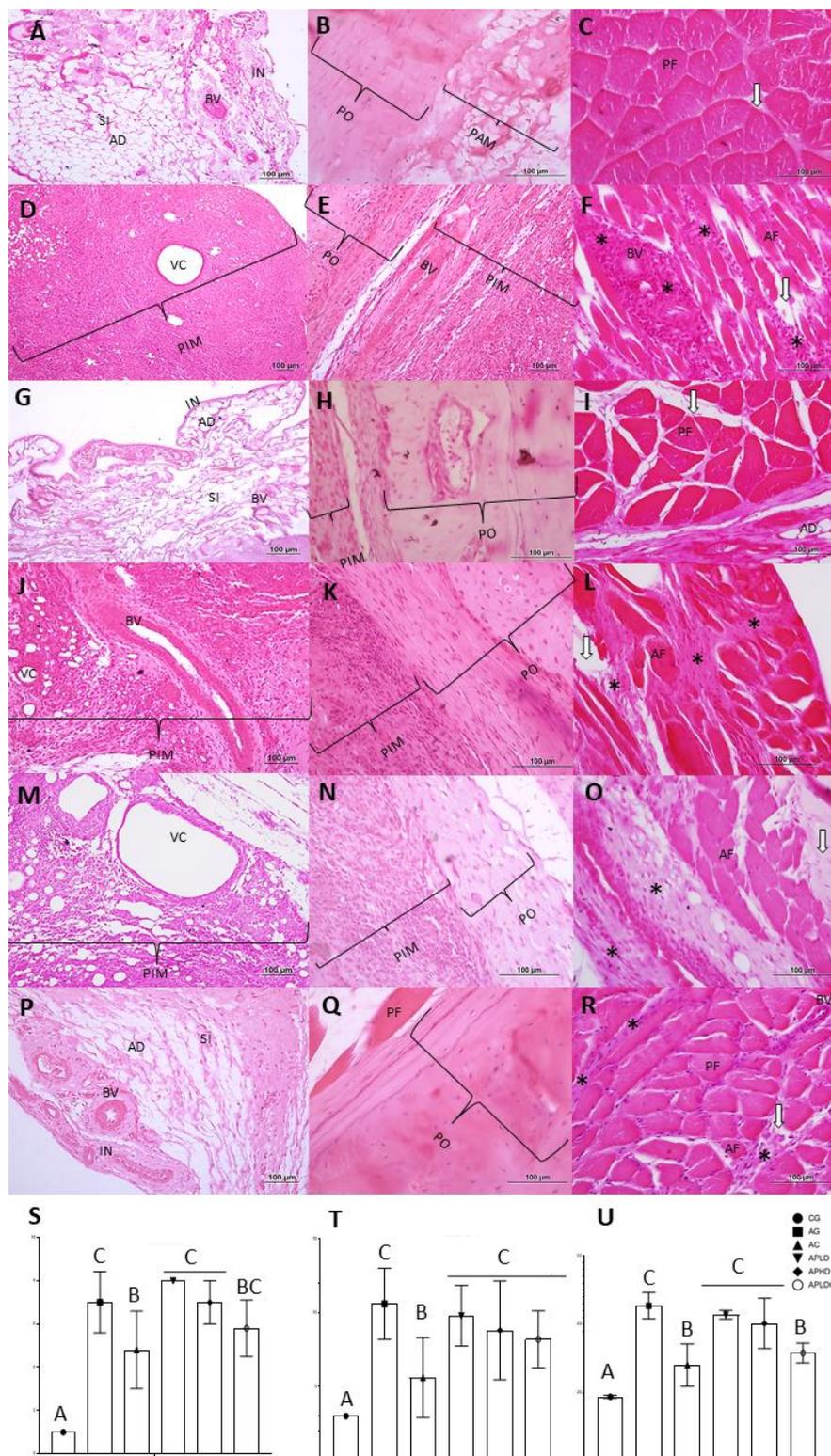


Figura 6: Fotomicrografias das estruturas periarticulares das articulações tíbio-femorais de ratas *Wistar* fêmeas de 18 meses, coradas em HE, e resultados morfológicos semiquantitativos. A, D, G, J, M e P: Fotomicrografias dos aspectos inflamatórios na membrana sinovial. B, E, H, K, N e Q: Fotomicrografias dos aspectos inflamatórios no periósteo. C, F, I, L, O e R: Fotomicrografias do tecido muscular periarticular. A-C: Grupo Controle; D-F: Grupo

Artrite; G-I: Artrite Curcumina; J-L: Artrite Prednisona Dose Alta; M-O: Artrite Prednisona Dose Baixa; P-R: Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina. Indicações: íntima (IN), subíntima (SI), vaso sanguíneo (BV), adipócito (AD), vacuolização no tecido inflamatório (VC), massa inflamatória periarticular (PIM), periósteo (PO), membrana periarticular (PAM), fibra poligonal (PF), tecido conjuntivo (seta branca), fibra anormal (AF), célula inflamatória (\*). S: Score inflamatório periarticular; T: Score da musculatura periarticular; U: Score periarticular total. Indicações: Grupo Controle (CG); Grupo Artrite (AG); Artrite Curcumina (AC); Artrite Prednisona Dose Alta (APHD); Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD); Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. Foi utilizado o teste de modelos lineares generalizados com pós-teste de *Sidak* ( $p = 0,05$ ).

## 5.6. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO MÚSCULO RETO FEMORAL

### 5.6.1. Análise morfológica

Na análise morfológica qualitativa, pôde ser observada morfologia característica do músculo reto femoral no grupo controle (CG), com fibras predominantemente poligonais, organizadas em fascículos de tecido conjuntivo e com núcleos periféricos, vasos sanguíneos e tecido nervoso com aparência característica (Figura 7A e H).

Todos os grupos artríticos apresentaram alterações gerais no músculo e tecidos associados, distúrbios circulatórios, alterações nas fibras musculares e no tecido conjuntivo. No entanto, o grupo AG apresentou mudanças severas e extensas. Nas fibras musculares, foi possível notar fibras atroficas, arredondadas e degeneradas. As estruturas de nervos, fusos musculares e tecido conjuntivo foram afetadas pela presença de tecido adiposo e processos inflamatórios. Os vasos sanguíneos apresentaram aumento no fluxo sanguíneo, o que levou ao aumento da permeabilidade celular devido à presença de inflamação. Os núcleos foram encontrados em maior quantidade, com halo basofílico, e núcleos centrais foram comumente observados (Figuras 7B, C e H).

Nos grupos tratados, embora também fosse possível observar essas alterações, elas foram mais leves e menos extensas, principalmente com uma maior organização das fibras musculares (Figura 7D-H). No entanto, o grupo APLDC foi o que pareceu ter maior organização tecidual e menos alterações, sendo o que mais se assemelhava ao CG (Figura 7 G, H).

Na avaliação quantitativa histopatológica, foi possível confirmar as características encontradas na análise morfológica com diferença significativa ( $p < 0,0001$ ). Quando comparado ao CG, AG teve o maior escore ( $p < 0,0001$ ) (Figura 7H), seguido por AC, APLD e APHD ( $p < 0,0001$ ). APLDC teve o menor escore entre os grupos tratados, com diferença menor em relação ao CG ( $p = 0,001$ ) (Figura 7H).

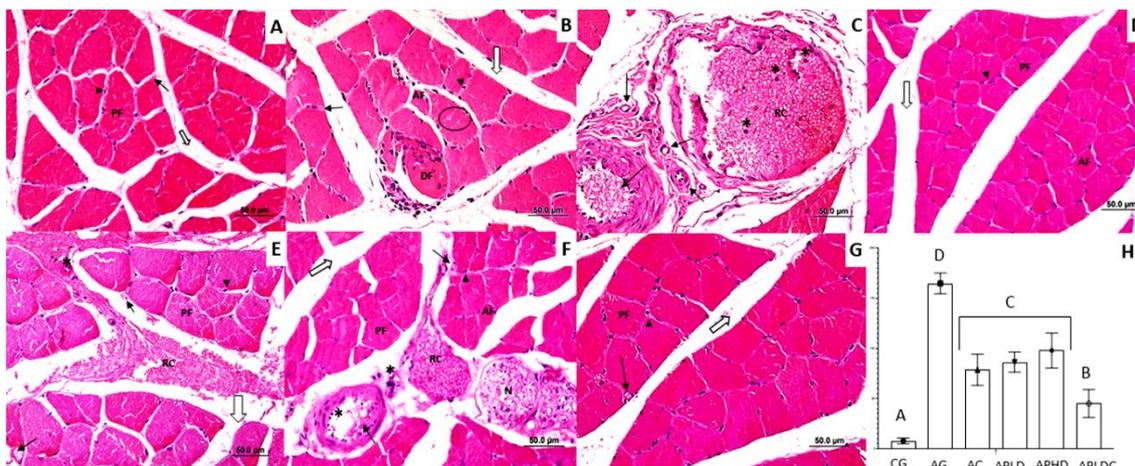


Figura 7: Fotomicrografias do músculo Reto Femoral de ratas *Wistar* fêmeas, de 18 meses em secção transversal coradas com HE. A: Grupo Controle (CG), apresentando aspectos padrão com fibras poligonais (PF), núcleos periféricos (seta preta), cobertas por tecido conjuntivo (setas brancas), vasos sanguíneos e nervos entrando no músculo através de feixes associados a projeções de tecido conjuntivo (seta preta). B-C: Grupo Artrite (AG) com mudanças acentuadas mostrando fibras degeneradas (DF), fibras anormais (AF), núcleos centralizados (círculo preto), alterações no arranjo do tecido conjuntivo (seta branca), hipertrofia nos vasos sanguíneos (seta preta) com hemácias (RC), e células inflamatórias (\*). D: Grupo Artrite Curcumina (AC) com fibras poligonais (PF), núcleos periféricos (seta preta), alterações no arranjo do tecido conjuntivo (seta branca). E: Grupo Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD) apresentando fibras poligonais (PF), núcleos periféricos (seta preta), tecido conjuntivo (seta branca), vasos sanguíneos (seta preta), hemácias (RC) no tecido conjuntivo e células inflamatórias. F: Grupo Artrite Prednisona Dose Alta (APHD) indicando fibras poligonais (PF), alterações no arranjo do tecido conjuntivo (setas brancas), núcleos periféricos (seta preta), fibras anormais (AF), vasos sanguíneos (setas pretas) com hemácias (RC), nervos (N) e células inflamatórias (\*). G: Grupo Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC) com fibras poligonais (PF), núcleos periféricos (seta preta), vaso sanguíneo (seta preta) e tecido conjuntivo (seta branca). H: Médias de danos no tecido muscular do músculo Reto Femoral. Grupo Controle (CG), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcumina (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD) e Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Letras diferentes representam valores diferentes. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. Foi utilizado o teste de modelos lineares generalizados mistos, com pós-teste de Fisher (LSD) ( $p = 0,05$ ).

### **5.6.2. Análise histomorfométrica do fuso muscular**

Na análise morfológica geral, nos fusos musculares de CG, foi possível observar aparência característica com feixe de fibras musculares intrafusais fusiformes, estriadas, situadas em paralelo com os fascículos das fibras musculares extrafusais regulares e com estrutura capsular intacta (Figura 8A, G-H). No grupo AG, foi possível notar degeneração em todos os aspectos morfológicos, com desorganização completa das fibras intrafusais e da cápsula (Figura 8B).

