

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS PROGRAMA DE PÓS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA

Jean Lucas Gutknecht da Silva

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE VITAMINA D₃ E CURCUMINA
NANOENCAPSULADAS SOBRE O METABOLISMO DE PURINAS EM
MODELO DE ARTRITE**

Santa Maria, RS
2019

Jean Lucas Gutknecht Da Silva

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE VITAMINA D₃ E CURCUMINA
NANOENCAPSULADAS SOBRE O METABOLISMO DE PURINAS EM
MODELO DE ARTRITE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS
2019

da Silva, Jean Lucas Gutknecht
Efeito da associação de vitamina D3 e curcumina
nanoencapsuladas sobre o metabolismo de purinas em
modelo de artrite / Jean Lucas Gutknecht da Silva.-
2019.
104 p.; 30 cm

Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2019

1. Artrite 2. Vitamina D 3. Curcumina 4. Nanocapsulas
5. Sistema Purinergico I. Bitencourt Rosa Leal, Daniela
II. Título.

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE VITAMINA D₃ E CURCUMINA
NANOENCAPSULADAS SOBRE O METABOLISMO DE PURINAS EM
MODELO DE ARTRITE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

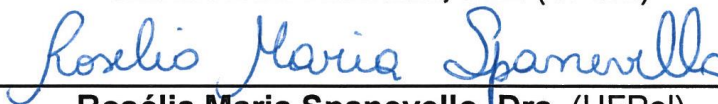
Aprovado em 19 de fevereiro de 2019:



Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (Presidente/Orientadora)



Maria Rosa Chitolina, Dra. (UFSM)



Rosélia Maria Spanevello, Dra. (UFPel)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que já participaram da minha educação, me ensinando, corrigindo, repreendendo, guiando e compartilhando.

Sigo meu caminho para poder dar ao mundo o que ele tem me proporcionado, o conhecimento...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Lisiane e Francisco por me concederem a vida, acreditarem e depositarem em mim toda a confiança me fornecendo toda educação, carinho e auxílio para que eu me torne um grande homem.

Agradeço a minha avó Eloá, por ser minha segunda mãe, educando, ensinando e guiando, sem a sra. com certeza eu não estaria aqui.

A minha namorada Fernanda, pelo amor, amizade companheirismo e por ser a pessoa a estar compartilhando os bons e maus momentos.

A orientadora Daniela Leal, pela oportunidade e confiança depositada, pelos ensinamentos e toda a ajuda.

A minha amiga/colega/coorientadora/ Daniela Passos, por me receber, auxiliar, ensinar e acima de tudo por ser exatamente a pessoa que és. Obrigado.

Aos meus colegas e amigos do Labibio, Viviane, Alessandra, Fernanda, Renata, Matheus, Paulo, Pedro, Lara, Karine, Patrícia, Claudio, João Matheus, João Felipe, Mauren pelo auxílio para desenvolver este trabalho, pela troca de conhecimentos e pelo companheirismo do dia a dia.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia e do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da UFSM pelo auxílio e apoio prestados.

Aos professores e colegas que participaram dessa caminhada, obrigado por todos os ensinamentos, vocês são responsáveis pelo meu crescimento profissional.

A banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas contribuições que prestarão a este trabalho.

A todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho ou para o decorrer da minha caminhada para me tornar mestre, lhes deixo minha gratidão e respeito.

"A única coisa que você pode controlar são suas escolhas."
Autor desconhecido.

RESUMO

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE VITAMINA D₃ E CURCUMINA NANOENCAPSULADAS SOBRE A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM MODELO DE ARTRITE

AUTOR: Jean Lucas Gutknecht da Silva
ORIENTADORA: Daniela Bitencourt Rosa Leal

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, autoimune, sistêmica altamente debilitante. A vitamina D₃ (VD₃), possui papel imunomodulador na AR, exercendo ação inibitória sobre linfócitos T na produção e ação de citocinas. A curcumina, polifenol derivado da *Curcuma longa*, interage com alvos celulares e moleculares, promovendo efeitos farmacológicos e imunomoduladores em muitas patologias, incluindo AR. Portanto, é de interesse científico testar uma terapia de combinação dessas duas substâncias no tratamento desta patologia. A fim de aumentar a biodisponibilidade e estabilidade da curcumina e aumentar a eficácia terapêutica e bioatividade da VD₃ no sistema imunológico um sistema de nanoencapsulação foi utilizado. A sinalização purinérgica desempenha um papel relevante na modulação das respostas inflamatórias e imunes da AR. Estudos envolvendo avaliação da atividade de enzimas que participam da cascata de degradação dos nucleotídeos da adenina são importantes para verificar a sinalização purinérgica na regulação da resposta imune e inflamatória durante a evolução clínica de várias doenças. O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos da associação destes compostos na forma nanoencapsulada, sobre a sinalização purinérgica por meio da atividade das enzimas E-ADA e E-NTPDase, em modelo de artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA). Também foram avaliados parâmetro bioquímicos e de estresse oxidativo. Ratos Wistar foram divididos em grupos com e sem indução de artrite. CFA foi administrado na pata traseira dos animais, após 15 dias, foram realizados testes de indução da artrite, hiperalgésica termal, edema de pata e escore de artrite. No 15º dia iniciou-se o tratamento com nanocápsulas de VD₃ (15,84 UI/dia) e curcumina 4mg/kg em separado e em associação, ou com curcumina na forma livre 25mg/kg, com o veículo ou com nanocapsulas branca, durante 15 dias. No 30º dia foram realizados novamente testes de indução da artrite, bioquímicos e atividade das ectoenzimas em plaquetas, neutrófilos, linfócitos, mieloperoxidase (MPO) e espécies reativas de oxigênio (EROS). Fígado e rim foram coletados para análises histopatológicas. Os resultados demonstram o sucesso do modelo em gerar um processo inflamatório, comprovado pelo aumento no edema de pata e no escore de artrite e da hiperalgésia. Não foram observadas alterações histopatológicas nas análises hepáticas dos animais e não foi encontrada deposição de nanocápsulas. O aumento na vascularização e desorganização dos glomérulos renais dos animais artríticos foram revertidos pelos tratamentos. Houve redução na atividade da E-NTPDase de neutrófilos e aumento na E-ADA em neutrófilos, plaquetas e ADA em soro somados com a diminuição da E-ADA em linfócitos sugerem uma resposta pró-inflamatória nos animais induzidos. A atividade de MPO elevada nos animais artríticos confirmou o processo inflamatório, contudo as EROS não se alteraram pós indução e/ou tratamento. Ambas as formulações nanoencapsuladas mostraram reduzir os sinais e sintomas da inflamação, reverter as alterações das atividades das ectoenzimas e proteger tecidos hepáticos e renais pela reversão visão histológica e de redução da MPO. Assim, os tratamentos em associação de nanocapsulas obtiveram sucesso, sugerindo efeito anti-inflamatório com redução da dose, e superação de dificuldades de absorção e distribuição desses compostos, podendo servir terapia adjuvante para o tratamento da artrite reumatoide.

Palavras-chave: Artrite; Vitamina D₃; Curcumina, Nanocápsulas; Sistema Purinérgico.

ABSTRACT

EFFECT OF THE ASSOCIATION OF VITAMIN D₃ AND CURCUMIN NANOENCAPSULADAS ON PURINERGIC SIGNALING IN ARTHRITIS MODEL

AUTHOR: Jean Lucas Gutknecht da Silva

ADVISOR: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, autoimmune, systemic inflammatory disease that is highly debilitating. Vitamin D₃ (VD₃) has an immunomodulatory role in RA, exerting an inhibitory action on T lymphocytes in the production and action of cytokines. Curcumin, a polyphenol derived from *Curcuma longa*, interacts with cellular and molecular targets, promoting pharmacological and immunomodulatory effects in many pathologies, including RA. Therefore, it is of scientific interest to test the therapeutic effects of these two substances combined. In order to increase the bioavailability and stability of curcumin and increase the therapeutic efficacy and bioactivity of the VD₃ in the immune system, a nanoencapsulation system was used. Purinergic signaling plays a role in the modulation of inflammatory and immune responses of RA. Studies involving the evaluation of the activity of enzymes that participate in the degradation cascade of adenine nucleotides are important to verify the purinergic signaling in the regulation of the immune and inflammatory response during the clinical evolution of several diseases. The objective of this study was to evaluate the possible effects of the association of these compounds in the nanoencapsulated form on purinergic signaling by the activity of the enzymes E-ADA and E-NTPDase, in a model of arthritis induced by Freund's complete adjuvant (CFA). We also evaluated biochemical and oxidative stress parameters. Wistar rats were divided into groups with and without induction of arthritis. CFA was administered to the hind paw of the animals, after 15 days, arthritis induction, thermal hyperalgesia, paw edema, and arthritis score tests were performed. On the 15th day the treatment with VOC3 (15.84 IU / day) and curcumin 4mg / kg was started separately and in combination, or with curcumin in the free form 25mg / kg, with the vehicle or with white nanocapsules for 15 days. On the 30th day, arthritis induction, biochemical and ectoenzyme tests were performed on platelets, neutrophils, lymphocytes, myeloperoxidase (MPO) and reactive oxygen species (ROS). Liver and kidney were collected for histopathological analysis. The results demonstrate the success of the model in generating an inflammatory process, evidenced by the increase in paw edema and in the score of arthritis and hyperalgesia. No histopathological changes were observed in the hepatic analyzes of the animals and no deposition of nanocapsules was found. The increase in vascularization and disorganization of the renal glomeruli of the arthritic animals was reverted by the treatments. There was a reduction in E-NTPDase activity of neutrophils and an increase in E-ADA in neutrophils, platelets, and ADA in serum added with the decrease of E-ADA in lymphocytes suggest a proinflammatory response in induced animals. The high MPO activity in the arthritic animals confirmed the inflammatory process, however ROS levels did not change post induction and/or treatment. Both nanoencapsulated formulations have been shown to reduce the signs and symptoms of inflammation, revert changes in ectoenzyme activities, and protect liver and kidney tissues as seen in the histology and in the reduction of MPO activity. Thus, the treatments in association with nanocapsules were successful, suggesting an anti-inflammatory effect with reduction of the dose, and overcoming the difficulties of absorption and distribution of these compounds, and may serve as adjuvant therapy for the treatment of rheumatoid arthritis.

Keywords: Arthritis; Vitamin D₃; Curcumin, Nanocapsules; Purinergic System.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estágios de desenvolvimento e progressão da AR	22
Figura 2	Vias para a artrite reumatoide	24
Figura 3	Desenvolvimento da artrite reumatoide	25
Figura 4	Componentes da sinalização purinérgica	29
Figura 5	Conjunto de enzimas responsáveis pela cascata purinérgica	31
Figura 6	Principais fontes alimentares de vitamina D	37
Figura 7	Representação esquemática do metabolismo da vitamina D	38
Figura 8	Curcuminoídes presentes do extrato de <i>Curcuma longa L.</i>	41

MANUSCRITO I

Figura 1	Experimental procedure.	76
Figura 2	Effect of the treatments on clinical inflammatory changes induced by intraplantar CFA.	77
Figura 3	Histological photomicrographs of the kidney	79
Figura 4	Effect of the treatments on body weight	80
Figura 5	E-NTPDase activity in ATP and ADP hydrolysis in neutrophils	81
Figura 6	Adenosine deaminase activities	82
Figura 7	Myeloperoxidase activity	83
Figura 8	Reactive oxygen species levels	83

LISTA DE TABELAS

Table 1	Pharmaceutical composition of organic and aqueous phases of the following formulations	74
Table 2	Physicochemical characteristics of nanocapsules formulations	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adenosina desaminase
ADP	Adenosina difosfato
AIA	Artrite induzida por adjuvante
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Adenosina monofosfato
AR	Artrite reumatoide
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CFA	Adjuvante Completo de Freund
DANT	Doença e agravo não transmissível
DARMD	Drogas antirreumáticas modificadoras de doença
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DPB	Proteína ligante de vitamina D
E-ADA	Ecto- adenosina desaminase
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
E-NPP	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FR	Fator reumatoide
IFA	Adjuvante incompleto de Freund
HLA	Antígeno leucocitário humano
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-17	Interleucina-17
IL-21	interleucina-21
IL-23	Interleucina-23
INF- γ	Interferon gama
MMP	Metaloproteinases
MRBs	Modificadores de resposta biológicas
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NTPDase	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
MPTs	Modificações pós-traducionais
TGF- β	Fator transformador do crescimento beta
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
Th17	Linfócito T helper 17
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias

UI	Unidades internacionais
UV	Raio ultravioleta
VDR	Receptor de vitamina D
VD ₂	Calciferol ou ergocalciferol
VD ₃	Colecalciferol ou calcitriol
1,25 (OH) ₂ D ₃	1,25 dihidroxivitamina D ou calcitriol
25 (OH)D	25-hidroxivitamina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL:	19
2.2 Objetivos específicos:	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 ARTRITE REUMATOIDE	20
3.1.1 Epidemiologia	20
3.1.2 Patogênese.....	21
3.1.3 Diagnóstico	26
3.1.4 Tratamento	26
3.1.5 Modelos experimentais de artrite	28
3.2 SISTEMA PURINÉRGICO	29
3.2.1 Ectonucleotidasas.....	31
3.2.2 Adenosina desaminase.....	32
3.3 ARTRITE REUMATÓIDE E SISTEMA PURINÉRGICO	33
3.4 VITAMINA D3	36
3.4.1 Conceitos gerais	36
3.4.2 Fontes e metabolismo.....	37
3.4.3 Funções	39
3.5 CURCUMINA	40
3.6 NANOTECNOLOGIA	42
4 MANUSCRITO	46
5 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	87
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA UFSM (CEUA/UFSM)	103

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi redigida de acordo com as normas vigentes no Manual de Dissertações e Teses (MDT de 2015) e no Regulamento do PPG em Ciências Biológicas Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria, sendo organizada da seguinte maneira: Introdução, Revisão Bibliográfica, Objetivos, Manuscrito, Conclusão, Referências e Anexos.

Este trabalho de dissertação está subdividido em seções dispostas da seguinte maneira: Introdução, contendo uma breve descrição do contexto e relevância do estudo apresentado; Revisão Bibliográfica, constituída de um embasamento teórico-científico dos principais tópicos abordados no estudo e Objetivos, composto das finalidades da pesquisa. Os tópicos Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se na seção Manuscrito I, o qual representa a íntegra deste estudo. A formatação do manuscrito está organizada de acordo com as normas do periódico a qual será submetido: *"Inflammation Research"*. O item Conclusão contém interpretações e comentários dos resultados obtidos. A subdivisão Referências refere-se às citações mencionadas ao longo das seções Introdução e Revisão Bibliográfica desta dissertação. Por fim o item Anexo contém a carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSM.

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR), uma doença autoimune, sistêmica e inflamatória crônica, é reconhecida por uma forte resposta imune que resulta em inflamação e destruição articular, caracterizada basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva (FIRESTEIN, 2005; JOSEPH et al., 2010). Também tem acometimento sistêmico, com frequentes manifestações extra-articulares, como vasculite, glomerulonefrite, Síndrome de Felty's, pericardite, entre outros (SCHINNERLING et al., 2017).

Em seu curso usual a AR é caracterizada por um processo inflamatório persistente o que a torna uma condição altamente limitante. Pacientes com AR apresentam dor, fadiga e limitações de movimento o que os limita em realizar atividades básicas diárias ou laborais, tendo como resultado redução na qualidade de vida (RADNER et al., 2015).

O conseqüente dano em nível endotelial e o recrutamento de células inflamatórias causam a liberação de trifosfato de adenosina (ATP) no meio extracelular a fim de manter e sinalizar o processo inflamatório (SATTAR et al., 2003). A liberação de ATP por células necróticas, sob estresse ou danificadas, mantém e amplifica uma resposta pró-inflamatória, fazendo desta molécula um fator importante para o recrutamento e ativação das células imunes como linfócitos T (BURNSTOCK, 2007), neutrófilos (CHEN et al., 2010) e plaquetas (BIRK et al., 2017).

Os neutrófilos são as células em maior número no sítio inflamatório da AR. Esses fagócitos liberam a enzima mieloperoxidase (MPO) que além da destruição articular direta causa recrutamento de outros fagócitos, pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias por esses (LEFKOWITZ; LEFKOWITZ, 2001). Além disso, a população de neutrófilos pode produzir diretamente espécies reativas de oxigênio (EROS) ou indiretamente pela liberação de MPO (FERNANDES; SILVA; SATO, 2012) que pode indicar ativação celular, geração de radicais livres e o surgimento do estresse oxidativo, os quais são fatores importantes na patogênese da AR (MATEEN et al., 2016).

As ectonucleotidasas são um conjunto de enzimas que se encontram ancoradas a membrana plasmática e regulam os níveis de ATP e seus metabólitos a fim de manter as suas concentrações fisiológicas. As ectoenzimas E-NTPDase e E-5'-nucleotidase realizam a hidrólise de ATP em ADP, AMP em adenosina,

respectivamente. Finalizando a cascata de degradação dos nucleotídeos, a enzima E-ADA, é responsável por regular as concentrações de adenosina, através da conversão em inosina (YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). A molécula de adenosina, metabólito da degradação dos nucleotídeos da adenina, desempenha importante função de imunomodulação com um perfil anti-inflamatório (YEGUTKIN, 2008).

A liberação, hidrólise e interação dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina com os receptores de purinas desempenham papel importante em diversos efeitos biológicos, e regem fatores essenciais do processo inflamatório (DI VIRGILIO et al., 2001), tais como os que compõe a manutenção da AR, participando como moléculas sinalizadoras, que auxiliam na perpetuação da AR.

Destaca-se a atuação da vitamina D no sistema imunológico, uma vez que está envolvida na proliferação e diferenciação celular, interfere na produção de citocinas, demonstrando propriedades imunossupressora e imunomoduladora (CUTOLO et al., 2011; ANTICO et al., 2012).

Em baixas concentrações de vitamina D, o sistema imune favorece o desenvolvimento de células T auto reativas e a síntese de interleucinas pró-inflamatórias (IL-12, INF- γ), aumentando o risco de doenças autoimunes, como AR (ARNSON; AMITAL; SHOENFELD, 2007; DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009). Sabe-se que níveis apropriados de vitamina D reduzem algumas doenças inflamatórias crônicas e ou autoimunes como, a diabetes tipo 1, cânceres, esclerose múltipla e doenças reumáticas autoimunes como a AR (AGMON-LEVIN et al., 2013).

Por meio da suplementação dietética ou da administração oral de vitamina D pode-se prevenir o surgimento de artrite em humanos, e melhorar o prognóstico da doença, além de apresentar melhora na evolução da artrite induzida em modelos animais (CANTORNA; HAYES; DELUCA, 1998; CARRILHO; FERREIRA, 2009; DA SILVEIRA et al., 2016)

Contudo, a utilização sistêmica de vitamina D no tratamento de disfunções imunológicas é limitada, uma vez que a administração de doses orais elevadas pode gerar o desenvolvimento de hipercalcemia e hipercalcúria (DITTMER; THOMPSON, 2011).

Portanto, propõe-se um sistema capaz de elevar a bioatividade no sistema imune, a nanoencapsulação, que proporciona uma entrega mais eficiente de vitamina D, podendo então ser utilizada em doses reduzidas, e assim diminuir os efeitos

adversos de hipervitaminose (LUO; TENG; WANG, 2012). Também, a nanoencapsulação já demonstrou a capacidade de prevenir alterações inflamatórias e modificações na atividade de enzimas do sistema purinérgico na artrite induzida por adjuvante (DA SILVEIRA et al., 2016).

Alterações nas atividades de enzimas do sistema purinérgico também foram prevenidas pela utilização de curcumina em modelo de exposição à fumaça do cigarro (JAQUES et al., 2011a, 2011b, 2011c). A curcumina, presente na curcuma (*Curcuma longa*), contém uma mistura de antioxidantes fitonutrientes fortes, além de uma ampla gama de propriedades farmacológicas, incluindo as anti-inflamatórias, antioxidantes e antiartrítica (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; SAHEBKAR, 2015; PANAHI et al., 2016; QADIR; NAQVI; MUHAMMAD, 2016). Além de um potencial imunomodulador (JAGETIA; AGGARWAL, 2007).

Embora os compostos naturais sejam bem conhecidos e apresentem os benefícios descritos acima, sua utilização ainda é limitada por problemas de biodisponibilidade, como absorção, distribuição e metabolismo (ANAND et al., 2007). Além do mais, a curcumina está sujeita a rápida hidrólise sob condições alcalinas e é suscetível à degradação fotoquímica (WIKENE; BRUZELL; TØNNESEN, 2015; LIU et al., 2016).

Sendo assim, expostos os benefícios dos dois compostos citados a manipulação e o uso de curcumina em associação com vitamina D sob um sistema de nanoencapsulação poderia levar a resultados interessantes aumentando a estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade desses compostos em relação aos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes relacionados a alterações na sinalização purinérgica das células imunes na AR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito da associação de vitamina D e curcumina nanoencapsuladas sobre a sinalização purinérgica em neutrófilos, linfócitos e plaquetas, em um modelo animal de artrite.

2.2 Objetivos específicos:

Em ratos Wistar, com e sem artrite induzida por CFA, tratados com vitamina D₃ e curcumina livre ou nanoencapsulada em associação ou separadamente:

- Avaliar a efetividade da AIA e a resposta dos tratamentos segundo os parâmetros: edema de pata, hiperalgesia termal e escore de artrite;
- Verificar o ganho de peso dos animais pós indução e tratamentos;
- Realizar a avaliação histopatológica de fígado e rim dos animais;
- Verificar o efeito dos tratamentos na atividade das enzimas E-NTPDase e E-ADA de neutrófilos;
- Verificar o efeito dos tratamentos na atividade das enzimas E-ADA de linfócitos e plaquetas e ADA em soro;
- Determinar a atividade da enzima mieloperoxidase em plasma;
- Determinar os níveis plasmáticos das espécies reativas de oxigênio;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos hepáticos pelas atividades séricas das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e renais pela concentração de creatinina no soro dos animais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica multissistêmica, com características de autoimunidade, expressando grande prevalência (FELDMANN, 1996; WORDSWORTH; BELL, 2016). É caracterizada basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva, preferencialmente de articulações periféricas onde existe um intenso processo inflamatório com a presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos T, B e células dendríticas, as quais levam à destruição articular, ao edema e à dor (ZITTERMANN, 2003; CARRILHO; FERREIRA, 2009; MALMSTRÖM; CATRINA; KLARESKOG, 2017).

O desenvolvimento da AR ocorre de maneira insidiosa (GOMES et al., 2013) e além das manifestações articulares, tem o potencial para envolver diversos órgãos e sistemas (SCHINNERLING et al., 2017) e se apresenta de maneira heterogênea em termos de gravidade, progressão da inflamação articular, presença de manifestações extra-articulares e de resposta ao tratamento farmacológico (WORTHINGTON, 2005). O curso da AR é tipicamente intermitente, marcado por períodos variáveis de remissão e exacerbação, mas conservando um caráter progressivo de lesão tecidual (LAURINDO et al., 2004; MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010). Em pacientes com AR é observado dor, fadiga e limitações de movimento o que os tornam frequentemente incapazes de realizar as atividades básicas diárias ou laborais, tendo como resultado final redução na qualidade de vida (RADNER et al., 2015). Todos esses fatores podem acarretar inclusive o desenvolvimento de casos de depressão (FREDERICK; KALEB, 2009).

3.1.1 Epidemiologia

Com uma prevalência de aproximadamente 1% na população brasileira, cerca de 2 milhões de pessoas vivem com AR no nosso país, sendo esses similares a estimativa mundial. Com uma incidência anual de 0,02% a 0,05%, é uma doença que afeta de duas a três vezes mais o sexo feminino, sendo esse fato atribuído, em parte,

aos efeitos estimulatórios do estrogênio no sistema imunológico. No entanto, o papel dos fatores hormonais no desenvolvimento da AR ainda permanece controverso (ALPÍZAR-RODRÍGUEZ et al., 2016). Além disso, a incidência aumenta com a idade, surgindo geralmente na faixa etária de 30-50 anos, embora existam casos em todas as faixas etárias (RUDAN et al., 2015; WORDSWORTH; BELL, 2016).