No grupo APHD, houve mais organização quando comparado ao AG, mas ainda foi possível observar desorganização nas fibras intrafusais (Figura 8E). O grupo APLD apresentou os maiores valores de área e diâmetro ( $p=0,001$ ) (Figura 8 G-H) da cápsula quando comparado ao CG; no entanto, junto com os grupos AC e APLD, foram os que apresentaram aspectos morfológicos mais característicos e estavam mais próximos ao CG (Figura 8 C-D e F).

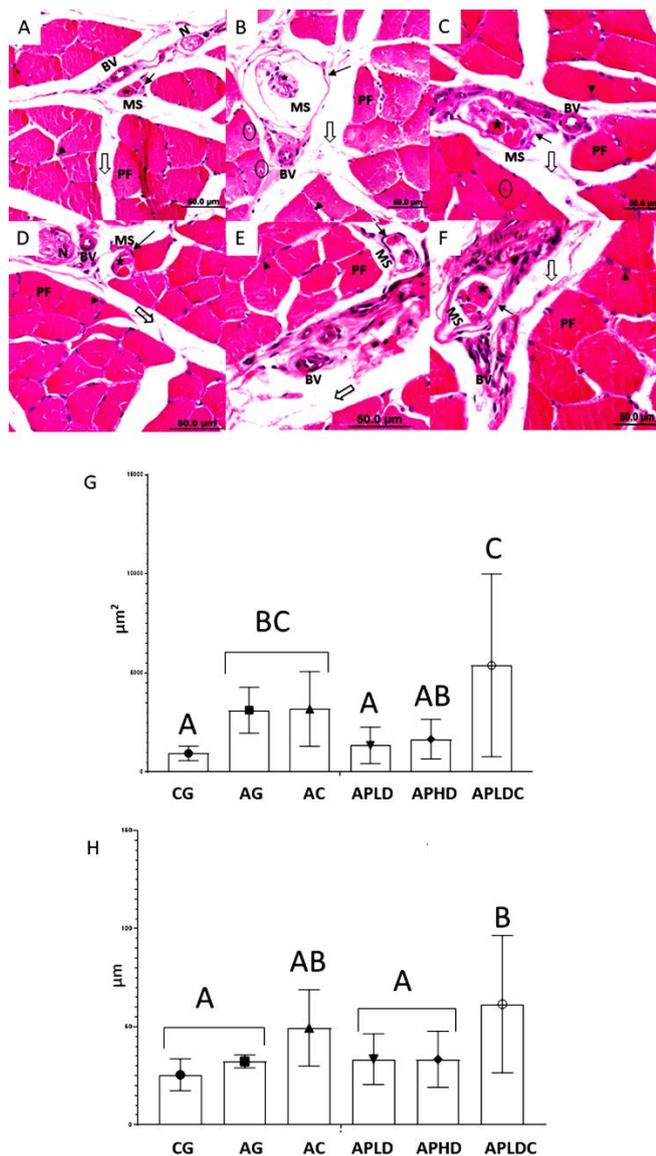


Figura 8: Fotomicrografias do músculo Reto Femoral de ratas *Wistar* fêmeas de 18 meses em secção transversal coradas com HE. A: Grupo Controle (CG), B: Grupo Artrite (AG), C: Grupo Artrite Curcumina (AC), D: Grupo Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), E: Grupo Artrite Prednisona Dose Alta (APHD), F: Grupo Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Estão indicados: fibras poligonais (PF), núcleos periféricos (seta preta), tecido conjuntivo (setas brancas), fuso muscular (MS) com fibras intrafusais (estrela) e cápsula (seta preta), núcleos centrais (círculo preto), nervos (N), vasos sanguíneos (BV). G-H: Área do fuso muscular (G) e diâmetro do fuso muscular (H). Grupo Controle (GC), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcumina (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD) e Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Letras diferentes representam valores diferentes. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. Foi utilizado o teste de modelos lineares generalizados mistos, com pós-teste de Fisher (LSD) ( $p = 0,05$ ).

### 5.6.3. Análise morfométrica geral

Na morfometria, a análise da área das fibras (Figura 9A), diâmetro maior (Figura 9B) e número total de fibras (Figura 9E) mostraram valores mais baixos em AG ( $p=0,0013$ ,  $p<0,008$ ,  $p=0,0004$ ), AC ( $p=0,008$ ,  $p=0,0011$ ,  $p=0,028$ ), APLD ( $p=0,006$ ,  $p=0,002$ ,  $p=0,007$ ) e APHD ( $p=0,002$ ,  $p=0,0001$ ,  $p=0,005$ ), quando comparados com CG. APLDC teve valores iguais ao GC ( $p=0,971$ ,  $p=0,897$ ,  $p=0,903$ ). No diâmetro menor das fibras (Figura 9C), AG teve o valor mais baixo ( $p<0,0007$ ), seguido por APHD ( $p<0,0001$ ), AC ( $p=0,002$ ) e APLD ( $p=0,001$ ). APLDC foi igual ao CG ( $p=0,840$ ).

Em relação aos núcleos, na área total (Figura 9 D), AG ( $p<0,0002$ ), AC ( $p<0,0005$ ) e APLD ( $p<0,0003$ ) tiveram os valores mais altos, seguidos por APHD ( $p=0,003$ ). APLDC foi igual a APHD ( $p=0,127$ ) e ao CG ( $p=0,131$ ). Na contagem total (Figura 9F), AG teve o valor mais alto ( $p<0,0001$ ), seguido por APLD ( $p=0,004$ ) e AC, que foi igual a AG ( $p=0,087$ ) e APLD ( $p=0,706$ ). APHD ( $p=0,563$ ) e APLDC ( $p=0,976$ ) tiveram os mesmos valores que o CG. Na contagem de núcleos centrais (Figura 9G), AG teve o valor mais alto ( $p=0,0002$ ) e AC ( $p=0,088$ ), APLD ( $p=0,234$ ), APHD ( $p=0,234$ ) e APLDC ( $p=0,844$ ) foram iguais ao CG.

Na contagem total de capilares (Figura 9H), todos os grupos foram diferentes do CG. APHD se destacou com o resultado mais alto ( $p<0,0005$ ), seguido por APLD ( $p=0,0001$ ), AG ( $p=0,003$ ), AC ( $p=0,032$ ) e APLDC ( $p=0,001$ ). As análises da razão núcleos/fibra (Figura 9I) e da razão capilares/fibra (Figura 9J) não mostraram diferença entre os grupos.

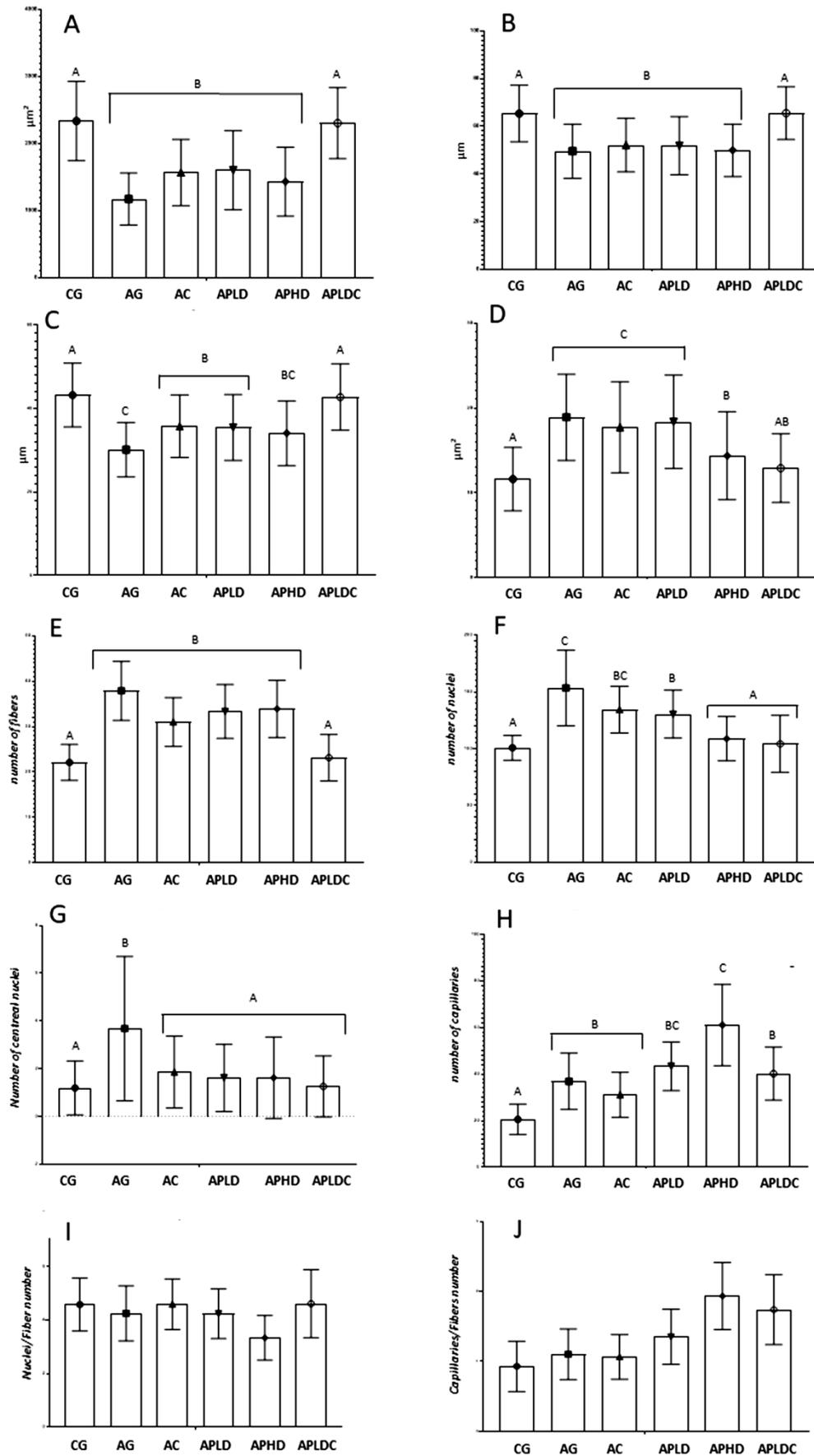


Figura 9: Resultado da análise morfométrica do músculo Reto Femoral. Grupo Controle (CG), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcumina (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD), Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Letras diferentes representam valores diferentes. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. Foi utilizado o teste de modelos lineares generalizados mistos, com pós-teste de *Fisher* (LSD) ( $p = 0,05$ ). A: Área total da fibra. B: Diâmetro maior da fibra. C: Diâmetro menor da fibra. D: Área dos núcleos. E: Número total de fibras. F: Número total de núcleos. G: Quantidade de núcleos centrais. H: Número total de capilares. I: Razão Núcleos/Fibra. J: Razão Capilares/Fibras.

### 5.6.3. Análise morfométrica de colágeno

Na quantificação do colágeno total, houve diferença entre os grupos ( $p < 0,0004$ ). Comparado ao CG, o grupo AG teve o valor mais alto ( $p < 0,0004$ ), seguido por AC, APHD, APLD ( $p = 0,001$ ) e APLDC ( $p = 0,003$ ) (Figura 10 A-G). Na quantificação do colágeno tipo I (vermelho), todos os grupos artríticos apresentaram quantidade maior quando comparados ao CG. AG e APHD com  $p = 0,002$ , AC com  $p = 0,005$ , APLD com  $p = 0,001$  e APLDC com  $p = 0,003$  (Figura 10 A-F, H).

A quantificação do colágeno tipo III (verde) não mostrou diferença entre os grupos ( $p = 0,648$ ) (Figura 10 I).