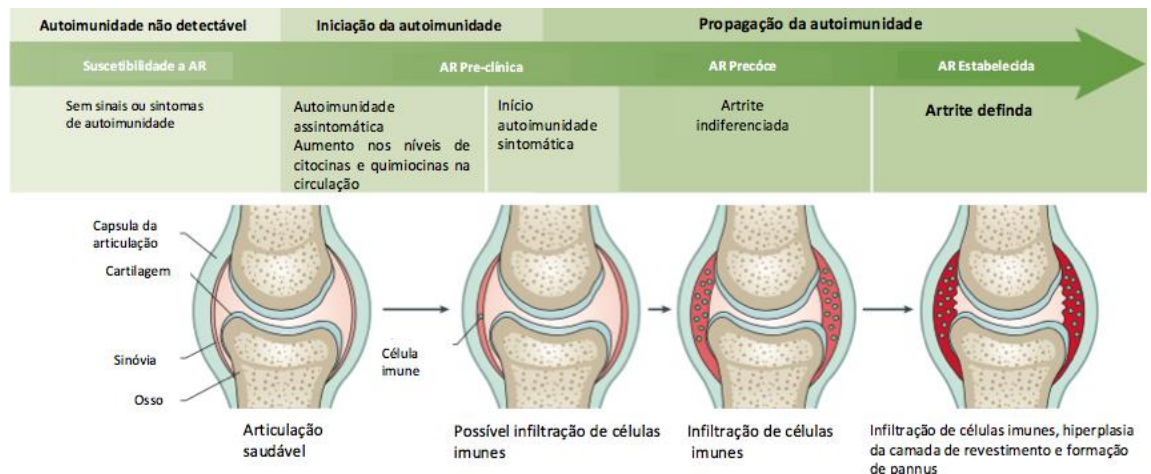
Segundo o Ministério da Saúde a AR é a doença e agravo não transmissível (DANT) que apresenta menor qualidade de vida em comparação com todas as outras DANT (POLLARD; CHOY; SCOTT, 2005; HAROON et al., 2007; RADNER et al., 2015).

Os pacientes portadores de AR têm uma sobrevida menor quando comparada a população saudável (CHOY, 2012). Também pela frequência de comorbidades, como infecções, hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia, osteoporose, doenças linfoproliferativas, doença cardiovascular e cerebrovascular (MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010; DOUGADOS et al., 2014).

3.1.2 Patogênese

A patogênese da AR, na sua generalidade, ocorre anos antes de quaisquer manifestações clínicas evidentes, embora possam ocorrer casos esporádicos de manifestação aguda (CONIGLIARO et al., 2016). Desse modo, o desenvolvimento da AR é contínuo e se baseia num pilar de suscetibilidade de fatores genéticos e ambientais com a perda da tolerância imunológica levando a formação de auto anticorpos (FIRESTEIN, 2014). O desenvolvimento da AR pode ser definido por cinco fases distintas (Figura 1), risco genético (suscetibilidade), autoimunidade assintomática (AR pré-clínica), sintomas não diferenciáveis de sinovite artrítica (início AR), evolução para AR bem determinada e por fim autoimunidade e inflamação contínua (AR estabelecida) (DEANE, 2012).

Figura 1- Estágios de desenvolvimento e progressão da AR



Fonte- Adaptado de Smolen et al. (2018).

A quebra na auto-tolerância das células T e B, tornando-se auto reativas, é o passo inicial do desenvolvimento da AR, essa desregulação culmina com a presença de autoanticorpos. Os mais presentes são o fator reumatoide (RF) e anticorpos anti peptídeo citrulinados (ACPAs) (SANMARTÍ; GÓMEZ-PUERTA, 2011).

Conforme a expansão das células auto-reativas ocorre, se inicia a liberação de citocinas e auto anticorpos dirigindo um “ataque” a sinóvia das articulações. O recrutamento de células mieloides e o mecanismo de reparação defeituosa pelas células endoteliais, fibroblastos, condrócitos e células ósseas mantem o estado inflamatório contínuo da doença (FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996; SZEKANECZ; KOCH, 2007). Todavia facilitado pela neoangiogênese, induzida por inflamação (KOCH, 2003).

Os pacientes com AR demonstram função defeituosa das células T reguladoras circulantes (Treg) e um aumento nas células T helper 17 (Th17) no plasma e no líquido sinovial (SCHER; ABRAMSON, 2011). Ocorre então uma polarização no sentido da formação das Th1 e Th17 sustentada pela liberação do fator transformador do crescimento beta (TGF- β) e as citocinas interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6(IL-6), interleucina-21(IL-21) as quais suprimem a diferenciação de células Treg, alterando assim a homeostase de células T em direção à inflamação (MCINNES; SCHETT, 2011).

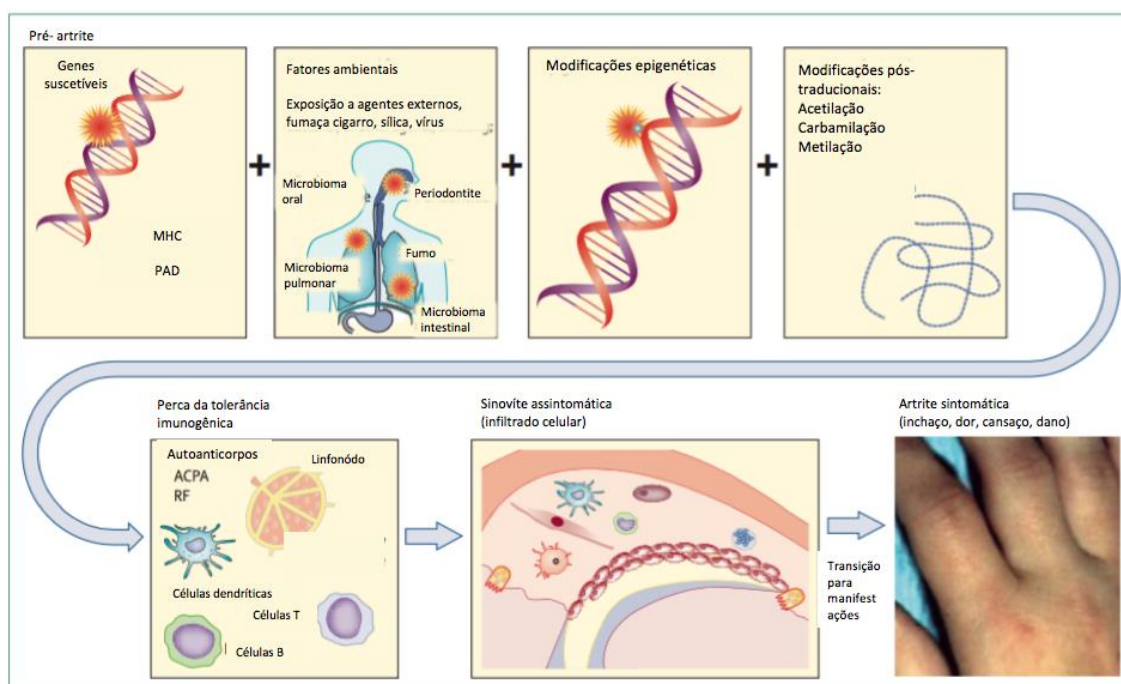
As modificações pós-traducionais (MPTs) são os fatores fundamentais para a antigenicidade das proteínas e desenvolvimento da AR. As três MPTs mais envolvidas na artrite reumatoide são citrulinização, glicosilação e carbamilação (LOURIDO;

BLANCO; RUIZ-ROMERO, 2017). O processo da conversão da arginina em citrulina pela enzima peptidil arginina deiminases (PAD), a citrulinização, é a principal modificação pós-traducional associada ao auto antígeno na artrite reumatoide (LOURIDO; BLANCO; RUIZ-ROMERO, 2017). A citrulina pode alterar a estrutura proteica e gerar novos epítomos associados à produção de ACPAs. Esses ACPAs vão apresentar reatividade contra vários peptídeos, proteínas incluindo fibrinogênio, fibronectina, α -enolase, colágeno tipo II e histonas (KLARESKOG; AMARA; MALMSTRÖM, 2014).

Um fator importante para o início da AR é a resposta imune das mucosas. Na mucosa pulmonar ou gengival a atuação das células imunes (neutrófilos, células dendríticas e macrófagos) é muitas vezes exacerbada frente as exposições repetidas a partículas de fumo ou ambientais (pó de sílica) e também resposta a infecções, como a periodontite (CHEN et al., 2016; HORTA-BAAS et al., 2017) levando ao aparecimento da inflamação, citocinas circulantes, e aumento de quimiocina juntamente com associado à mucosa produção de autoantígenos. Os antígenos citrulinados são processados e apresentados pelas APCs às células T, que são ativadas e, por sua vez, ativam a célula B, levando à produção de auto anticorpos. O fumo, a resposta imune das mucosas e a microbiota intestinal são estímulos que podem iniciar a citrulinização pela ativação da PAD, aumento da apresentação de antígenos e a produção de células T e B (CATRINA et al., 2016; BENNIKE et al., 2017; HORTA-BAAS et al., 2017).

Fatores genéticos podem afetar o processamento e a apresentação do antígeno, proliferação e diferenciação de linfócitos, podem codificar para receptores de células T e B. Os variantes de antígeno leucocitário humano (HLA), desempenham papel importante na determinação do desenvolvimento de auto anticorpos específicos, os principais são o HLA-DR4 e o HLA-DRB1 (MCINNES; SCHETT, 2011; CHOY, 2012; CONIGLIARO et al., 2016). Este gene codifica uma proteína de superfície dos leucócitos envolvida no processo de apresentação de antígenos, complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (BAX et al., 2011).

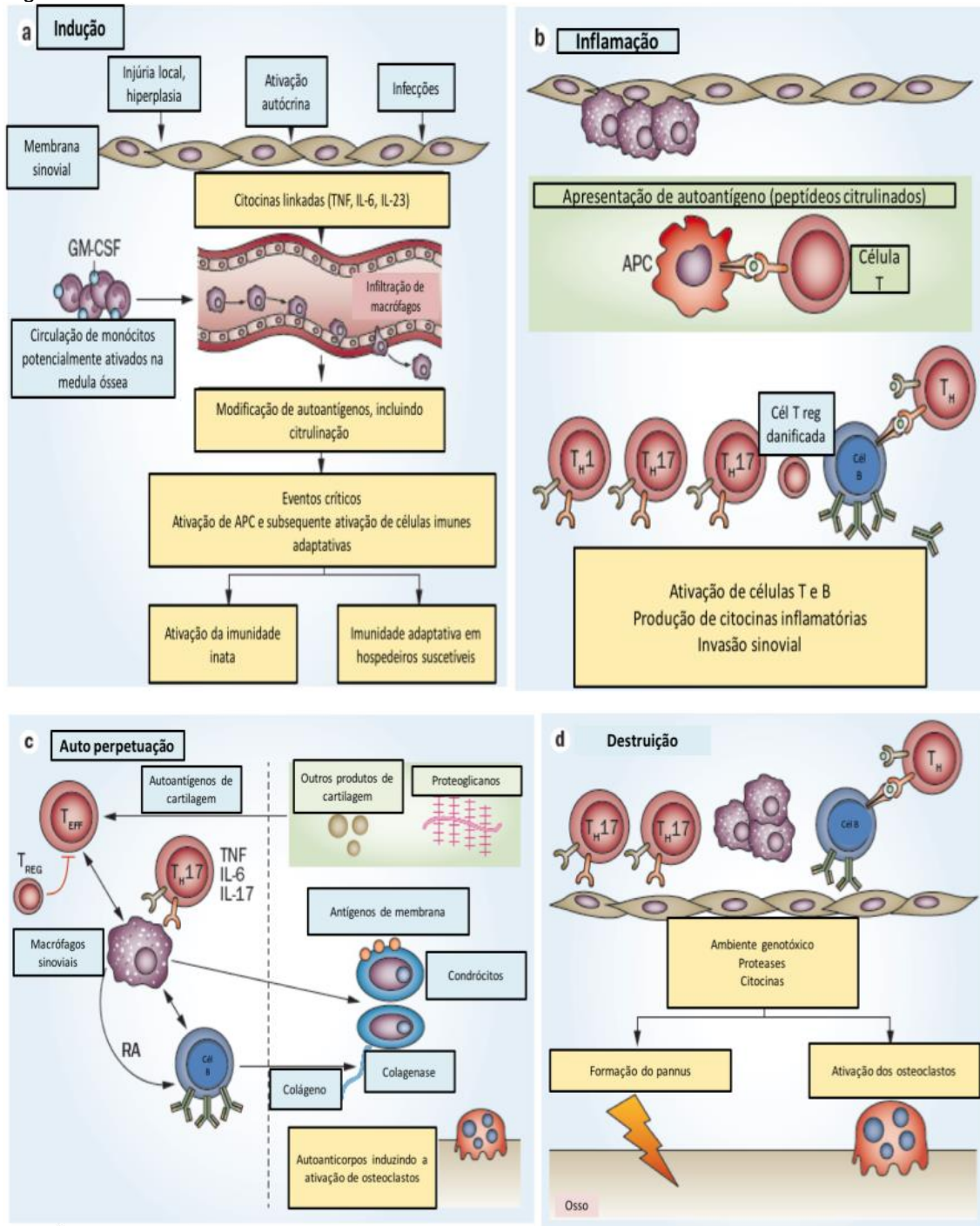
Figura 2 – Vias para a AR



Fonte: Adaptação de Smolen (2016).

O edema articular característico na patogênese da AR reflete a inflamação da membrana sinovial, a qual se torna hiper celular, gerando um ambiente hiperplásico e hipertrófico, altamente vascularizado, com a construção de uma camada de revestimento de células sinoviais, células imunes inatas (monócitos, células dendríticas, mastócitos e células linfoides inatas) e células imunes adaptativas (por exemplo, células Th1 e Th17, células B e plasmócitos) (CHOY, 2012; FIRESTEIN; MCINNES, 2017), transformando-se em tecido inflamado. Esse novo tecido é conhecido como sinovite crônica ou pannus, e demonstra uma resposta robusta em que os fibroblastos sinoviais assumem um fenótipo agressivo inflamatório, e invasivo, provocando aumento do catabolismo dos condrócitos e osteoclastogênese sinovial promovendo a destruição articular (POLLARD; CHOY; SCOTT, 2005; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016) (Figura 3).

Figura 3- Desenvolvimento da AR



Adaptado de BURMESTER et al. (2014). APC (células apresentadoras de antígeno), GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos), AR (artrite reumatoide), T_{EFF} (células T efetoras), T_H (células T helper), T_H1 (células T helper 1), T_H17 (células T helper 17), T_{REG} (células T reguladoras).

Os linfócitos B originam plasmócitos, que produzem grandes quantidades anticorpos (ADLOWITZ et al., 2015), sendo o FR o mais importante deles. O FR trata-se de um auto anticorpo, na maior parte IgM, que reconhece a porção Fc de

autoanticorpos do tipo IgG, formando imunocomplexos. Pode ser detectado no sangue de 70-80% dos pacientes artríticos (NELL-DUXNEUNER et al., 2010).

Os neutrófilos tornam-se ativados na articulação de pacientes com AR por complexos imunes (como o FR) (ROLLET-LABELLE et al., 2013). Uma vez ativados, os neutrófilos causam danos ao tecido do hospedeiro por degranulação e liberação de ROS e MPO, seja no líquido sinovial ou diretamente na superfície da articulação (FOSSATI et al., 2002).

O padrão de resposta será determinado pelas células Th1 ou Th17 é caracterizado por apresentar linfócitos T autoreativos, e predomínio na diferenciação de linfócitos Th1 em relação aos Th2, os quais produzem mediadores inflamatórios que resultam nas deformidades articulares e ósseas promovem ativação endotelial e celular, gerando degradação da cartilagem (CHOY, 2012; FIRESTEIN; MCINNES, 2017; SCHINNERLING et al., 2017).

3.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da AR é determinado pela associação de uma gama de manifestações clínicas somadas a achados radiológicos e laboratoriais (CHOY et al., 2013). Os critérios descritos, pela ACR-EULAR (“Liga da União Europeia Contra o Reumatismo”) determinam uma nova classificação baseada em escore de pontos, que consideram: acometimento articular (0–5), sorologia (0–3), reagente de fase aguda ou provas de atividade inflamatória (0–1), duração dos sintomas (0–1).

Para ser determinado como portador da AR, o indivíduo deve contar com seis ou mais pontos, de uma escala de dez (ALETAHA et al., 2010).

3.1.4 Tratamento

Para que se obtenha sucesso em prevenir a incapacidade funcional e um grau de lesão articular irreversível o diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença (CARRILHO; FERREIRA, 2009; MCINNES; SCHETT, 2011). Os objetivos terapêuticos da AR são prevenir ou controlar a lesão articular, prevenir a perda de função e diminuir a dor, para resguardar ao máximo a qualidade de vida. Contudo mesmo com diagnóstico precoce e

tratamento imediato a remissão completa, raramente é alcançada (CARRILHO; FERREIRA, 2009; MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010).

O tratamento é feito em duas etapas conjuntas e com início concomitante. A utilização de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e corticosteroides somada ao emprego de drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) (SINGH et al., 2016).

A recomendação terapêutica medicamentosa de primeira escolha (padrão ouro) é o metotrexato, uma Droga Antirreumática Modificadora de Doença (DARMD) (SINGH et al., 2016). As DARMDs têm a propriedade de alterar o curso da doença, causando atraso e evitando a progressão das lesões estruturais da AR. Tanto em monoterapia quando em uso concomitante com AINEs, são indicadas a partir da definição do diagnóstico (MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010; SINGH et al., 2016). Além dos efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, essas drogas possuem efeito imunomodulador e imunossupressor (ROY et al., 2017). A sulfassalazina, hidroxicloroquina, leflunomida e azatioprina são medicamentos que fazem parte deste grupo. O principal modo de ação da leflunomida, por exemplo é diminuir a síntese de novo das pirimidinas ao inibir a enzima mitocondrial diidroorotato desidrogenase, a inibição dessa enzima impede a proliferação rápida de linfócitos, diminuindo a atividade inflamatória presente na membrana sinovial dos pacientes com AR. Já o MTX por mecanismo semelhante inibe a enzima 5-amino-imidazol-4-carboximide ribonucleotide transformilase (AICAR) que afeta a ação enzimática da adenosina deaminase (ADA), que resulta em consequente acúmulo de adenosina, a qual confere efeitos anti-inflamatórios (CHAN; CRONSTEIN, 2010).

A compreensão da patogênese da AR voltada aos efeitos das citocinas pró-inflamatórias da doença (FORERO et al., 2007), possibilitou o desenvolvimento de uma nova classe fármacos, os modificadores de respostas biológicas (MRBs) ou as DARMDs biológicas (MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010; CHOY; KAVANAUGH; JONES, 2013; SINGH et al., 2016). Essas drogas têm como alvo citocinas, anticorpos específicos e moléculas mensageiras do sistema imunológico envolvidas na doença, com papel central na instalação e na progressão da sinovite reumatoide e o consequente bloqueio da destruição óssea e cartilaginosa (MANDERS et al., 2015; O'SHEA et al., 2015). Entre eles estão os agentes neutralizadores do TNF- α ou os anti-TNF-alfa (infliximab, golimumab, adalimumab e etanercept) os bloqueadores do receptor de IL-1 (anakinra); bloqueadores de receptor de IL-6 (tocilizumab); inibidor de linfócitos T (abatacept); neutralizadores do CD20 (rituximab)

e moléculas que inibem as vias de sinalização intracelular pela inibição de células imunes (tofacitinib) (DE STEFANO et al., 2010; TAK et al., 2011; MANDERS et al., 2015; O'SHEA et al., 2015).

É de importância científica ressaltar que além da farmacoterapia tradicional, novas estratégias terapêuticas são desenvolvidas paralelamente ao conhecimento da fisiopatogênese da AR, na tentativa de regular os processos imune e inflamatório.

3.1.5 Modelos experimentais de artrite

Os modelos experimentais de AR fornecem uma melhor compreensão da fisiopatologia da AR e permitem a investigação de novas terapias para a doença (GOMES et al., 2013; MENEZES, 2013). Entre os modelos, destacam-se: o induzido por colágeno bovino tipo II (CIA) (TU et al., 2012) e por adjuvante completo de Freund (CFA) (GOMES et al., 2013; MENEZES, 2013) ou por adjuvante incompleto de Freund (IFA), ambos com *Mycobacterium tuberculosis* inativado (OLIVEIRA et al., 2007). Dentre os fatores já citados, também as semelhanças morfológicas com a doença humana, facilidade de uso e capacidade de prever a eficácia clínica somadas a produção acelerada de resultados sobre eficácia pré-clínica e toxicidade de terapias antiartríticas demonstra a relevância do uso de um modelo é importante (BENDELE, 2001).

O modelo CFA induz uma artrite crônica e progressiva em ratos, conhecida como artrite induzida por adjuvante (AIA) (GOMES et al., 2013). Neste modelo, uma única injeção intraplantar de CFA (um adjuvante com um antígeno, *Mycobacterium tuberculosis*, inativados pelo calor e liofilizados, emulsificados com óleo mineral, 10 µg/mL) promove o desenvolvimento da artrite (DA SILVEIRA et al., 2016). Após inoculação, ocorre a migração dos antígenos (patógenos inativados) para as articulações onde estabelecem uma infecção local, com evolução para artrite (GOMES et al., 2013).

Esse modelo é caracterizado pela ativação de uma resposta imune persistente nas articulações, membrana sinovial e cavidade articular, com intensa migração e infiltração celular e liberação descontrolada de produtos bioativos, mimetizando fielmente a AR. Nessas condições, a intervenção com novas terapias capazes de alterar esses processos é e de extremo interesse (XIE et al., 2013). A AIA por CFA apresenta alodínia, hiperalgesia, edema de pata e alterações histopatológicas

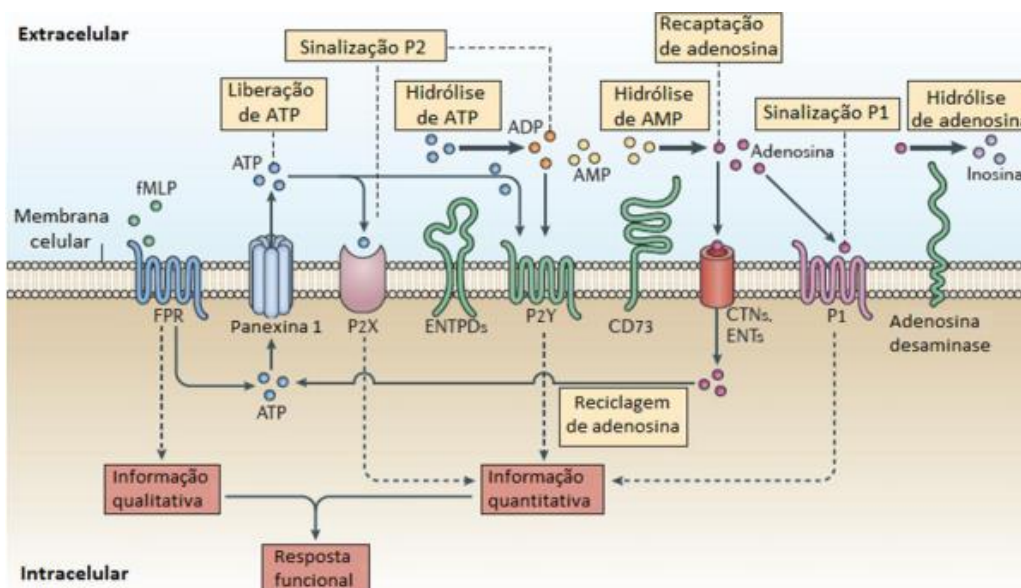
semelhantes com a patologia humana, e tem sido utilizada para examinar e avaliar medicamentos e ou substâncias antiartríticas e investigar potenciais alvos terapêuticos para AR (MENEZES, 2013; CASTILHOS et al., 2015; DA SILVEIRA et al., 2016).