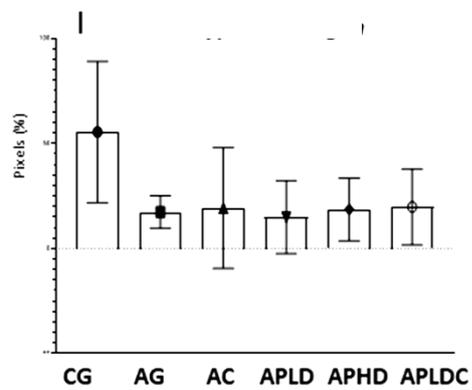
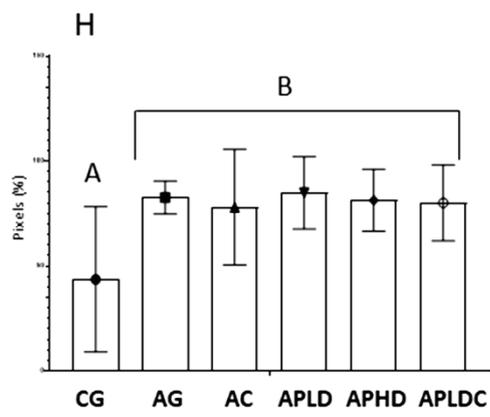
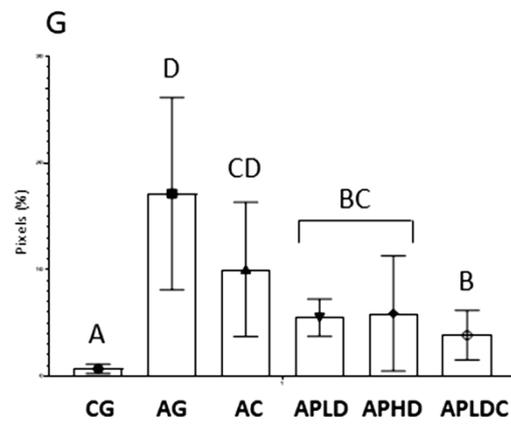
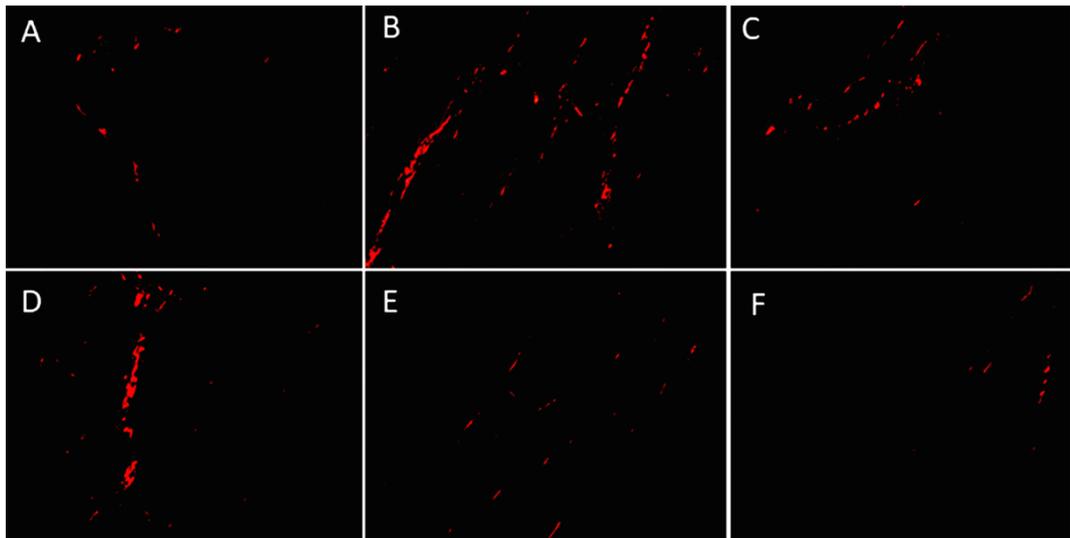


Figura 10: A-F: Fotomicrografias do músculo Reto Femoral de ratas *Wistar* fêmeas de 18 meses em secção transversal coradas com *picrosirius red*. A: Grupo Controle (CG), B: Grupo Artrite (AG), C: Grupo Artrite Curcumina (AC), D: Grupo Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), E: Grupo Artrite Prednisona Dose Alta (APHD), F: Grupo Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). G-I: Análise morfométricas da quantificação de colágeno do músculo Reto Femoral. Grupo Controle (CG), Grupo Artrite (AG), Artrite Curcumina (AC), Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD), Artrite Prednisona Dose Alta (APHD), Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). Letras diferentes representam valores diferentes. Os valores foram expressos como média  $\pm$  DP. Foi utilizado o teste de modelos lineares generalizados mistos, com pós-teste de *Fisher* (LSD) ( $p = 0,05$ ). G: Quantificação total de colágeno. H: Quantificação de colágeno do Tipo I. I: Quantificação de colágeno do Tipo III.

#### 5.6.4. Morfometria das junções neuromusculares

Os aspectos morfológicos da região pós-sináptica imunomarcada foram analisados e os grupos não mostraram grandes diferenças nesse aspecto. Todos apresentaram morfologia compacta com *clusters* arredondados, como é característico nessa estrutura (Figura 11A-F).

Quanto à morfometria, o grupo APLDC apresentou maior perímetro total (CG  $p=0,0025$ , AG  $p=0,0097$ , AC  $p=0,0003$ , APLD  $p=0,0002$ , APHD  $p<0,0001$ ) (Figura 11 H). E na área corada ( $p=0,0143$ ) (Figura 11I), perímetro corado ( $p=0,0275$ ) (Figura 11 J), diâmetro mínimo ( $p=0,0346$ ) (Figura 11L), relação g ( $p=0,0369$ ) (Figura 11M) e compacidade ( $p=0,0310$ ) (Figura 11N), o grupo APLDC diferiu apenas do grupo APHD.

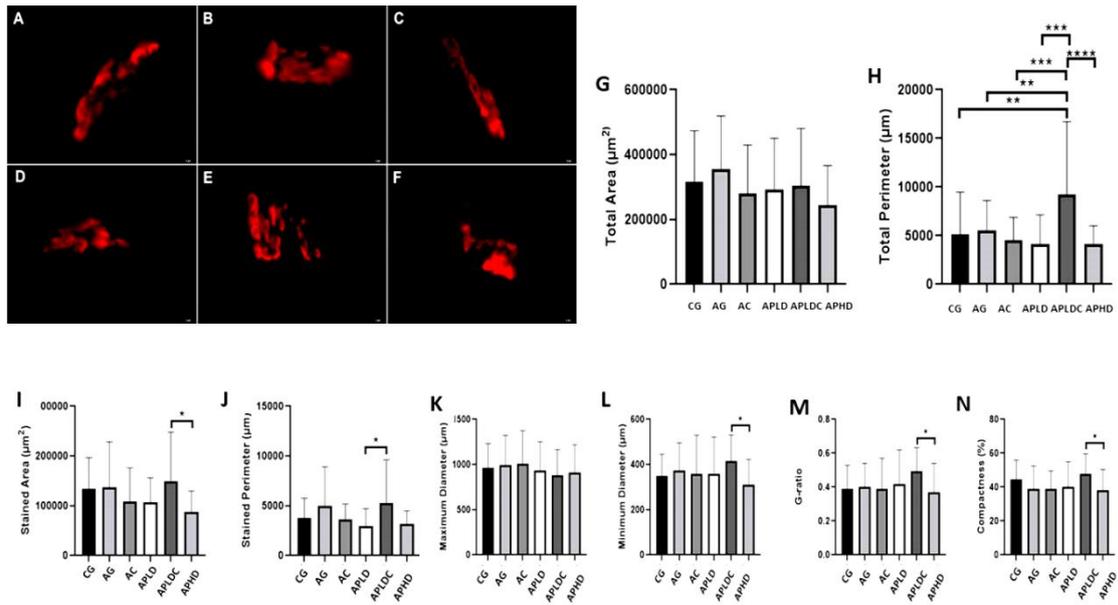


Figura 11: A-F: Fotomicrografias da região pós-sináptica da junção neuromuscular com imunomarcagem dos grupos experimentais. As imagens mostram as diferentes disposições das áreas de ativação da acetilcolina em relação aos protocolos. A: Grupo Controle (CG); B: Grupo Artrite (AG); C: Grupo Artrite Curcumina (AC); D: Grupo Artrite Prednisona Dose Baixa (APLD); E: Grupo Artrite Prednisona Dose Alta (APHD); F: Grupo Artrite Prednisona Dose Baixa e Curcumina (APLDC). G-N: Análise morfométrica. Foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dun* ( $p = 0,05$ ). G: Área Total; H: Perímetro Total; I: Área corada; J: Perímetro corado; K: Diâmetro Maior; L: Diâmetro Menor; M: Q-ratio (razão Q); N: Compactação.

## 6. DISCUSSÃO

A AR é o tipo mais comum de inflamação crônica das articulações e tem alta incidência em mulheres que estão passando pelo processo de envelhecimento. Nosso estudo mostrou que 14 dias de suplementação com 100 mg/kg/dia de extrato seco de CM, no tratamento com 2 mg/kg/dia de PD, apresentaram benefícios significativos quando comparados aos grupos APHD, AG, APLD e APHD. Demonstramos os seguintes resultados principais:

***AG teve perda significativa de massa corporal e APLDC teve a melhor recuperação.***

Doenças inflamatórias crônicas diminuem o peso corporal e induzem a perda muscular. A perda muscular é uma complicação comum e importante da AR e, embora a artrite experimental induza perda de peso, há evidências que mostram que a perda pode ocorrer parcialmente devido à diminuição da ingestão de alimentos (Castillero *et al.*, 2009).

APLDC teve a melhor recuperação quando comparado a todos os outros grupos com AR. Há evidências de que os efeitos da CM em distúrbios metabólicos e condições autoimunes podem não depender apenas de sua biodisponibilidade e concentrações séricas, mas também de sua influência positiva na saúde e função gastrointestinal (Lopresti, 2018).

Alguns estudos demonstraram o efeito do CM no ganho de peso (Alghadir *et al.*, 2020). Mostraram que a administração oral de CM aumentou significativamente o peso corporal. Em resumo, a CM desempenha papel importante no sistema metabólico e gastrointestinal, através da manutenção da homeostase.

***A suplementação com CM melhorou aspectos funcionais.***

Limitações físicas que acometem pacientes com AR estão significativamente associadas a redução na elaboração de movimentos. Uma das causas dessa limitação é a fraqueza muscular, que se refere a diminuição na força muscular, como também foi observado no grupo AG em nosso estudo,

e em pacientes com AR frequentemente é atribuída a diminuição na massa muscular devido à atrofia das miofibras (Londhe; Guttridge, 2015).

Corroborando com nossos achados, Coradini *et al.* (2015) mostraram que 1,75 mg/kg de curcumina reduziu significativamente a infiltração da membrana sinovial e a fibrose. O volume da pata também foi reduzido após o tratamento com 100 mg/kg de CM (Nonose *et al.*, 2014) e o tratamento por gavagem oral com CM foi relatado como reduzindo significativamente a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica (Chen *et al.*, 2015).

***O tratamento apenas com PD melhorou o edema nas articulações e o TEP, mas não apresentou resultados positivos em outros aspectos quando comparado ao CG e aos grupos PD suplementados com CM.***

Os glicocorticoides orais de curto prazo e baixa dose são eficazes na redução da dor (Kirwan *et al.*, 2011), mas a magnitude e a duração dos benefícios são incertas na prática clínica atual. O uso prolongado está associado a problemas significativos de saúde, como a necessidade de substituição total da articulação e osteoporose (Hua *et al.*, 2020).