3.2 SISTEMA PURINÉRGICO

A sinalização purinérgica é uma rota comum e bem estudada, ela promove a comunicação célula-célula e faz parte de muitos eventos os quais incluem processos biológicos e patológicos como respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003; BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012)

Os nucleotídeos da adenina, a adenosina trifosfato (ATP), a adenosina difosfato (ADP) e a adenosina monofosfato (AMP) e seu derivado nucleosídeo, a adenosina, por meio da interação com seus respectivos receptores (purinoreceptores) participam como moléculas sinalizadoras extracelulares e desempenham importante papel na regulação das respostas imunes (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003). As concentrações destas biomoléculas são reguladas por meio da sua degradação enzimática, a qual se dá através da ação das ectonucleotidases (ATKINSON et al., 2006; BATTASTINI; ZANIN; BRAGANHOL, 2011).

Figura 4 - Componentes da sinalização purinérgica.



Fonte: Adaptado de JUNGER (2011).

Células endoteliais, leucócitos, linfócitos e plaquetas sob estresse, em apoptose ou necrose fazem a liberação e ou produção dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídeo adenosina. Os nucleotídeos promovem inflamação rápida pela ligação a receptores específicos, ou podem controlar os sinais inflamatórios por meio da ligação de adenosina a seus receptores (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012).

O ATP é uma molécula existente em todas as células do organismo e é sinalizadora do sistema purinérgico, que está envolvido na regulação de vários processos fisiopatológicos no meio extracelular (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014; LEDDEROSE et al., 2016). A liberação de ATP em baixas concentrações ocorre como mecanismo fisiológico, porém atua como molécula citotóxica em resposta a danos celulares, como hipóxia e injúrias quando em altas concentrações (BURNSTOCK, 2007; BATTASTINI; ZANIN; BRAGANHOL, 2011). Os produtos da hidrólise do ATP, os nucleotídeos ADP e AMP não possuem um papel definido nos linfócitos (BOURS et al., 2006). Contudo, ADP age como um mediador da agregação plaquetária e da tromborregulação (ZIMMERMANN, 2000). Já o AMP é um metabólito intermediário entre ATP e adenosina (BARSOTTI; IPATA, 2004; ANTONIOLI et al., 2013b).

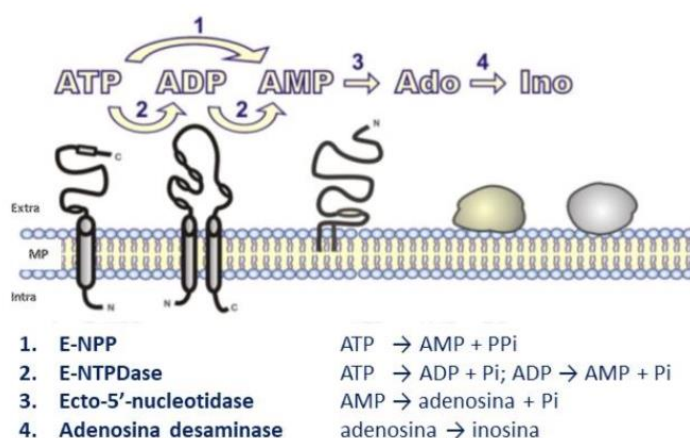
O nucleosídeo adenosina que é um metabólito da degradação de nucleotídeos da adenina, formada a partir do precursor ATP, está envolvido na síntese de ácidos nucléicos, metabolismo de aminoácidos, modulação do estado metabólico da célula e desempenha funções importantes como efeitos neuromodulatórios, regulação de processos inflamatórios (agente anti-inflamatório endógeno), inibição da agregação plaquetária ação vasodilatadora (LINDEN, 2001; HASKÓ; CRONSTEIN, 2004; ANTONIOLI et al., 2013a; PASSOS et al., 2018). Tem ação imunossupressora, causando a inibição da liberação de citocinas, da adesão de células imune e do funcionamento de linfócitos citotóxicos (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004; OHTA; SITKOVSKY, 2014).

Os nucleotídeos liberados no meio extracelular, antes de serem metabolizados pelas ectonucleotidases, interagem com receptores específicos da membrana plasmática (ZIMMERMANN, 2000; BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012).

Os receptores purinérgicos se dividem em duas famílias: P1 e P2 e são ativados pela adenosina e por ATP e ADP respectivamente. Os efeitos da adenosina são mediados através da sua ligação aos receptores P1, são eles A1, A2A, A2B e A3. Todos os receptores são glicoproteínas transmembrana acopladas a proteína G

(BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014; BURNSTOCK, 2017). A sinalização do ATP ocorre por meio de sua ligação com os receptores do tipo P2, que são subdivididos em dois grupos, os receptores ionotrópicos P2X (P2X1-7), e os receptores metabotrópicos P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11). Os receptores P2X e P2Y ligam-se preferencialmente ATP e/ou UTP, mas podem ser ativados por ATP, UTP, UDP, ITP e ainda nucleotídeos glicosados (JUNGER, 2011; BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014; BURNSTOCK, 2017).

Figura 5- Conjunto de enzimas responsáveis pela cascata purinérgica



Fonte: Adaptado de Yegutkin (2008)

3.2.1 Ectonucleotidases

A sinalização induzida pelas moléculas de nucleotídeos é concluída pela ação das ectonucleotidases, as quais estão presentes na superfície da membrana celular e tem como função manter os níveis de nucleotídeos extracelulares em concentrações fisiológicas (ZIMMERMANN, 2000) (ZIMMERMANN, 2000). As ectonucleotidases podem ser classificadas como membros das famílias: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), fosfatases alcalinas e ecto 5'-nucleotidases (E-5'-NT) (ZIMMERMANN, 2000; YEGUTKIN, 2008; BATTASTINI; ZANIN; BRAGANHOL, 2011).

A E-NTPDase (CD39; E.C 3.6.1.5) está relacionada a vários eventos celulares da sinalização purinérgica, tais como neurotransmissão, controle da agregação plaquetária, (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012) transdução de sinal através da adesão célula-célula (CORRIDEN et al., 2008), além de uma destacada função nas respostas imune e inflamatória (BECKER et al., 2010; ANTONIOLI et al., 2013b; DA SILVEIRA et al., 2016)

A relação entre as alterações na atividade da E-NTPDase e as mais diversas condições patológicas vem sendo descrita na literatura, são elas diabetes (CALGAROTO et al., 2015; LUNKES et al., 2017), câncer (GOMBAULT; BARON; COUILLIN, 2012; SCHULER et al., 2014; BURNSTOCK, 2017; VIJAYAN et al., 2017) o infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et al., 2008), na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LEAL et al., 2005) e na hipercolesterolemia (RUCHEL et al., 2016), também sua modulação já é descrita como possível caminho farmacológico (ANTONIOLI et al., 2013b).

A enzima ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT) realiza a desfosforilação nucleosídeos monofosfatados, hidrólise da ligação fosfodiéster de 5'-ribonucleotídeos, levando à formação do correspondente ribonucleosídeo e fosfato. A ecto-5'-nucleotidase também apresenta uma ampla distribuição tecidual e na cascata enzimática finaliza a ação dos nucleotídeos sendo a principal enzima responsável pela produção de adenosina extracelular (ZIMMERMANN, 2000; ATKINSON et al., 2006; BATTASTINI; ZANIN; BRAGANHOL, 2011).

3.2.2 Adenosina desaminase

A adenosina desaminase (ADA) (E.C. 3.5.4.4.) é responsável por catalisar a desaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxinosina, respectivamente (ATKINSON et al., 2006).

Esta enzima também é bem difundida no organismo, ela se encontra presente no soro nos tecidos linfoides e é essencial para a função e maturação dos linfócitos T e para a maturação e proliferação dos monócitos e macrófagos no sistema imune (VAN DER WEYDEN; KELLEY, 1976). Ela pode ser encontrada como uma ectoenzima (na superfície celular), mas também é encontrada no citosol. Sua função primária é controlar os níveis de adenosina e inosina, os quais regem importantes funções no sistema imune em processos inflamatórios. Alterações em sua atividade têm sido consideradas indicadores de distúrbios imunológicos, pois vem sendo usada para monitorar várias patologias imunológicas (FERNÁNDEZ et al., 2013; HAMEED et al., 2018; PASSOS et al., 2018).

Existem diferentes subtipos de ADA (ADA₁ e ADA₂), demonstrando características cinéticas distintas, as quais sugerem função diferenciada de cada membro no organismo (KALJAS et al., 2016). A ADA1 é uma enzima monomérica

importante na resposta imune mediada por linfócitos T. Tecidos como fígado e rins apresentam tanto a ADA1 solúvel quanto a forma associada a uma proteína de ligação. O complexo ADA-proteína de ligação constitui uma ecto-ADA, a qual é responsável pelo controle dos níveis de adenosina extracelular (SITKOVSKY; OHTA, 2005; BURNSTOCK, 2007).

Diferente de seu outro subtipo a ADA2 é uma proteína secretada. Sugere-se que a ADA2 liberada a partir de células apresentadoras de antígenos pode estar envolvida na sinalização célula-célula (ZAVIALOV; ENGSTRÖM, 2005; ROBERTS; ROBERTS, 2012; KALJAS et al., 2016).

A regulação negativa pela atividade da ADA pode causar o acúmulo de adenosina nos locais inflamados, modulando por meio da ativação dos receptores P1 a diferenciação de células dendríticas, também pode afetar as funções dos macrófagos, linfócitos e plaquetas. Já um aumento na atividade da ADA vai limitar os efeitos imunoreguladores e tromborreguladores da adenosina em razão da diminuição na sua concentração (SITKOVSKY; OHTA, 2005; YEGUTKIN, 2008; FERNÁNDEZ et al., 2013).

3.3 ARTRITE REUMATÓIDE E SISTEMA PURINÉRGICO

Após o evento de desencadeamento da AR (infecção, exposição ambiental) ocorre a ativação de células inflamatórias e imunológicas (MCINNES; SCHETT, 2011). O passo inicial é resumido como a quebra da auto tolerância das células B e T, à autorreatividade, do sistema imune. À medida que ocorre a expansão “autorreativa”, inicia-se a liberação de citocinas e auto anticorpos, levando a um ataque às articulações sinoviais. O recrutamento de células das classes linfoides, mieloides e os mecanismos de reparo de danos pelas células endoteliais, fibroblastos, condrócitos e osteócitos sustentam o estado inflamatório contínuo da AR (FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996; SZEKANECZ; KOCH, 2007)

O sistema purinérgico está envolvido com esse processo patológico, promovendo e participando do processo inflamatório, causando recrutamento, ativação e interligação entre as células envolvidas na AR (VARANI et al., 2010)

O papel da sinalização purinérgica na AR foi reconhecido pela primeira vez nos anos 90, após a adenosina, através da quebra de ATP, ser identificada para o tratamento desta doença (RYAN; RACHOW; MCCARTY, 1991).

A inflamação da membrana sinovial é caracterizada pela infiltração de leucócitos, como mastócitos, células dendríticas, monócitos e linfócitos B, Th1, Th17 e plasmócitos (MCINNES; SCHETT, 2011). O dano endotelial e a ativação levam a alterações na permeabilidade endotelial e aumento da adesão celular imune, sinalizando o processo inflamatório através da liberação de ATP (SATTAR et al., 2003). Em condições fisiológicas, o ATP extracelular está presente em pequenas quantidades de aproximadamente 10 nM, reguladas por ectonucleotidases ancoradas na membrana plasmática (BARON et al., 2016). No entanto, em eventos patológicos, as concentrações de ATP extracelular passam de um nível quase indetectável para centenas de valores micromolares (MORCIANO et al., 2017).

O ATP liberado pelas células sob estresse, danificadas e necróticas é identificado como alarmina e inicia uma resposta pró-inflamatória. As alarminas são fatores endógenos que indicam padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs), que são especializados no recrutamento e ativação de células inatas imunes e promovem a cicatrização e homeostase tecidual (BIANCHI, 2006). No entanto, em doenças autoimunes, como AR, a falha nas respostas regulatórias faz com que as alarminas (ATP) funcionem como indicadores de inflamação (BIANCHI, 2006). Portanto, pode-se supor que o ATP desempenha um papel na indução da AR, assim como na sua patogênese por meio do feedback positivo, preservando a ativação imune (KILLEEN et al., 2013).

A sinalização purinérgica é desencadeada ativando os receptores P2, como resultado da liberação de ATP para o ambiente extracelular, levando a um estado pró-inflamatório. Por outro lado, a adenosina promove principalmente uma resposta anti-inflamatória por ligação aos receptores P1 (BOURS et al., 2006).

Além disso, uma possível associação entre atividade de ectonucleotidases e doenças imunes pode ser rastreada. Como existe uma relação entre atividade enzimática e ativação de linfócitos durante a resposta imune, uma elevação da atividade da E-NTPDase em linfócitos de pacientes com RA (JAQUES et al., 2013a), bem como em modelos animais de AR (DA SILVEIRA et al., 2016), já foi demonstrada. Como consequência, há uma maior liberação de ATP e ADP em resposta à ativação inflamatória, resultando em aumento da atividade enzimática, a fim de manter as concentrações de nucleotídeos da adenina em níveis fisiológicos. No entanto, o aumento da hidrólise desses nucleotídeos favorece a formação de adenosina, que possui propriedades anti-inflamatórias.

Tomadas em conjunto, estas alterações na via CD39/CD73 podem desregular o mecanismo de auto-tolerância e, assim, contribuir para o aparecimento de doenças auto-imunes (DWYER et al., 2007). As principais células neste meio regulatório são Foxp3⁺ T regulatórios (Treg), que desempenham um papel fundamental na prevenção de doenças auto-imunes (ANTONIOLI et al., 2013b). CD39 e CD73, são altamente expressos em Tregs, servindo como biomarcadores do tipo celular. O aumento na atividade destas enzimas resulta em níveis elevados de adenosina que é uma molécula de chave na ação supressora imune de Tregs (ERNST; GARRISON; THOMPSON, 2010).

O desenvolvimento da AR é mediado por células apresentadoras de antígenos, linfócitos, neutrófilos, até mesmo plaquetas, que expressam ADA na superfície celular (MARTIN et al., 1995; CASANOVA et al., 2012; SOUZA et al., 2012; WANG; CHEN, 2018).

O aumento da liberação e geração de adenosina pelas ectonucleotidases e a sua degradação pela elevação da atividade da ADA podem ser sugeridos como fatores que favorecem o estado inflamatório relacionado à AR (ANTONIOLI et al., 2012; SALES et al., 2012). Assim, pode-se traçar uma conexão entre a atividade dessa enzima e a inflamação relacionada à AR. O metabolismo da adenosina é um excelente alvo farmacológico a ser explorado para a AR, assim como ocorre parte do mecanismo de ação do metotrexato (MTX) (ANTONIOLI et al., 2012).

Além da função metabólica a E-ADA apresenta interação com os receptores de adenosina e a molécula CD26, que atuam como proteínas de ligação, favorecendo a comunicação célula a célula (BECKENKAMP et al., 2016; MORENO et al., 2018) promovendo efeito estimulante sobre a proliferação de células T (PACHECO et al., 2005; ZHONG et al., 2015), infiltração celular das articulações, aumentando a invasão e a adesão celular.

A interação da proteína CD26 com a ADA, cujos efeitos parácrinos estimulam e ativam as células envolvidas na AR, pode nos fornecer uma abordagem alternativa no entendimento e manejo da patogênese da AR. Essa função recentemente encontrada da ADA corrobora a noção de que a patogênese da AR está fortemente ligada a alterações na via purinérgica.

Essas enzimas regulando a imunidade e a inflamação por controlar o metabolismo de nucleotídeos são alvos promissores nas doenças inflamatórias. A atividade das enzimas purinérgicas podem sofrer mudanças, frente a patologias ou

a intervenções farmacológicas, sendo alvos dinâmicos que devem ser explorados a fim de direcionar e controlar as condições patológicas (ANTONIOLI et al., 2013b; JAQUES et al., 2013b; DA SILVEIRA et al., 2016).

Uma vez que o desenvolvimento da AR é mediado por células como linfócitos, neutrófilos e plaquetas e as moléculas ATP e adenosina conduzem muitos dos efeitos entre as respostas inflamatória e anti-inflamatória da AR, se torna importante compreender a sinalização que ocorre por meio das atividades das ectonucleotidases na AR.

3.4 VITAMINA D3

3.4.1 Conceitos gerais

A vitamina D é um hormônio esteróide, conhecida pelo seu importante papel na regulação dos níveis corporais de cálcio e fósforo e da mineralização óssea (UNGER, 2009). Sua estrutura química é semelhante aos clássicos hormônios seco-esteroides, como o estradiol, o cortisol e a aldosterona (NORMAN, 2008; CARRILHO; FERREIRA, 2009).

A designação “vitamina D”, compreende tanto a vitamina D₂ como a D₃, elas são denominadas com o colecalciferol ou calcitriol (vitamina D₃) produzido na pele ou adquirida através da dieta, e o ergocalciferol ou calciferol (vitamina D₂) de origem vegetal (DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009) (Figura 6).

Embora sejam metabolizadas de maneira semelhantes a vitamina D₃ é substancialmente mais eficaz do que a vitamina D₂ em humanos (BIKLE, 2009; CARRILHO; FERREIRA, 2009; DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009).

Figura 6 – Principais fontes alimentares de vitamina D.

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Óleos de fígado de peixe, tais como óleo de fígado de bacalhau 1 colher de sopa (15 mL) fornece 1,360 UI ▪ Peixes gordos, tais como: <ul style="list-style-type: none"> Arenque, 85 g - 1383 UI Carapau cozinhado 85 g - 425 UI Salmão cozinhado, 100 g - 360 UI Sarda cozida, 100 g - 345 UI Sardinha enlatado em óleo, 50 g - 250 UI Atum enlatado em óleo, 85 g - 200 UI Enguia cozida, 100 g - 200 UI ▪ Um ovo inteiro - 25 UI ▪ Fígado cozido, 100 g - 15 UI ▪ Cogumelos naturais (Vitamina D₂), 100 gr – 100 UI ▪ Leite magro fortificado com vitamina D – 1 chávena – 98UI ▪ Margarina fortificada com vitamina D (1 colher de sopa) - 60 UI ▪ Cereais enriquecidos com 10% de DDR para a vitamina D (uma chávena) - 40 UI ▪ Exposição solar corporal a UV-B (15-20 mn às 12 h, no indivíduo de pele clara) – 10 000 UI

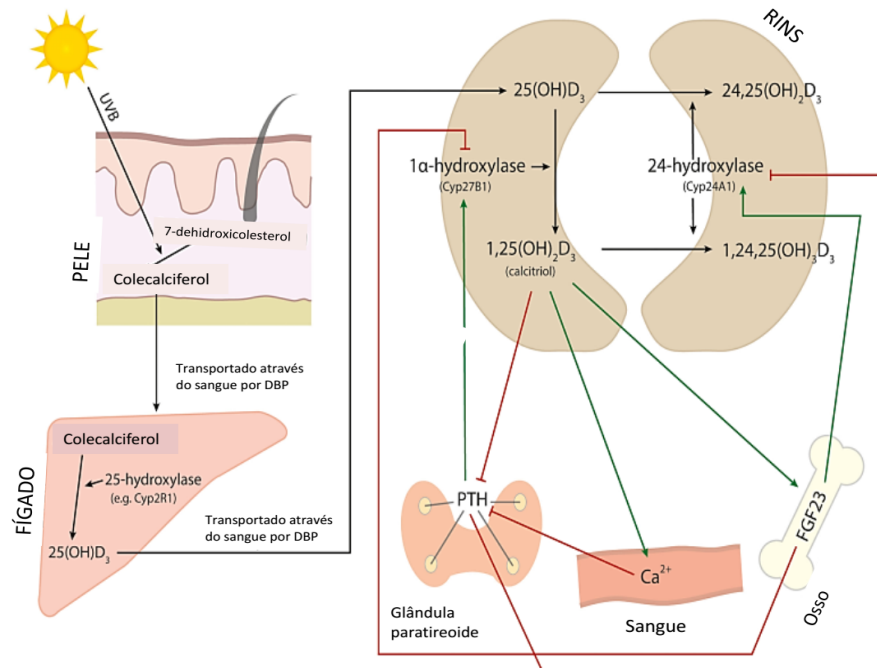
Fonte- adaptado de Carrilho(2009)

3.4.2 Fontes e metabolismo

Considerado como um nutriente essencial, a principal fonte de vitamina D para a maioria das pessoas é a exposição da pele à luz solar. Durante a exposição, os raios UVB₂ (290-315nm) fotolisa o 7-desidrocolesterol (7-DHC) em pré-vitamina D₃. Ligado a proteína de ligação à vitamina D (DBP) o colecalciferol é transportado para o fígado e isomerizado.

No tecido hepático várias hidroxilases da vitamina D do citocromo p450 (Cyp) convertem em 25(OH)D₃ ou calcidiol. Esta forma representa a forma circulante em maior quantidade, porém biologicamente inerte (HOLICK, 2005; SCHUCH et al., 2009), sendo diretamente relacionada a produção endógena ou oriunda da dieta. DBP também transporta 25(OH)D₃ para os rins, onde a 1 α -hidroxilase converte 25(OH)D₃ em 1,25(OH)₂D₃ (calcitriol), esse sendo o metabólito ativo da vitamina D. Para controlar as concentrações de calcitriol, a 24-hidroxilase hidroxila 25 (OH) D₃ ou 1,25 (OH)₂D₃ em metabólitos menos ativos. A regulação das hidroxilações no fígado e no rim determinado determinam os níveis de 1,25 (OH)₂D₃ (BIKLE, 2009; HOLICK, 2005). (Figura 7).

Figura 7 – Representação esquemática do metabolismo da vitamina D



Fonte: Adaptação de Dankers et al. (2017)

Uma forma alternativa, porém, menos eficaz para indivíduos com baixa exposição solar ou habitantes de países em regiões temperadas é a ingestão exógena de vitamina D, na qual as fontes alimentares contribuem na manutenção de seu status (CARRILHO; FERREIRA, 2009; DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009; CUTOLO et al., 2011).

Além disso, estudos apontam a existência de uma hidroxilação extrarrenal da vitamina D, originando a vitamina que age de maneira autócrina/parácrina com funções de inibição da proliferação celular, promoção da diferenciação celular e imunorregulação (BIKLE, 2009; CARRILHO; FERREIRA, 2009; ANTICO et al., 2012). Esse tipo de hidroxilação é determinada por fatores como citocinas e fatores de crescimento e é diretamente dependente dos níveis de 25(OH)D, para que se produza 1,25(OH)₂D₃.

Assim pode-se sugerir que a deficiência de vitamina D leva a baixos níveis do seu metabolito ativo e ao aumento do risco de doenças ósseas e não ósseas (PATEL et al., 2007; SONG; BAE; LEE, 2012).

3.4.3 Funções

A função clássica da vitamina D é exercida pela absorção de cálcio e de fosfato no intestino. Além disso, a mobilização de cálcio pela reabsorção nos túbulos renais favorece a maturação dos osteoblastos, bem como estimula a sua atividade. Entretanto, vem sendo atribuído à vitamina D, principalmente relacionada a sua deficiência, um papel importante em diversos processos fisiopatológicos como doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças autoimunes e inflamatórias (CARRILHO; FERREIRA, 2009; DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009; ANTICO et al., 2012; SONG; BAE; LEE, 2012).