A mineralização óssea é o efeito colateral sistêmico mais estudado, que leva ao aumento da atividade dos osteoclastos e à excreção urinária de cálcio, enquanto diminui a atividade dos osteoblastos e a absorção gastrointestinal de cálcio, resultando na diminuição da densidade óssea (Marcus *et al.*, 1996). A redução da densidade óssea com o uso oral de glicocorticoides foi bem demonstrada em doses de prednisona ou equivalentes tão baixas quanto 2,5 a 7,5 mg diários (Grossman *et al.*, 2010).

Quanto ao tecido muscular, aumentam a susceptibilidade a infecções, miopatia, perda e atrofia muscular são outros efeitos colaterais conhecidos destes medicamentos (Marcedo *et al.*, 2016), produzindo proteólise, que causa atrofia muscular (Krug *et al.*, 2016). Também causa aumento do estresse oxidativo, o que ocorre concomitantemente com a atrofia muscular (Kim *et al.*, 2015). Dessa forma, embora os dados sejam variados, a recomendação geral é que a dose total de glicocorticoide deve ser considerada com cautela, especialmente em mulheres mais velhas (Grossman *et al.*, 2010).

Estudos anteriores encontraram que a CM pode proteger contra a perda óssea e diminuir a osteoclastogênese em modelos animais (Cho *et al.*, 2013). Há evidências mostrando que o tratamento com CM (110 mg/kg, oral por 60 dias) reverteu as alterações ósseas após a ovariectomia, indicando potencial como agente alternativo para danos no tecido ósseo (Hussan *et al.*, 2012).

Além disso, existem estudos demonstrando que a CM induz a biossíntese mitocondrial no músculo (Hamidie *et al.*, 2015). As mitocôndrias são organelas importantes que produzem energia nos músculos. O envelhecimento e condições inflamatórias são fatores que promovem a redução da densidade mitocondrial e da massa muscular (Peterson *et al.*, 2012). Dessa forma, manter ou aumentar o número de mitocôndrias pode prevenir a perda muscular (Hood *et al.*, 2011). Assim, a ingestão de CM, que promove a biogênese mitocondrial através da diferenciação muscular pelo aumento da proliferação celular, pode suprimir a atrofia muscular (Tidball, 2011).

***Parâmetros inflamatórios: a suplementação com CM melhorou o edema nas articulações e o número total de leucócitos, mas o grupo APHD também apresentou resultados positivos.***

As manifestações da AR são caracterizadas, principalmente, pela inflamação sinovial e edema nas articulações (McInnes; Schett, 2011), o que leva à dor articular e potencialmente à incapacidade ao longo da vida, afetando significativamente a função motora do corpo (Zheng *et al.*, 2015). Os corticosteroides são comumente utilizados na prática clínica para diminuir a inflamação, mas possuem efeitos colaterais bem estabelecidos. Os glicocorticoides afetam todo o sistema endócrino, influenciando a função imunológica, os lipídios séricos e a adiposidade. A supressão do cortisol após a administração destes medicamentos é um marcador de absorção sistêmica e alteração do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e estudos têm mostrado que há variação individual substancial nos efeitos clínicos da administração oral (Liu *et al.*, 2013).

Além disso, a perda neuronal e a atrofia no hipocampo são documentadas em animais estressados ou tratados com glicocorticoides. Ou seja, embora ocasione melhora no edema na dor, isso pode comprometer todo o organismo e levar, além de outras manifestações, a comprometimento da funcionalidade (Zunzain *et al.*, 2011).

Por outro lado, em nosso estudo, a suplementação com CM também mostrou melhora no edema e no número total de leucócitos. E, ao observar os outros parâmetros que testamos, é possível ver que não houve influências negativas nos aspectos microscópicos, bioquímicos e funcionais, o que não aconteceu no tratamento com APHD. Yoshikawa *et al.* (2018) mostraram que CM é capaz de diminuir o escore de artrite. Da Silva *et al.* (2019) demonstraram que a CM na dose de 25 mg/kg pode reduzir a formação de edema, a hiperalgesia térmica e no escore de artrítico.

Numerosos estudos mostraram que a CM possui propriedades anti-inflamatórias. Estudos realizados em animais mostraram relação direta entre a concentração celular aumentada de CM e sua capacidade de modular mediadores inflamatórios (Dai *et al.*, 2018). Estudos experimentais em linhagens celulares e em seres humanos confirmaram os achados dos estudos com animais, demonstrando que a CM desempenha um papel na resposta anti-inflamatória através da inibição da via da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da ativação do NF- $\kappa$   $\beta$  (Prasad *et al.*, 2018).

Em ratos com artrite induzida por CFA, a administração oral de CM já foi relatada como capaz de inibir a agregação de neutrófilos e a indução inflamatória. Também foi observado, em relação aos aspectos inflamatórios, que a administração oral de CM foi tão eficaz quanto a cortisona ou fenilbutazona, e em casos de inflamação crônica mostrou metade da eficácia do corticosteroide (Akram *et al.*, 2010).

### ***TNF $\alpha$ - a relação com a funcionalidade, outros aspectos inflamatórios, lipoperoxidação e melhora nos grupos suplementados com CM***

Em nosso estudo, todos os animais artríticos apresentaram alterações degenerativas na articulação tíbio-femoral e a presença de massas de células inflamatórias em estruturas periarticulares do fêmur e da tíbia. Em AG, APLD e APHD, essas células inflamatórias formaram grandes massas na membrana sinovial, envolvendo o periósteo e a musculatura periarticular, o que contribuiu para um escore inflamatório mais elevado em comparação ao CG.

A atividade persistente das células imunes na AR leva à sinovite inflamatória crônica nas articulações periféricas. As células sinoviais hiperplásicas estimulam a liberação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , exacerbando o dano articular (Bhosale; Richardson, 2008). Essa inflamação crônica está intimamente ligada ao estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nas defesas antioxidantes (Malmstrom *et al.*, 2017). Em nosso estudo, AG apresentou concentrações mais elevadas de peroxidação lipídica, indicando aumento do estresse oxidativo.

Por outro lado, observamos melhorias nestes aspectos inflamatórios e de estresse oxidativo nos grupos tratados com AC e APLDC. A CM é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, tornando-se um agente terapêutico potencial para distúrbios autoimunes (Amalraj *et al.*, 2017). Embora os mecanismos exatos pelos quais a CM influencia a inflamação não sejam completamente compreendidos, várias hipóteses foram propostas. A CM suprime vias de sinalização pró-inflamatórias como NF- $\kappa$ B, AP-1 e COX-2 reduzindo assim as respostas inflamatórias (Chandran; Goel, 2012). Além disso, a CM ativa o sistema intracelular de defesa antioxidante ao induzir o Nrf2, um fator de transcrição que regula a expressão de genes antioxidantes através do elemento de resposta antioxidante (ARE) (Scapagni *et al.*, 2011). Essas propriedades fazem da CM uma fonte promissora de antioxidantes naturais (Tanvir *et al.*, 2017).

Em conclusão, enquanto AG e APHD mostraram marcadores exacerbados de inflamação e estresse oxidativo em nosso estudo, AC e

APLDC demonstraram melhorias, provavelmente devido aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da suplementação com CM. Esses achados apoiam o uso terapêutico potencial da CM no manejo de condições relacionadas à inflamação e ao estresse oxidativo associadas à AR.

***A melhora causada pela CM nos aspectos morfológicos da cartilagem articular, membrana sinovial e estruturas periarticulares da articulação tíbio-femoral, na funcionalidade do membro pélvico e a conexão com a concentração de TNF  $\alpha$***

As mudanças histopatológicas articulares estão ligadas à ativação de células inflamatórias, proliferação, liberação de citocinas pró-inflamatórias, infiltração contínua de células inflamatórias na sinóvia, característica dominante da AR, associada à ativação de macrófagos (precursores de osteoclastos), levando conseqüentemente à erosão, destruição, deformidade, comprometimento da função articular e incapacidade na cartilagem articular (Wang *et al.*, 2019). Citocinas pró-inflamatórias, como o TNF  $\alpha$ , estão relacionadas à fisiopatologia da AR, sendo principalmente secretadas por macrófagos ativados, que existem caracteristicamente nos tecidos articulares de pacientes com AR (Matsumoto *et al.*, 2016).

A elevação excessiva de TNF  $\alpha$  intensifica a resposta inflamatória, ativa fibroblastos, leva à hiperplasia sinovial, danos na cartilagem articular e na sinóvia articular (Yoon *et al.*, 2013). Além disso, certos tipos de macrófagos podem se transformar em osteoclastos e são amplamente encontrados na sinóvia e na cartilagem das articulações, o que pode causar absorção patológica e destruição do osso e da cartilagem (Danks *et al.*, 2002).

Curiosamente, o número de macrófagos pode ser regulado por apoptose. TNF  $\alpha$  e algumas interleucinas podem suprimir a taxa de apoptose, mantendo a sobrevivência dos macrófagos inflamatórios (Lo *et al.*, 2011). Assim, a promoção de apoptose de macrófagos pode ser uma nova estratégia potencial para o tratamento da AR. O tratamento por gavagem oral com CM já foi relatado como um composto que pode reduzir a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica (Chen *et al.*, 2019).

Portanto, como demonstrado em nosso estudo, há várias descobertas dos benefícios da CM no controle desses fatores prejudiciais. Mohapatra *et al.* (2019), mostraram que o tratamento com 110 mg/kg de CM reduziu significativamente o escore de artrite e a erosão óssea nas articulações artríticas, bem como a infiltração celular no tecido sinovial (Mohapatra *et al.*, 2019). O volume da pata, a infiltração de neutrófilos, os escores de artrite e clínicos também foram reduzidos após o tratamento com 100 mg/kg de CM (Pandey *et al.*, 2018). O tratamento com CM (120 mg/dia, por 14 dias) também foi relatado como inibitório da osteoclastogênese, prejudicando a sinalização do RANKL (Hussan *et al.*, 2012).

Essa melhoria deve estar relacionada à ação da CM sobre os sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS), estimulando apoptose (Kloesch *et al.*, 2013). Os efeitos anti-inflamatórios da CM nos FLS ocorrem pela inibição do TNF  $\alpha$  e de outras cascatas pró-inflamatórias (Ahn *et al.*, 2015). Além disso, é necessário mencionar que há estudos indicando melhoria na atividade da doença, dor dos pacientes, número de articulações sensíveis e inflamadas (Jacob *et al.*, 2019), o que leva à melhoria na funcionalidade, como encontrada em nosso estudo no teste TEP. Isso pode ser devido à redução das destruições teciduais causadas pelas citocinas pró-inflamatórias (Mousavi *et al.*, 2020). Dessa forma, embora essa relação ainda seja uma questão ambígua, é certo que a suplementação de CM pode melhorar a dor e os resultados funcionais.

### ***A funcionalidade e a relação com atrofia, degeneração dos fusos musculares e aumento do colágeno na matriz extracelular em grupos com AR***

A propriocepção informa sobre o estado contrátil e o movimento dos músculos. Pacientes com AR apresentam déficits sensoriais e motores proeminentes, geralmente resultando em dismetria com marcha instável, variabilidade na força e comprimento do passo, e redução na capacidade de identificar a direção dos movimentos articulares (Masingue *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, os grupos com AR apresentaram desempenho diminuído nos testes funcionais de EVs e também degeneração nos fusos musculares. É bem conhecido que a perda do *feedback* proprioceptivo pode

afetar severamente a função motora em mamíferos e é um sintoma comumente associado a diversas condições neurológicas e ortopédicas (Mayer; Akay, 2018).