As ações “não clássicas” da vitamina D podem ser caracterizadas em três efeitos gerais: regulação da secreção do hormônio; regulação da função imunológica e regulação da proliferação e diferenciação celular (BIKLE, 2009; HOLICK, 2004). Essas ações vão depender, da ligação da vitamina com seu receptor nuclear VDR (do inglês vitamin D receptor, receptor específico da vitamina D). Estes receptores são semelhantes aos receptores para esteroides, hormônios tireoidianos e retinóides, os quais regulam a transcrição do DNA em RNA (NORMAN, 2008; BIKLE, 2009; BOUILLON, 2017).

Os VDR são expressos por vários tecidos e tipos celulares, sendo identificados em todas as células do sistema imune, amplamente expressos em monócitos, macrófagos, células dendríticas, células apresentadoras de antígenos, células NK, linfócitos T e B ativados (NORMAN, 2008; DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009; CUTOLO et al., 2011).

A presença dos VDR em células do sistema imunológico, e a sua influência sobre a regulação de fatores neste sistema (CARRILHO; FERREIRA, 2009), corrobora com potente efeito de imunomodulação da vitamina D sobre as células do sistema imune além da produção de citocinas (CARRILHO; FERREIRA, 2009; DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009).

Os efeitos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na resposta imunológica são de inibição da proliferação de linfócitos do tipo Th1 e produção de citocinas pró inflamatórias IL-2 e IFN- γ além de estimular na liberação das citocinas IL-5 e IL-10 com caráter anti-inflamatório, as quais vão promover a polarização de linfócitos a um fenótipo Th2

(MATTNER et al., 2000). Já foi demonstrado que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibe a produção de IL-6, citocina pró-inflamatória que funciona como fator importante para estimulação de Th17, fatores diretamente envolvidos na patogênese da AR (XUE et al., 2002; HAYES et al., 2015).

Na população de linfócitos B a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ suprime a proliferação e produção de imunoglobulinas e retarda a diferenciação de plasmócitos (DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009). As células reguladoras (Treg) são também aumentadas por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A propensão de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em suprimir o sistema imune adaptativo surge como benéfica para condições de autoimunidade (PENNA et al., 2005).

O desenvolvimento células T autorreativas vem sendo relatado em situações de baixas concentrações vitamina D, onde sistema imune caminha para a síntese de interleucinas pró-inflamatórias (IL-12, INF- γ), através de respostas de diferenciação, antiproliferação, indução de efeitos de apoptose ou imunomodulação (DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009; BOUILLON, 2017). Em conjunto essas respostas culminam com a maior predisposição em desenvolver doenças autoimunes, como diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e a AR (CANTORNA; HAYES; DELUCA, 1998; MERLINO et al., 2004; DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009; ROSSINI et al., 2010; BOUILLON, 2017).

3.5 CURCUMINA

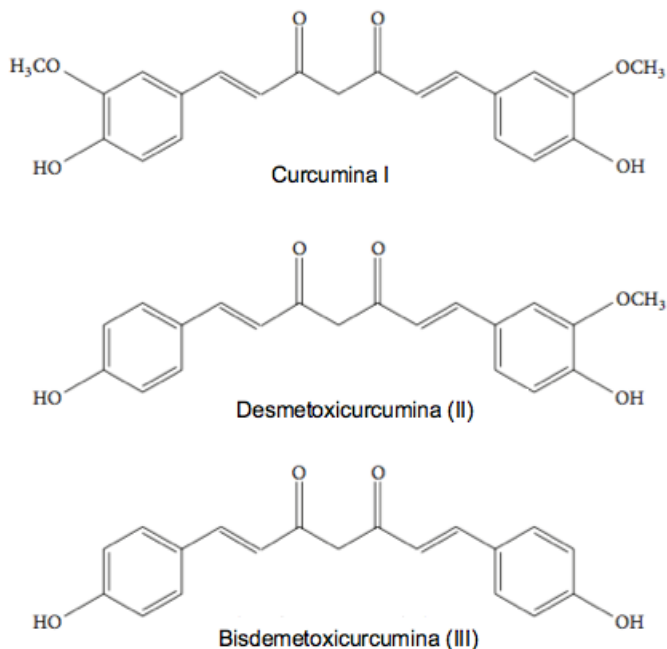
Derivada do açafrão a curcumina, 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-diona representa 75% da quantidade total do extrato da *Curcuma longa* L., que também contém as estruturas desmetoxicurcuminina (curcumina II, 20%) e (III) bisdemetoxicurcumina (curcumina III, 5%) (RAO, 1994) (Figura 8). Por se tratar de uma molécula lipofílica a curcumina rapidamente permeia a membrana celular, podendo exercer efeitos sobre as células.

A curcumina contém uma mistura de antioxidantes fitonutrientes, conhecidos como os curcuminóides, além de uma ampla gama de propriedades farmacológicas já descritas, incluindo as anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumoral e antiartrítica (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; SAHEBKAR, 2015; PANAHI et al., 2016; QADIR; NAQVI; MUHAMMAD, 2016).

Os efeitos biológicos da curcumina são principalmente derivados de sua capacidade de se ligar diretamente a várias proteínas, moléculas reguladoras como

fatores de transcrição e citocinas, causando efeitos sobre as células e a sinalização celular (SHUREIQI; BARON, 2011).

Figura 8 – Curcuminoides presentes do extrato de *Curcuma longa* L.



Fonte- adaptação de Srivastava (2011)

Estudos sugerem que dentre as capacidades imunoreguladoras da curcumina está a sua ligação direta com proteínas como a ciclooxygenase-2 (COX-2), lipoxigenase, GSK3b e outras enzimas reguladoras, ou pela sua capacidade de modular o estado redox intracelular (HONG et al., 2004; BYKOV et al., 2009).

A interação com células imunológicas incluindo linfócitos B e T, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, citocinas e vários fatores de transcrição, destaca sua propriedade imunomoduladora. As ações da curcumina afetam tanto a imunidade inata quanto adaptativa, sobretudo nas condições patológicas (SRIVASTAVA et al., 2011).

Esses fatores de transcrição incluem o fator nuclear kappa B (NF-κB), o qual exerce um papel fundamental na produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina IL-1, IL-2 e IFN-γ em células T diretamente envolvidos em patologias como esclerose múltipla, lúpus e AR (XIE et al., 2009; PANAHI et al., 2016; MOMTAZIBOROJENI et al., 2018).

Os mecanismos de ação empregados a curcumina envolvem vários alvos biológicos, ou seja, fatores de transcrição: NF-AT, AP-1, transdutores de sinal e

ativador da transcrição (STAT), p53, proteínas quinases ativadas por mitógenos, liberação de citocinas e os receptores encontrados em diferentes tipos de células imunes (SOETIKNO et al., 2011).

Dentre os efeitos potenciais empregados a curcumina, o seu uso como novo agente terapêutico no tratamento de doenças autoimunes, como o lúpus e AR vem ganhando destaque (KRIVOSIKOVA et al., 2009). A redução da atividade do NF- κ B pela curcumina resulta na diminuição do estimulador de linfócitos B (BLYS), citocina chave para proliferação de linfócitos B, produção de autoanticorpos e a patogênese e manutenção das doenças autoimunes (HUANG et al., 2011).

A curcumina já está sendo utilizada como um fitoterápico e o uso é considerado seguro; confirmado por diversos ensaios clínicos em humanos onde não demonstrou toxicidade limitada por dose, até a dose atingida de 10g/dia (LAO et al., 2006; AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009).

No entanto, existem certas limitações relativas ao uso de curcumina como droga. A curcumina tem uma biodisponibilidade muito baixa, absorção celular lenta e a rápida metabolização restringem seus efeitos. Assim requer alternativas como repetição de doses orais visando uma concentração significativa no interior das células para efeitos fisiológicos, contudo essa alternativa torna a terapia como difícil adesão. Para abordar estas limitações, uma das soluções é realização do nanoencapsulamento da curcumina que busca estabilizar e viabilizar o seu uso, aumentando sua estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade e que também já vem demonstrando bons resultados na literatura (JAQUES et al., 2013b; ARORA et al., 2015).

3.6 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é o estudo de estruturas extremamente reduzidas, com composições na faixa entre 1 e 100 nanômetros. A técnica definida como nanoencapsular é o tratamento de moléculas ou compostos individuais ou em associação em estruturas para produzir materiais e dispositivos com propriedades especiais, e assim pode ser usada para uma série de aplicações onde os materiais em escala nanométrica podem trazer benefícios (WANG; RUAN; CUI, 2009).

Entre as vantagens que os nanossistemas podem oferecer, destacam-se: a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no

organismo, promovendo manutenção de níveis plasmáticos em concentração constante; o aumento da eficácia terapêutica (bioatividade); a liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontra (variações de pH e/ou temperatura); a diminuição expressiva da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima, devido à utilização de dose reduzida; a diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis; a possibilidade de direcionamento a alvos específicos; a possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas como lipofílicas nos dispositivos; a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e aumento da aceitação da terapia pelo paciente (BOISSEAU; LOUBATON, 2011; DEB et al., 2012; PATEL; MARTIN-GONZALEZ; FERNANDA, 2012).

Na nanotecnologia, as partículas nano são usadas para a entrega específica das substâncias no local alvo. Desse modo, a dose necessária e os efeitos colaterais são reduzidos significativamente quando o agente ativo é depositado apenas na região de propósito. Um medicamento “nano” específico reduz o consumo e a administração das drogas, além da redução do risco de hiperdosagem e as despesas de tratamento, tornando o tratamento mais eficaz tanto para pacientes quanto para a indústria (NIKALJE, 2015).

Usando a ferramenta da nanotecnologia um fármaco com baixa solubilidade será substituído por um sistema de liberação deste fármaco, resultando em melhor solubilidade devido à presença de ambientes hidrofílicos ou hidrofóbicos (BERTRAND; LEROUX, 2012). A liberação controlada da droga pode prevenir o dano tecidual por droga. Assim, a farmacocinética da droga pode ser alterada, melhorando distribuição e evitando uma maior depuração do fármaco no corpo.

Embora as vantagens sejam expressivas, alguns pontos devem ser considerados, como ausência de biocompatibilidade dos materiais utilizados e custo de obtenção dos nanossistemas, quando comparados com as formulações farmacêuticas convencionais. A biodistribuição dessas nanopartículas não é ainda bem conhecida, devido às possíveis reações do organismo aos materiais nanométricos. Devido ao pequeno tamanho, nanopartículas podem ser armazenadas nos tecidos periféricos e, portanto, podem se acumular no corpo ao longo do tempo (MINCHIN, 2008).

De natureza biocompatível e biodegradável os polímeros a base de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) têm sido amplamente estudados em formulações que visam um

controle de liberação de fármacos. Por apresentar boa permeabilidade, inúmeros fármacos conseguem se distribuir de maneira uniforme na matriz polimérica. Além disso, apresenta uma degradação prolongada por ser um polímero semi-cristalino, o que permite a liberação sustentada do fármaco (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; JÄGER et al., 2009).

Inúmeras substâncias, entre as mais variadas atividades terapêuticas, mostram-se capazes de serem associadas a sistemas nanocarreadores. Recentemente, um estudo realizado por Wang et al. (2014) destacou o potencial das nanopartículas na entrega de fármacos de uma forma precisa para as células imunes ativadas, podendo, então, ser aplicada para o tratamento de uma ampla gama de doenças inflamatórias (WANG et al., 2014).

A suplementação/administração da vitamina D e de compostos naturais como a curcumina, vem se demonstrando promissores para o tratamento de diversos tipos de doenças, incluindo câncer, doenças neurodegenerativas e doenças crônicas como a AR (AGGARWAL; SURH; SHISHODIA, 2007; NEVE; CORRADO; CANTATORE, 2014; ARORA et al., 2015; DA SILVEIRA et al., 2016; JIANG et al., 2016).

No entanto, fatores como baixa solubilidade, propensão à fotodegradação, má absorção e alta taxa de metabolismo de primeira passagem da curcumina e a vitamina D se tratar de uma substância lipofílica, instável, sensível a vários fatores ambientais e o risco de hipervitaminose dificultam o uso desses compostos como um agente terapêutico. Assim a aplicação de nanoencapsulação deve ser capaz de constituir um meio adequado para aumentar a estabilidade e preservar as propriedades durante o seu processamento e armazenamento (LUO; TENG; WANG, 2012).