Também encontramos atrofia nas fibras musculares de AR. A função dos fusos musculares tem sido relacionada com fraqueza muscular e atrofia em combinação com degeneração do sistema musculoesquelético, levando à perda de força contrátil e falha muscular (Mosqueira *et al.* 2013).

O grupo com AR também apresentou maior quantidade de colágeno total e tipo I. A deposição excessiva de matriz extracelular resulta em fibrose muscular, o que prejudica a função muscular, afeta a regeneração das fibras musculares após lesão e aumenta a suscetibilidade muscular a novas lesões (Prazeres *et al.*, 2018).

### ***Maior perímetro na região pós-sináptica de APLDC***

É importante considerar que o sistema neuromuscular desempenha um papel crucial na contração muscular, sendo mediado pela interação entre neurônios motores e fibras musculares através da liberação de acetilcolina na fenda sináptica. Esta interação desencadeia um potencial de ação que percorre a superfície da célula muscular, estimulando a contração muscular através da liberação de cálcio no citoplasma e a interação das proteínas contráteis (Gonzalez-Freire *et al.*, 2017).

A funcionalidade muscular comprometida, seja por inatividade física prolongada ou por condições como sarcopenia, pode levar à fragmentação estrutural e à perda de função das JNM. Essas alterações afetam tanto os componentes pré quanto pós-sinápticos, influenciando a plasticidade do JNM em resposta a estímulos diversos, como o envelhecimento e o uso de medicamentos (Deschenes *et al.*, 2020).

Estudos recentes destacam adaptações morfológicas na região pós-sináptica da JNM, como observado em APLDC. A redução no tamanho da fenda pós-sináptica sugere a manutenção das zonas ativas que facilitam a neurotransmissão, reduzindo a distância de acesso das vesículas sinápticas aos canais de cálcio (Chen *et al.*, 2015). Por outro lado, o aumento dessa

região pode indicar adaptações em ratos idosos, mantendo a densidade da JNM em decorrência do envelhecimento (Tintignac *et al.*, 2015).

É importante notar que intervenções de reabilitação muscular podem influenciar a neuroplasticidade do JNM, embora os efeitos precisos ainda não estejam totalmente estabelecidos. A compreensão dessas dinâmicas é crucial para desenvolver estratégias eficazes na preservação da função muscular e na promoção da saúde neuromuscular em diferentes condições patológicas e de envelhecimento.

***O tratamento com PD sem suplementação com CM não apresentou resultados muito promissores, tanto em dose baixa quanto alta.***

Em nosso estudo, o tratamento com PD sem suplementação de CM mostrou alguns resultados positivos principalmente nas EVs funcionais de, mas na histomorfometria, nos aspectos oxidativos e moleculares, AC e APLDC apresentaram melhores resultados. O uso de glicocorticoides é frequentemente indicado no tratamento de doenças reumáticas. No entanto, os efeitos colaterais dos glicocorticoides podem incluir miopatia, uma vez que têm um efeito direto no aumento da degradação de proteínas musculares e inibição do transporte de aminoácidos para as células musculares (Zhao *et al.*, 2020).

Além disso, os glicocorticoides são conhecidos por serem angiostáticos potentes e são utilizados para tratar doenças relacionadas à angiogênese. Shikatani *et al.* (2012) mostraram que a corticosterona diminuiu o número de capilares nos músculos esqueléticos de ratos e inibiu a proliferação, migração e brotamento de células endoteliais microvasculares do músculo esquelético *in vitro* (Shikatani *et al.*, 2012).

Curiosamente, em nosso trabalho, o APHD teve o efeito oposto e apresentou o maior número de capilares. Alguns estudos relataram que a administração de glicocorticoides pode ter efeitos divergentes no fluxo sanguíneo alterado. Em modelos animais com restrição de crescimento, o uso de corticoides altera o fluxo sanguíneo cerebral, prejudica o crescimento cerebral e está associado a danos cerebrais (Kaiser *et al.*, 2015).

Em suma, a suplementação com CM pode representar um agente terapêutico benéfico para pacientes com AR, e essa coadministração pode atuar de forma mais específica nos tecidos em processo inflamatório reduzindo, assim, o risco de efeitos adversos.

## 7. CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados indicam que a suplementação com CM no tratamento com baixa dose de PD exerce efeitos terapêuticos na artrite experimental, reduzindo a resposta inflamatória sistêmica e a lipoperoxidação e, conseqüentemente, as características inflamatórias das articulações tíbio-femorais e suas estruturas periarticulares. Todos esses fatores podem levar à melhoria da capacidade e funcionalidade articular. Assim, esses efeitos benéficos da CM juntos melhoram os sintomas da AR em ratas *Wistar* idosas.

## 8. REFERÊNCIAS

ABELL, J.I.; HOOTMANN, J.M.; ZACK, M.M.; MORIARTY, D.; HELMICK, C.G. Physical activity and health related quality of life among people arthritis. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 59, p. 380-385, 2005.

ABRAMMOF, B.; CALDERA, F.E. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. **Medical Clinics of North America**, v.104, p. 293–311, 2020.

AGGARWAL, B.B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: An age-old spice with modern targets. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.30, p. 85–94, 2009.

AHN, J.K; KIM, S.; HWANG, J. Metabolomic elucidation of the effects of curcumin on fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. **PLoS One**, v.10, p.12, 2015.

AKRAM, M.; SHAHAB-UDDIN, A.A.; USMANGHANI, K.; HANNAN, A.; MOHIUDDIN, E.; ASIF M. Curcuma longa and curcumin: a review article. **Romanian Journal of Biology**. v. 55, p. 65–70, 2010.

ALGHADIR, A.; MIRAJ, M.; ALI S. Efficacy of Curcumin with Iontophoretic Application on Paw Edema and Hematological Responses in Collagen-Induced Arthritis Rat Models. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 9, p. 4606520, 2020.

AMALRAJ, A.; VARMA, K.; JACOB, J. 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**. v. ;20, p.1022–1030, 2017.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular pharmaceuticals**, v. 4, p. 807–818, 2007.

ANTHWAL, A.; THAKUR, B.K.; RAWAT, M.S. Synthesis, characterization and in vitro anticancer activity of C-5 curcumin analogues with potential to inhibit TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. **Biomed Research International**. v. 524161, 2014.

ARCHER, C.W.; DOWRHWAITE, G.P.; FRANCIS-WEST, P. Development of synovial joints. **Birth Defects Research**. v. 69, p. 144-155, 2003.

ASTERIOU, E.; GKOUTZOURELAS, A.; MAVROPOULOS, A.; KATSIARI, C., SAKKAS, L. I.; BOGDANOS, D. P. Curcumin for the management of periodontitis and early ACPA-positive rheumatoid arthritis: Killing two birds with one stone. **Nutrients**, v.10, p.7, 2018.

AZEVEDO, V.F.; ROSSETTO, C.N.; LORENCETTI, P.G.; TRAMONTIN, M.Y.; FORNAZARI, B.; ARAÚJO, D.V. Custos diretos e indiretos do tratamento de pacientes com espondilite anquilosante pelo sistema público de saúde brasileiro. v. 56, p. 1-4, 2016.

BAGHERNIYA, M.; DARAND, M.; ASKARI, G. The Clinical Use of Curcumin for the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review of Clinical Trials. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 1291, p. 251-263, 2021.

BARTOK, B.; FIRESTEIN, G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 233, p. 233-55, 2010.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BASTTASTINI, A. M. O. Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 17, p. 58-60, 2005.

BENUCCI M. Factors correlated with the improvement of endothelial dysfunction during Abatacept therapy in patients with rheumatoid arthritis. **Journal of Inflammation Research**, v.11, p. 247-252, 2017.

BERTOLINI, G.R.F.; STEIN, T.; CIENA, A.P.; AIRTIFON, E.L. Comparação do ultrassom pulsado e contínuo no reparo tendíneo de ratos. **Fisioterapia na Pesquisa**. v. 19, p.3, 2012.

BHOSALE, A.M; RICHARDSON, J.B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. **British medical bulletin**, v. 87, p. 77-95, 2008.

BISTA, B.; BECK, N. Cushing Syndrome. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 81, p. 158-164, 2014.

BLACK, R.J.; HILL, C.L.; LESTER, S.; DIXON, W.G. The association between systemic glucocorticoid use and the risk of cataract and glaucoma in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. **PLoS One**, v. 11, 2016.

BLUMENTHAL, M.; LINDSTROM, A.; LYNCH, M.E.; REA, P. Herb sales continue growth – up 3.3.% in 2010. **Herbal Gram**, v. 90, p. 64-67, 2011.

BOTTINI, N.; FIRESTEIN, G.S. Epigenetics in rheumatoid arthritis: a primer for rheumatologists. **Current Rheumatology Reports**, v.15, p. 372, 2013.

BUGATTI, S.; VITOLO, B.; CAPORALI, R.; MONTECUCCO, C.; MANZO A. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. **BioMed Research International**, v. 681678, 2014.

BURTON, P. Welcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14.000 cases of seven common diseases and 3.000 shared controls. **Nature**. v. 447, p. 661-678, 2007.

CAMACHO-BARQUERO, L.; VILLEGAS, I.; SÁNCHEZ-CALVO, J.M.; TALERO, E., SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; MOTILVA, V.; ALARCÓM DE LA LASTRA, C. Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. **International immunopharmacology**. v. 7, p. 333-42, 2007.

CASTILLERO, E.; MARTÍN, A.I.; LÓPEZ-MENDUIÑA. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.309, p.8-16, 2009.

CECCARELLI, F.; SACCUCCI, M.; DI CARLO, G.; LUCCHETTI, R.; PILLONI, A.; PRANNO, N. Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: The Same Inflammatory Mediators? **Mediators Inflammation**. v. 2019, p:6034546, 2019.

CHALAN, P.; VAN DEN BERG, A.; KROESEN, B.; BROUWER, L.; BOOTS, A. Rheumatoid arthritis, immunosenescence and the hallmarks of aging. **Aging Science**, v. 8, p. 131-146, 2015.

CHANDRAN, B.; GOEL, A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. **Phytotherapy Research**. v. 26, p. 1719–1725, 2012.

CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neurosciences Methods**. v. 53, p. 55-63, 1994.

CHEN, Z.; BOZEC, A; RAMMING, A.; SCHETT, G. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**. v.15, p. 9–17, 2019.

CHEN, J.J.; DAI, L.; ZHAO, L.X. Intrathecal curcumin attenuates pain hypersensitivity and decreases spinal neuroinflammation in rat model of monoarthritis. **Scientific Reports**. v. 19, p. 10278, 2015.

CHENG, D.; LI, W.; WANG, L. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and PKPD Modeling of Curcumin in Regulating Antioxidant and Epigenetic Gene Expression in Healthy Human Volunteers. **Molecular Pharmaceutics**. v. 6; p.1881-1889, 2019.

CHO, D.C.; JUNG, H.S.; KIM, K.T.; JEON, Y.; SUNG, J.K.; HWANG, J.H. Therapeutic advantages of treatment of high-dose curcumin in the ovariectomized rat. **Journal of Korean Neurosurgical Society**. v.54, p.461-466, 2013.

CHOI, S. Transcription factor NFAT5 promotes macrophage survival in rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Investigation**. v.127, p. 954–969, 2017.