Já foi demonstrado na literatura que nanocapsulas de vitamina D₃ foram capazes de diminuir o processo inflamatório causado por artrite induzida em ratos, devido a modulação de ectoenzimas do sistema purinérgico de linfócitos (DA SILVEIRA et al., 2016). A curcumina nanoencapsulada, por sua vez, vem apresentando resultados em parâmetros oxidativos e inflamatórios relacionados a modelos de AR (ARORA et al., 2015; YANG et al., 2015).

A associação da vitamina D₃ com a curcumina num sistema de nanoencapsulação conduz a expectativa de um efeito sinérgico dessas substâncias sobre AR. O uso da nanotecnologia promete essencialmente à redução e simplificação da posologia dos medicamentos administrados, superação das variáveis

de estabilidade e biodistribuição dos compostos e conseqüente redução dos riscos de reações adversas associadas ao seu uso.

4 MANUSCRITO

Os resultados referentes a essa dissertação apresentam-se sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra estruturado segundo as normas do periódico ao qual será submetido. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, e Referências específicas, encontram-se compondo o próprio manuscrito e representam a íntegra desse estudo.

Manuscrito I: Co-nanoencapsulation of vitamin D₃ and curcumin regulates inflammation and purine metabolism in a model of arthritis

Será submetido a revista Inflammation Research.

Co-nanoencapsulation of vitamin D₃ and curcumin regulates inflammation and purine metabolism in a model of arthritis

Jean L. G. da Silva^{1,2}, Daniela F. Passos^{1,2}, Viviane M. Bernardes^{1,2}, Fernanda Licker Cabral^{1,3}, Paulo Guilherme Schimites^{1,3}, Alessandra Guedes Manzoni^{1,2}, Edilene Gadelha de Oliveira⁴, Cristiane de Bona da Silva³, Ruy Carlos Ruver Beck⁴, Matheus Jantsch¹, Roberto Marinho Maciel⁵, Daniela B. R. Leal^{1,2}

¹Laboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada (LABIBIO), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Departamento de Patologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

*** Corresponding author:**

Daniela Bitencourt Rosa Leal (dbitencourtrosaleal@gmail.com)

Fax: + 55 55 3220 8242; Phone: + 55 55 3220 9581

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 20, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil.

Acknowledgments: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Financial Code 001)

ABSTRACT

Aim: To analyze the effects of the nanoencapsulated association of curcumin and vitamin D₃ on purine metabolism through the activities of purinergic enzymes in neutrophil, lymphocyte and platelet in a model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats.

Methods: The animals were treated with curcumin and vitamin D₃, nanocapsules of VD₃ (15.84 IU / day) and curcumin 4mg/kg separately and in combination, or with curcumin in the free form 25mg/kg with the vehicle or with blank nanocapsules, for 15 days after induction of arthritis by adjuvant and euthanized after this period. Following, the activities of the enzymes E-NTPDase, E-ADA, myeloperoxidase (MPO), reactive oxygen species (ROS) were evaluated. Also, the histology of the liver and kidney and the serum biochemistry were investigated.

Results: In arthritic rats, changes in the activities of purinergic enzymes indicated that inflammation was significantly reverted by co-nanoencapsulated treatments. The reduction of inflammation was confirmed by the reversal of the signs and symptoms of RA, as well as MPO activity, by the formulations. The treatments with nanocapsules reverted histological alterations in the kidney. ROS levels and biochemical parameters did not change with induction or treatment.

Conclusion: Our results suggest that co-nanoencapsulation of vitamin D₃ and curcumin can be used as alternative adjuvant treatments for rheumatoid arthritis as they revert the changes in the purine metabolism and the inflammation associated with arthritis.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an immune-mediated disease characterized by the activation and infiltration of inflammatory cells and proliferation of synovial tissue (1). It can rapidly change from a local reaction to a multisystem inflammation and may lead to an irreparable deterioration of the joints, causing debilitation and increasing the risk of mortality (2).

During the development of RA, interactions occur between local cells and the response of inflammatory cells of both acquired and innate immunities. T and B cells, neutrophils, macrophages and platelets release inflammatory mediators such as cytokines (IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor [TNF- α]), autoantibodies (rheumatoid factor [RF], and anti-citrullinated peptide antibodies [ACPAs] that amplify the damage (3,4). Therefore, the interactions between the immune cells generate an inflammatory process that contributes to the progress and maintenance of the signs and symptoms of the disease (5).

Neutrophils are the most present cells at the inflammatory site of RA. These cells produce reactive oxygen species (ROS) that play an important role in the pathogenesis of the disease (6). In addition, the myeloperoxidase (MPO) enzyme released by neutrophils binds to macrophages and triggers an intramolecular cascade that results in the production and secretion of proinflammatory cytokines, attracting more phagocytes and causing degranulation and consequent damage (7).

In the presence of endothelial damage, immune cells become activated and release ATP (adenosine triphosphate), a damage-associated molecular pattern (DAMP), resulting in proinflammatory signals (8,9). The hydrolysis of the adenine nucleotides ATP and ADP (adenosine diphosphate) by E-NTPDase (EC 3.6.1.5; CD39), AMP by E-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5; CD73), and the deamination of adenosine by E-ADA (ecto-adenosine deaminase; EC 3.5.4.4) act as a regulatory process. They regulate not only the concentration of these metabolites but also their effects on the immune response when in the extracellular environment (10). Adenosine, a metabolite of adenine nucleotide, is a limiting factor for inflammation, including in RA, preventing joint destruction and pain (11,12).

The purinergic system involves the release and hydrolysis of adenine nucleotides and their interaction with purine receptors, which play an important role in several

biological processes and regulate essential factors involved in inflammation (13). The maintenance of RA depends on a continuous inflammatory process in which adenine nucleotides participate as signaling molecules (14). The modulation of such a system may bring benefit to chronic diseases such as RA.

The large number of serious adverse effects and limited efficacy coupled with the chronicity of current therapies for RA (15) has created the need for the development of new, safer and more effective anti-arthritis therapies. In view of the comments above, there is an interest in the use of natural compounds like curcumin and the supplementation of vitamin D₃ as adjunctive therapy to prevent the development or delay manifestations of diseases such as RA (16–18). The use of complementary therapies with natural compounds and substitution of metabolites has shown advantages in terms of safety and tolerability (19,20). In addition, patients with rheumatoid arthritis have good receptivity to complementary therapies (21).

Curcumin, a polyphenol derived from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), is of particular importance for the treatment of diseases and inflammatory disorders, on highlights RA (22–24). Although its anti-inflammatory, antioxidant, antitumoral, and antiarthritic properties have been reported, the mechanisms of action are poorly defined (25,26). Moreover, the *in vivo* use of curcumin is limited by issues regarding absorption, distribution, bioavailability, and metabolism, in addition to its hydrolytic propensity and photochemical photodegradation (27,28).

The use of nanotechnology is a strategy to overcome the physicochemical and biopharmaceutical properties of curcumin (29). Previous studies have pointed out its nanoencapsulation as a suitable approach to increase, curcumin solubility, stability, and bioavailability as well as to prolong its blood circulation time and to reach special tissues, as bones and joints (30). Moreover, the literature shows effective results about the use of nanoencapsulated curcumin in chronic diseases such as cancer, diabetes and in arthritis models (31–33).

Regarding the supplementation of vitamin D₃, low levels of vitamin D₃ are related to a greater susceptibility to autoimmune diseases, among them RA. Also, an association can be drawn between vitamin D intake and reduction of risk for this disease (34,35). Thus, the supplementation to replenish this vitamin becomes relevant in the context of prevention and possible harm reduction (36). Vitamin D₃ nanoencapsulation is also useful for its replacement, since the daily needs of vitamin D are usually low and thus outweigh the risk of hypervitaminosis (37). In addition, the

use of nanotechnology would optimize the non-musculoskeletal benefits of vitamin D₃, delivering this agent directly to inflammatory sites (38).

Therefore, this study was designed to evaluate the *in vivo* effects of the co-encapsulation of vitamin D₃ and curcumin in polymeric nanocapsules on the activities of purinergic ectoenzymes (E-NTPDase and E-ADA). Due to their direct relationship with the purinergic system (39), the role of neutrophil, lymphocyte, and platelet signaling in the pathogenesis of RA was investigated. In addition, histological and biochemical analyses, as well as MPO activity and the formation of ROS in adjuvant-induced arthritis (AIA) were studied to support our novel contribution to the area.

Material and Methods

Animals

Adult female Wistar rats (150–250g), heterogenic and conventional, originated from the UFSM Central Vivarium were used. The animals were maintained under controlled conditions (22±2°C under a 12-h/12-h light/dark cycle) with food and water available *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on the Use of Animal at the Federal University of Santa Maria (8937281117).

Reagents and chemicals

The bovine serum albumin, Coomassie Brilliant Blue G, adenosine and Complete Freund's Adjuvant (CFA) were bought from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The vitamin D₃ formulation used Addera D₃® oral solution (cholecalciferol-vitamin D₃ – 3300IU), Mantecorp Farmasa®. Ficoll-Hypaque (Lymphoprep) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). The vehicle used was cooking corn oil. The curcumin was bought from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals used in the experiment were from analytical grade and highest purity.

Induction and Assessment of Arthritis and Treatment of Rats

Arthritis was induced by a single subcutaneous injection of 50 µL of a CFA suspension (Complete Freud's Adjuvant), which consists of killed and dried *Mycobacterium tuberculosis* (1.0mg/ml), dissolved in liquid paraffin at a concentration of 0.6% or saline (used as a control), administered into the right hind paw.

Tests were made to check the development of the inflammatory process 15

days after de induction. The arthritis score, paw immersion latency (thermal hyperalgesia), and paw thickness (paw edema) were performed as described previously by our study group (37). These tests were performed again 15 days after treatment, to analyze the effect of different treatments on signals of an inflammatory process associated with induced arthritis.

The arthritis score was used to assess the progression of arthritis, in which the signs of inflammation were observed and classified according to a scale (40,41). The paw immersion test evaluated the hypersensitivity to heat stimulation. In this test, the right hind paw of the animals was immersed in a water bath at 48°C and the index of the thermal nociceptive threshold was given by measuring the amount of time from the beginning of the stimulus to the animal's response by withdrawing the paw (42). The onset and development of edema were observed through the right hind paw thickness and was measured using a digital caliper (43).

Production and characterization of the nanocapsules formulations

Lipid-core nanocapsules (NC, NC_{VD3}, NC_{CUR}, NC_{VD3-CUR}) were obtained by interfacial deposition of preformed polymer technique (44,45). The organic phase consisted of poly(ϵ -caprolactone) as a biodegradable polymer, sorbitan monoestearate, as the surfactant, TCM or Vitamin D₃ as oil, all dissolved in acetone. For those formulations containing curcumin, it was added to the organic phase together with all other components. The organic phase was injected into an aqueous phase containing polysorbate 80, as surfactant. Acetone was eliminated and the aqueous phase concentrated by evaporation under reduced pressure to obtain 100 mL. Table 1 shows the composition of the formulations, according to our previous reports (37,46). For the formulations containing CUR its concentration was set to 0.50 mg/mL. All formulations were prepared in triplicates and kept protected from light at room temperature. The volume of Vitamin D added to the formulations NC_{VD3} and NC_{VD3-CUR} corresponded to 528 UI, reaching a final concentration of 52.8 UI/mL in these formulations.

In the first characterization step, the particle size distribution of nanocapsules were evaluated by laser diffraction (Mastersizer[®] 2000, Malvern Instruments, Malvern, UK) to guarantee that the pharmaceutical composition was optimized to ensure the formation of particles exclusively at the nanoscale. Afterwards, the particle size distribution and polydispersity index (PDI) of the formulations were measured by

dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS[®], Malvern Instruments, Malvern, UK) after a previous dilution of the formulations in ultrapure water. Zeta potential was evaluated by electrophoretic mobility (Zetasizer Nano ZS[®], Malvern Instruments, UK). Curcumin concentration