- CHOU, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Review*. v.58, p. 621-81, 2006.
- CORADINI, K.; FRIEDRICH, R.B.; FONSECA, F.N. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: In vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Science**. v.78, p. 163-70, 2015.
- DA CÂMARA, F. A.; MELO, H. H. M. A.; DE MOURA, J. T. S.; DOS SANTOS, M. C.; RAMOS, T. M.; SANTOS, A. C. A. Correlação do uso de glicocorticoides com manifestações adversas neuropsíquicas e metabólicas. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 1811-1828, 2021.
- DA SILVA, J.L.G. Co-Nanoencapsulation of Vitamin D 3 and Curcumin Regulates Inflammation and Purine Metabolism in a Model of Arthritis. **Inflammation**. v. 42, p.1595-1610, 2019.
- DAI, Q. Curcumin alleviates rheumatoid arthritis-induced inflammation and synovial hyperplasia by targeting mTOR pathway in rats. **Drug Design, Development and Therapy**. v. 12: p. 4095–4105, 2018.
- DAILY, J.W.; YANG, M.; PARK, S. Efficacy of turmeric extracts and curcumin for alleviating the symptoms of joint arthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials, **Journal of Medicinal Food**, v.19, p. 717–729, 2016.
- DAMIANI, D.; KUPERMAN, H.; DICHTCHEKENIAN, V.; DELLA MANNA, T.; NUVARTE, S. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. **Pediatria**, São Paulo, v. 1, p. 71-82, 2001.
- DANKS, L. Synovial macrophage-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. **Annals of Rheumatic Disease**. v. 61, p. 916–921, 2002.
- DEGIROLAMI, U.U.; SMITH, T.W. Teaching monograph: pathology of skeletal muscle diseases. **The American Journal of Pathology**. v. 107, p. 231-76, 1982.
- DEI CAS, M.; GHIDONI, R. Dietary curcumin: Correlation between bioavailability and health potential. **Nutrients**, v. 11, p. 9, 2019.
- DESCHENES, M.R.; TENNY, K.A.; WILSON, M.H. Increased and decreased activity elicits specific morphological adaptations of the neuromuscular junction. **Neuroscience**. v. 137, p. 1277-83, 2006.
- DESCHENES, M.R.; TUFTS, H.L.; OH, J. Effects of exercise training on neuromuscular junctions and their active zones in young and aged muscles. **Neurobiology of Aging**. v. 95, p. 1-8, 2020.

FERNÁNDEZ-LÁZARO, D.; MIELGO-AYUSO, J.; CALVO, S.J.; MARTÍNEZ, A.C.; GARCÍA, A.C.; FERNANDEZ-LAZARO, C.I. Modulation of exercise-induced muscle damage, inflammation, and oxidative markers by curcumin supplementation in a physically active population: A systematic review. **Nutrients**. v.12, p. 501, 2020.

FIRESTEIN, G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, v.15, p. 356-61, 2003.

FLECHA, G. B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free radical biology & medicine**. v.10, p.93–100, 1991.

FRAENKEL, I.; RABIDOU, N.; DHAR, R. Are rheumatologists' treatment decisions influenced by patients' age? **Rheumatology**. v. 45, p.1555–7, 2006.

GILES, J.T; BARTLETT, S.J.; ANDERSEN, R.E.; FONTAINE, K.R., BATHON; J.M. Association of body composition with disability in rheumatoid arthritis: impact of appendicular fat and lean tissue mass. **Arthritis Care Research**, v. 59, p. 1407-1415, 2008.

GOMES, R.P.; BRESSAN, E.; SILVA, T. M. Standardization of an experimental model suitable for studies on the effect of exercise on arthritis. **Einstein (São Paulo)**. v. 11, p. 76-82, 2013.

GONZALEZ-FREIRE, M.; SEMBA, R.D.; UBAIDA-MOHIEN, C. The Human Skeletal Muscle Proteome Project: a reappraisal of the current literature. **Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle**. v. 8, p. 5-18, 2017.

GREGERSEN, P.K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R.J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatoid**, v. 30, p.1205-13, 1987.

GROSSMAN, J.M.; GORDON, R.; RANGANATH, V.K. American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Arthritis Care and Research**. v. 62, p. 1515-1526, 2010.

GUPTA, S.C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B.B. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. **The American Association of Pharmaceutical Sciences Journal**. v. 15, p. 195–218, 2013.

GURGEL, T. L.; DE CASTRO TEXEIRA, A. P.; DE SOUSA OLIVEIRA, F. Repercussões dos glicocorticoides no tratamento da artrite reumatoide: uma revisão. **Educação, Ciência e Saúde**, v. 9, n. 1, 2022.

HALLAJZADEH, J.; MILAJERDI, A.; KOLAHDOOZ, F.; AMIRANI, E.; MIRZAEI, H.; ASEMI Z. The effects of curcumin supplementation on endothelial function:

a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. **Phytotherapy Research**, v. 33, p. 2989–2995.

HAMIDIE, R.D.R.; YAMADA, T.; ISHIZAWA, R.; SAITO, Y.; MASUDA, K. Curcumin treatment enhances the effect of exercise on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by increasing cAMP levels. **Metabolism**. v.64, p. 1334–1347, 2015.

HAYAKAWA, T.; YAGUCHI, T.; KAWAKAMI, Y. Enhanced anti-tumor effects of the PD-1 blockade combined with a highly absorptive form of curcumin targeting STAT3. **Cancer Science**. v. 111, p. 4326-4335, 2020.

HENROTIN, Y.; PRIEM, F.; MOBASHERI, A. Curcumin: a new paradigm and therapeutic opportunity for the treatment of osteoarthritis: curcumin for osteoarthritis management. **Springerplus**, v. 2, p. 1–9, 2013.

HERBERT, J.; GOODYER, I.M.; GROSSMAN, A.B.; HASTINGS, M.H.; DE KLOET, E.R.; LIGHTMAN, S.L.; LUPIEN, S.J.; ROOZENDAAL, B.; SECKL, J.R. Do corticosteroids damage the brain? **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, p.393-411, 2006.

HOOD, M. S.; LITTLE, J. P.; TARNOPOLSKY, M. A.; MYSLIK, F.; GIBALA, M. J. Low-volume interval training improves muscle oxidative capacity in sedentary adults. **Medicine and science in sports and exercise**. v. 43, p.1849–1856, 2011.

HU, C.; LAU, A. J.; WANG, R.; CHANG, T. K. Comparative analysis of ginsenosides in human glucocorticoid receptor binding, transactivation, and transrepression. **European Journal of Pharmacology**, 815, 501-511, 2017.

HUA, C.; BUTTGEREIT, F; COMBE B. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: current status and future studies. **RMD Open**, v.6, 2020.

HUNTER, D.J.; BIERMA-ZEINSTRA, S. Osteoarthritis. **Lancet**, v. 27, p.1745-1759, 2019.

HUSSAN, F.; IBRAHEEM, N.G.; KAMARUDIN, T.A., SHUID, A.N.; SOELAIMAN, I.N.; OTHMAN, F. Curcumin protects against ovariectomy-induced bone changes in rat model. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. v. 2012, p. 72916, 2012.

IBÁÑEZ, M.D.; BLÁZQUEZ, M.A. *Curcuma longa* L. Rhizome Essential Oil from Extraction to Its Agri-Food Applications. **A Review. Plants (Basel)**, v. 28, p. 44, 2020.

JACOB, J.; AMALRAJ, A.; RAJ, K.K.J.; DIVYA, C.; KUNNUMAKKARA, A.B.; GOPI S. A novel bioavailable hydrogenated curcuminoids formulation (CuroWhite™) improves symptoms and diagnostic indicators in rheumatoid

arthritis patients - A randomized, double blind and placebo-controlled study. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. v.9, p. 346–352, 2019.

JAVADI, M.; KHADEM HAGHIGHIAN, H.; GOODARZY, S.; ABBASI, M.; NASSIRI-ASL, M. Effect of curcumin nanomicelle on the clinical symptoms of patients with rheumatoid arthritis: A randomized, double blind, controlled trial. **International Journal of Rheumatic Disease**. v. 22, p.1857-1862, 2019.

JOSHI, V.R. Rheumatology, past, present and future. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 60, p. 21, 2012.

KAISER, J.R.; BAI, S.; GIBSON, N. Association Between Transient Newborn Hypoglycemia and Fourth-Grade Achievement Test Proficiency: A Population-Based Study. **JAMA Pediatrics**. v.169, p. 913-21, 2015.

KAMADA, Y.; TOYAMA, S.; ARAI, Y.; INOUE, H.; NAKAGAWA, S.; FUJII, Y.; KAIHARA, K.; KISHIDA, T.; MAZDA, O.; TAKAHASHI, K. Treadmill running prevents atrophy differently in fast-versus slow-twitch muscles in a rat model of rheumatoid arthritis. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 42, p. 429–441, 2021.

KAPALE, P.; VARDHARAJULU, G.; WARUDE, T. Effect of free exercise and Rheumatoid arthritis. **The Indian Journal of Physiotherapy & Occupational Therapy**, v. 11, p. 63-67, 2017.

KEVIN M.M.; JOHN, M.; DAVID, M. "Efficacy and Safety of Prednisolone in the Management of Alcohol-Induced Adverse Effects in a Rat Model". **Journal of Alcoholism and Drug Dependence**, v. 8, p. 334, 2020.

KIRK, L. F. J.R.; HASH R. B.; KATNER, H. P.; JONES, T. Cushing's disease: clinical manifestations and diagnostic evaluation. **American family physician**, v. 62, p. 1119–1134, 2020.

KIM, J.W.; KU, S.K.; HAN, M.H.; KIM, K.Y.; KIM, S.G.; KIM, G.Y.; HWANG, H.J.; KIM, B.W.; KIM, C.M.; CHOI, Y.H. The administration of *Fructus schisandrae* attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 36, p. 29–42, 2015.

KIRWAN, J. The origins, results and consequences of the 1995 Arthritis Research Campaign Low-Dose Glucocorticoid Study. **Clinical and Experimental Rheumatology**. v. 29, p. 52–8, 2011.

KLARESKOG, L.; CATRINA, A.I.; PAGET, S. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 373, p. 659–672, 2009.

KLIPPEL, J.H. Biologic therapy for rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**. v.343, p. 1640, 2000.

KLOESCH, B. Anti-inflammatory and apoptotic effects of the polyphenol curcumin on human fibroblast-like synoviocytes. **International immunopharmacology**. v.15, p. 400-405, 2013.

KRUG, A.L.O.; MACEDO, A.G.; ZAGO, A.S.; RUSH, J.W.E.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. High-Intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. **Muscle Nerve**. v. 53, p.779–788, 2016.

KOURILOVITCH, M.; GALARZA-MALDONADO, C.; ORTIZ-PRADO, E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 48, p.-26-30, 2014.

KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, p. 1401–1414, 2002.

KUMAR, P.; BANIK, S. Pharmacotherapy options in rheumatoid arthritis. **Clinical Medical Insights of Arthritis Musculoskeletal Disorders**, v. 6, p. 5558, 2013.

KURZ, K.; HEROLD, M.; RUSSE, E.; KLOTZ, W.; WEISS, G.; FUCHS D. Effects of Antitumor Necrosis Factor Therapy on Osteoprotegerin, Neopterin, and sRANKL Concentrations in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Disease Markers**. v.27, p. 69, 2015.

LANSDALL, T.A. Attenuation of collagen-induced arthritis by orally available imidazoline-based NF- $\kappa$ B inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, p.4816–4819, 2012.

LAO, C.D.; RUFFIN, M.T.; NORMOLLE, D.; HEATH, D.D.; MURRAY, S.I.; BAILEY, J.M. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complement Alternative Medicine**, v. 6, p.10, 2006.

LEBRE, M.C.; JONGBLOED, S.L.; TAS, S.W.; SMEETS, T.J.; MCINNES, I.B.; TAK P.P. Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP- dendritic cells with distinct cytokine profiles. **The American Journal of Pathology**, v.172, p. 940-50, 2008.

LECKER, S.H.; SOLOMON, V.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 227-237, 1999.

LEMMEY, A. B. Tight control of disease activity fails to improve body composition OR physical function in rheumatoid arthritis patients. **Rheumatology (Oxford)**, v. 55, 1736–1745, 2016.

LEV-ARI, S. Curcumin synergistically potentiates the growth-inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in osteoarthritis synovial adherent cells. **Rheumatology**. v. 45, p.171–177, 2006.

LI, C.; LI, H.; WANG, Q. pH-sensitive polymeric micelles for targeted delivery to inflamed joints. **Journal of Control Release**, v. 246, p.133–141, 2017.

LI, X.; XU, D.Q.; SUN, D.Y.; ZHANG, T.; HE, X.; XIAO, D.M. Curcumin ameliorates monosodium urate-induced gouty arthritis through Nod-like receptor 3 inflammasome mediation via inhibiting nuclear factor-kappa B signaling. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2018.

LI, X. X.; ZHANG, S. N. Herbal compounds for rheumatoid arthritis: Literatures review and cheminformatics prediction. **Phytotherapy Research**, v. 34, p. 51–66, 2020.

LIAO, K.P.; ALFREDSSON, L.; KARLSON, E.W. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**. v. 21, p. 279-283, 2009.

LINDSTROM, T.; ROBINSON W. Rheumatoid arthritis: A role for immunosenescence? **Journal of the American Geriatrics Society**. v. 58, p. 1565-75, 2010.

LIU, J. Stauroside B inhibits macrophage activation by inhibiting NF- $\kappa$ B and ERK MAPK signaling. **Pharmacological Research**. v. 111, p.303–315, 2016.

LIU, D.; AHMET, A.; WARD, L. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**. v. 9, p.30, 2013.

LO, S.Z.; STEER, J.H.; JOYCE, D.A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes survival in methotrexate-exposed macrophages by an NF- $\kappa$ B-dependent pathway. **Arthritis Research & Therapy**. v. 13, p. 24, 2011.

LONDHE, P.; GUTTRIDGE, D.C. Inflammation induced loss of skeletal muscle. **Bone**. v. 80, p. 131-142, 2015.

LOPRESTI, A.L. The Problem of Curcumin and Its Bioavailability: Could Its Gastrointestinal Influence Contribute to Its Overall Health-Enhancing Effects? **Advances in Nutrition**. v. 9, p. 41-50, 2018.

LOVERING, R.M.; IYER, S.R.; EDWARDS, B. Alterations of neuromuscular junctions in Duchenne muscular dystrophy. **Neuroscience Letters**. v. 737, p. 135304, 2020.

LU, W.; ZHOU, Z.; NAQVI, S.M.A.S.; LI, X. Meta-analysis on efficacy and safety of modified guizhi shaoyao zhimu tang with the western medicines in treating rheumatoid arthritis. **Yangtze Medicine**, v. 02, p. 161–170, 2018.

LUBBERTS, E.; VAN DEN BERSSELAAR, L.; OPPERS-WALGREEN, B.; SCHWARZENBERGER, P.; COENEN-DE ROO, C.J.; KOLLS, J.K.; JOOSTEN, L.A.; VAN DEN BERG, W.B. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 2655-62, 2003.

MALMSTROM, V.; CATRINA, A.I.; KLARESKOG, L. "The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting," **Nature Reviews Immunology**, v. 17, p. 60–75, 2017.

MARCEDO, A.G.; KRUG, A.L.; SOUZA, L.M.; MARTUSCELLI, A.M.; CONSTANTINO, P.B.; ZAGO, A.S.; RUSH, J.W.E.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. Time-Course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone. **Steroids**. v. 107, p. 30–36, 2016.

MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. Osteoporosis. **New York:Academic Press**; 1996.

MASIBO, K.M.; MWONJORIA, J.; MBURU, D. Efficacy and Safety of Prednisolone in the Management of Alcohol-Induced Adverse Effects in a Rat Model. **Journal of Alcoholism and Drug Dependence**. v. 5, p. 1-8, 2020.

MASINGUE, M.; FAURE, J.; SOLE, G.; STOJKOVIC, T.; LEONARD-LOUIS S. A novel nonsense PIEZO2 mutation in a family with scoliosis and proprioceptive defect. **Neuromuscular Disorders**. v.29, p.75–9, 2019.

MATSUMOTO, T. Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages, **Arthritis Research and Therapy**. v. 18, p.133, 2016.

MAYER, W.P.; AKAY, T. Stumbling corrective reaction elicited by mechanical and electrical stimulation of the saphenous nerve in walking mice. **Journal of Experimental Biology**. v. 10, p. 221, 2018.

MCINESS, I.B.; SCHETT, G. The pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **The new Journal of Medicine**. v. 365, p. 2205-2219, 2011.

MELO PEREIRA, S.; RIBEIRO, R.; LOGARINHO, E. Approaches towards Longevity: Reprogramming, Senolysis, and Improved Mitotic Competence as Anti-Aging Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 938, 2019.

MOHAPATRA, T.K.; MOHAPATRA, D.; SUBUDHI, B.B. Complimentary Effects of Curcumin for Enhancing Efficacy of Acetylsalicylic Acid against Prostate Cancer. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**. v. 53, p. 666-677, 2019.

MOSQUEIRA, M.; ZEIGER, U.; FÖRDERER, M. Cardiac and respiratory dysfunction in Duchenne muscular dystrophy and the role of second messengers. **Medicinal Research Reviews**. v. 33, p. 1174-213, 2013.

MOTA, L.M.; CRUZ, B.A.; BRENOL, C.V.; PEREIRA, I.A.; FRONZA, L.S.; BERTOLO, M.B.; FREITAS, M.V.C; SILVA, N.A.; JUNIOR, P.L.; GIORGI, R.D.N.; LIMA, R.A.C.; PINHEIRO, G.R.C. Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.51, p.199-219, 2011.

MOUSAVI, S.M.; MILAJERDI, A.; VARKANEH, H.K.; GORJIPOUR, M.M.; ESMAILLZADEH, A. The effects of curcumin supplementation on body weight, body mass index and waist circumference: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 60, p.171–180, 2020.

MUKHERJEE, P.K.; WAHILE, A. Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 25-35, 2006.

NAIK, S.R.; GUPTA, P.; ASHOK, L. A novel mixture of curcumin paste and prednisolone for treating oral lichen planus: A case controlled comparative study. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**. v. 31, p. 286 – 292, 2019.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NONOSE, N. J. A.; PEREIRA, P. R.; MACHADO, M. R.; RODRIGUES, D. T.; SATO, C. A. "Oral administration of curcumin (*Curcuma longa*) can attenuate the neutrophil inflammatory response in zymosan-induced arthritis in rats", **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, p. 727-34, 2014.

OISHI, S.; WENDLING, D.; SIBILIA, J. Treatment of active rheumatoid arthritis: comparison of patients younger vs older than 75 years (CORPUS cohort). **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, p. 2612–2617, 2018.

PARI, L.; TEWAS, D.; ECKEL, J. Role of curcumin in health and disease. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v.114, p. 127-149, 2008.

PARK, H.H. Britanin suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and cytokine production via NF- $\kappa$ B and MAPK inactivation in RAW 264.7 cells. **International Immunopharmacology**. v. 15, p. 296–302, 2013.

PETERSON, C.M.; JOHANNSEN, D.L.; RAVUSSIN, E. Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. **Journal of aging research**. v. 19, p. 4821, 2012.

POLLEY, H.F.; SLOCUMB, C.H. Behind the scenes with cortisone and ACTH. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 51, p.471-477, 1976.

POPE, R.M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**. p. 527–535, 2002.

PRASAD, S.; AGGARWAL, B.B. Turmeric, the golden spice. **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. v. 2, 2011.

PRAZERES, P.H.D.M.; TURQUETTI, A.O.M.; AZEVEDO, P.O. Perivascular cell  $\alpha$ v integrins as a target to treat skeletal muscle fibrosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 99, p. 109-113, 2018.

QUEIRÓZ BALBINO, V.; COUTINHO-ABREU, I.V.; SONODA, I.V.; MELO, M.A.; ANDRADE, P.P.; CASTRO, J.A. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. **Acta Tropica**. v. 98, p.15-24, 2006.

RAMADAN, G.; AL-KAHTANI, M.A.; EL-SAYED, W.M. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of curcuma longa (turmeric) versus Zingiber officinale (ginger) rhizomes in rat adjuvantinduced arthritis. **Inflammation**. v. 34, p. 291–301, 2011.

RETAMEIRO, A.C.B.; NEVES, M.; TAVARES, A.L.F.; BOARO, C.D.T.; RODRIGUEZ, D.F.S.; LEAL, T.S.S.; COSTA, R.M.; BERTOLINI, G.R.F.; RIBEIRO, L.D.F.C. Resistance exercise and low-level laser therapy improves grip strength and morphological aspects in the ankle joint of Wistar rats with experimental arthritis. **The Anatomical Record**. v. 306, p. 918–932, 2023.

SADEGHI, N.; MANSOORI, A.; SHAYESTEH, A.; HASHEMI, S.J. The effect of curcumin supplementation on clinical outcomes and inflammatory markers in patients with ulcerative colitis. **Phytotherapy Research**, v. 34, p.1123-1133, 2020.

SADEGHI, O.; MILAJERDI, A.; SIADAT, S. D.; KESHAVARZ, S. A.; SIMA, A. R.; VAHEDI, H.; ADIBI, P.; & ESMAILLZADEH, A. Effects of soy milk consumption on gut microbiota, inflammatory markers, and disease severity in patients with ulcerative colitis: a study protocol for a randomized clinical trial. **Trials**, v. 21, p. 565, 2020.

SAFIRI, S.; KOLAH, A.; HOY, D.; SMITH, E.; BETTAMPADI, D.; MANSOURNIA, M.E.A. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden Disease study 2016. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 21, p.920, 2019.

SALIMA, C.; EMELINE, M.; MARIE-CHRISTOPHE, B.; LUCA, S. Cachexia and adiposity in rheumatoid arthritis. Relevance for disease management and clinical outcomes. **Joint Bone Spine**, v. 83, p.127-133, 2016.

SANTO, R.C.E.; FERNANDES, K.Z.; LORA, P.S.; FILIPPIN, L.I.; XAVIER, R.M. Prevalence of rheumatoid cachexia in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, p. 816-825, 2018.

SCAPAGNINI, G.; VASTO, S.; ABRAHAM, N.G.; CARUSO, C.; ZELLA, D.; FABIO, G. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. **Molecular Neurobiology**. v. 44, p. 192–201, 2011.

SHABGAH, A. G.; HEJRI ZARIFI, S.; MAZLOUMI KIAPEY, S. S.; EZZATIFAR, F.; PAHLAVANI, N.; SOLEIMANI, D.; MOHAMMADIAN HAFTCHESHMEH, S.; MOHAMMADI, H.; GHOLIZADEH NAVASHENAQ, J. Curcumin and cancer; are long non-coding RNAs missing link? **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 164, p. 63–71, 2021.

SHRESTHA, L.S. Melatonin potentiates the antitumor effect of curcumin by inhibiting IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B/COX-2 signaling pathway. **International Journal of Oncology**. v. 51, p. 1249–1260, 2017.

SHIKATANI, E.A.; TRIFONOVA, A.; MANDEL, E.R. Inhibition of proliferation, migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis. **PLoS One**. v. 7, p. 46625, 2012.

SIES, H. C. BERNDT, H.C.; JONES, D.P. "Oxidative stress," **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017.

SMALLWOOD, M.J.; NISSIM, A.; KNIGHT, A.R.; WHITEMAN, M.; HAIGH, R.; WINYARD, P.G. "Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases." **Free Radical Biology & Medicine**, v. 125, p. 3–14, 2018.

SMOLEN, J.S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I.B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**. v. 22, p. 2023-2038, 2016.

SMOLEN, J.S.; LANDEWÉ, R.B.M.; BIJLSMA, J.W.J. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. **Annals of Rheumatic Diseases**. v. 79, p. 685-699, 2020.

SONG, I.H.; GOLD, R.; STRAUB, R.H. New Glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate! **The Journal of Rheumatology**, v. 32, p. 1199-207, 2005.

STENSTROM, C.H.; MINOR, M.A. Evidence for the benefit of aerobic and strengthening exercise in rheumatoid arthritis. **Arthritis Care & Research**, v.49, p.428-34, 2003.

STOHS, S.J.; CHEN, O.; RAY, S.D. Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: A Review. **Molecules**. v. 25, p. 1397, 2020.

SZEKANECZ, Z.; BESENYEI, T.; PARAGH, G.; KOCH, A.E. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity**, v. 42, p. 563-73, 2009.

TANVIR, E.; HOSSEN, M.; HOSSAIN, M.; AFROZ, R.; GAN, S.H.; KHALIL, M. Antioxidant properties of popular turmeric (*Curcuma longa*) varieties from Bangladesh. **Journal of Food Quality**. v. 2017, p. 1–8, 2017.

TIDBALL, J.G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. **Comprehensive Physiology**. v. 1, p. 2029–2062, 2011.

TILSON, H.A.; CABE, P.A. The effects of acrylamide given acutely or in repeated doses on fore- and hindlimb function of rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 47, p. 253-60, 1979.

TINTIGNAC, L.A.; BRENNER, H.R.; RÜEGG, M.A. Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. **Physiological Reviews**. v. 95, p. 809-52, 2015.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **European Journal of Pharmacology**. v. 251: 173-179, 1994.

TUFTS, M. H. Rheumatoid Arthritis. **From the AJN Archives**, v. 112, 2012.

VIATTE, S.; PLANT, D.; RAYCHAUDHURI, S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v.9, p. 141-53, 2013.

VIDAL, B.; CASCAO, R.; FINNILA, M.; LOPES, I.P.; SAARAKKALA, S.; ZIOUPOS, P.; CANHAO, H.; FONSECA, J.E. Early arthritis induces disturbances at bone nanostructural level reflected in decreased tissue hardness in an animal model of arthritis. **PLoS One**. v. 13, p. 0190920, 2018.

VIJAYALAXMI, A.; BAKSHI, V.; BEGUM, N. Anti-arthritic and anti-inflammatory activity of beta caryophyllene against Freund's complete adjuvant induced arthritis in Wistar rats. **Journal of Bone Research and Reports**. v. 1, p. 1–9, 2015.

WALSMITH, J.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. **International Journal of cardiology**, v. 85, p. 89-99, 2002.

WANG, L.; WANG, F.S.; GERSHWIN, M.E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. **Journal of Internal Medicine**, v. 278, p. 369–395, 2015.

WANG, Q.; YE, C.; SUN, S.; LI, R.; SHI, X.; WANG, S.; ZENG, X.; KUANG, N.; LIU, Y.; SHI, Q.; LIU, R. Curcumin attenuates collagen-induced rat arthritis via anti-inflammatory and apoptotic effects. **International immunopharmacology**, v. 72, p. 292–300, 2019.

WEYAND, C.M.; YANG, Z.; GORONZY, J.J. T Cell Aging in Rheumatoid Arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, p.93-100, 2014.

WOSCZYNA, M.N.; RANDO, T.A. A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. **Development Cell**. v. 46, p. 135-143, 2018.

WRIGHT, A.P.; ZILLIACUS, J.; MCEWAN, I.J.; DAHLMAN-WRIGHT, A.T.; ALMLOF, T.; CARLSTEDT DUKE, J. Structure and function of the glucocorticoid receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 47, p. 11-19, 1993.

YONEMORI, F.; YAMAGUCHI, T.; YAMADA, H. Evaluation of a motor deficit after chronic focal cerebral ischemia in rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v. 18, p. 1099-106, 1998.

YOON, H. Kaempferol inhibits IL-1 $\beta$ -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of COX-2, PGE2 and MMPs. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 32, p. 971–977, 2013.

YOSHIKAWA, Y. Tomato saponin supplementation ameliorates the development of experimental arthritis by regulating inflammatory responses. **Journal of Functional Foods**. p. 458-464, 2018.

ZAZULA, M.F.; DE ANDRADE, B.Z.; TONI BOARO, C. Development of a histopathological index for skeletal muscle analysis in *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae). **Acta Histochemica**. v. 124, p. 151892, 2022.

ZHANG, Z.; CHEN, L.; NI, H. The effectiveness of Corticosteroids on mortality in patients with acute respiratory distress syndrome or acute lung injury: a secondary analysis. **Scientific Reports**. v. 2, p. 17654, 2015.

ZHAO, D.; ZHANG, F.; WANG, B. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version). **Journal of Orthopedic Translation**. v. 21, p. 100-110, 2020.

ZHENG, Z. The effect of curcumin and its nanoformulation on adjuvant-induced arthritis in rats. **Drug Design, Development and Therapy**. v. 9, p. 4931–4942, 2015.

ZHOU, M.; HOU, J.; ZHONG, Z. Targeted delivery of hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. **OnDrug Delivery**. v. 25, p. 716-722, 2018.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, p. 109-110, 1983.

ZUNSZAIN, P.A.; ANACKER, C.; CATTANEO, A.; CARVALHO, L.A.; PARIANTE, C.M. Glu-cocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 35, p.722-729, 2011.

## ANEXO I



### Autorização

O Protocolo nº 77-18 Intitulado "Efeitos da suplementação com Cúrcuma em um modelo experimental de artrite reumatóide – Análises funcionais e morfológicas", sob a responsabilidade de Luolana de Fátima Chacko Ribeiro que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se Aprovado para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 14/02/2020. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2020 a 01/09/2024
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo - Wistar
N. de animais	96
Peso/idade	250-350g - 18 meses
Sexo	feminino
Origem	Procedência do Biotério Central da UNIOESTE, campus de Cascavel

Cascavel, 20/02/2020

Prof. Dra. Luolana Oliveira de Fátima  
 Coordenadora do CEUA  
 Portaria nº 3126/2018-GRE

## ANEXO II

<b>PADRÃO DE REAÇÃO</b>	<b>ALTERAÇÃO</b>	<b>W</b>		
<b>Desordens circulatórias E inflamatórias CID=36</b>	Hemorragia/ hiperemia/ aneurisma	1		
	Edema intersticial	1		
	Exsudato	2		
	Infiltrado inflamatório	2		
<b>PADRÃO DE REAÇÃO</b>	<b>ALTERAÇÃO</b>	<b>W</b>		
<b>Mudanças regressivas RC=218</b>	Alterações nas fibras musculares (MFA =182)	Fibras arredondadas	2	
		Fibras anguladas	2	
		Fibras divididas	2	
		Degeneração hialina	3	
		Vacuolização	3	
		Inclusões sarcoplasmáticas	2	
		Atrofia	2	
		Necrose	3	
		Núcleo centralizado	2	
		Halo basofílico	2	
		Aumento de núcleos	2	
		Alterações associadas a tecidos (ATA =36)	Presença de tecido adiposo	2
			Alteração no tecido nervoso	2
Alteração nos fusos	2			
<b>PADRÃO DE REAÇÃO</b>	<b>ALTERAÇÃO</b>	<b>W</b>		
<b>Mudanças progressivas PC=36</b>	Tecido muscular	Hipertrofia	1	
		Hiperplasia	2	
	Tecido conjuntivo	Hipertrofia	1	
		Hiperplasia	2	
<b>Neoplasmas NP=30</b>	Benigno	2		
	Maligno	3		
Soma total do índice proposto	320	100%		

## ARTIGO I

## Physical Exercise and Low-Level Laser Therapy Systemic Effects on the Ankle Joint in an Experimental Rheumatoid Arthritis Model

Ana C.B. Retameiro, MSc, Morgana Neves, MSc, Alana L.F. Tavares, MSc, Carolina D.T. Boaro, Diego F.S. Rodriguez, Taciane Stein, PhD, Rose M. Costa, PhD, Gladson R.F. Bertolini, PhD, and Lucinéia F.C. Ribeiro, PhD

## ABSTRACT

**Objective:** The purpose of this study was to analyze the systemic effects of stair climbing exercise, low-level laser therapy (LLLT), and the association of both treatments on pelvic member functionality and ankle joint histomorphometric aspects of Wistar rats submitted to experimental rheumatoid arthritis (RA) protocol.

**Methods:** Male Wistar rats were randomly distributed into the following 8 groups: control; control LLLT; control exercise; control LLLT and exercise; arthritis group; arthritis LLLT; arthritis exercise; and arthritis LLLT and exercise, with  $n = 8$  for functional and  $n = 5$  for histomorphometrical tests. The experimental RA was induced by complete Freund adjuvant injection in the knee joint cavity. Functionality was evaluated by proprioception and motor function using Sciatic Functional Index and maximum angle reached at an inclined plane. Histomorphometrical aspects were evaluated in the ankle joint after histological routine.

**Results:** The arthritis LLLT and exercise group had positive effects in Sciatic Functional Index ( $F [3,96] = 11.3, P < .001$ ) and in inclined plane ( $F [3,4] = 36.1, P < .001$ ). The arthritis exercise group presented a greater number of chondrocytes in the tibia (Wald [1; 6605.6] = 25.2,  $P < .001$ ) and talus (Wald [1; 15958.6] = 19.8,  $P = .006$ ) in relation to the other groups. The arthritis group morphology showed significant degenerative lesions as subintima with angiogenesis, inflammatory cells, flocculated articular cartilage, chondrocytes disorganization and *pavans*. Even with the higher chondrocytes number, the arthritis exercise group had morphological characteristics more similar to the control group.

**Conclusion:** Low-level laser therapy and exercise restored functionality, and exercise restored morphological aspects of tissues in experimentally induced RA in rats. (*J Manipulative Physiol Ther* 2022;96):1-13)

**Key Indexing Terms:** Arthritis, Experimental; Ankle Injuries; Exercise; Laser Therapy; Histology, Comparative

## ARTIGO II

Received 11 July 2022 | Revised 10 October 2022 | Accepted 11 October 2022  
DOI: 10.1002/ar.25122

RESEARCH ARTICLE

The Anatomical Record WILEY

## Resistance exercise and low-level laser therapy improves grip strength and morphological aspects in the ankle joint of Wistar rats with experimental arthritis

Ana Caroline Barbosa Retameiro  | Morgana Neves  |  
Alana Ludemila de Freitas Tavares | Carolina De Toni Boaro |  
Diego Francis Saraiva Rodriguez | Taciane Stein da Silva Leal |  
Rose Meire Costa | Gladson Ricardo Flor Bertolini  |  
Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro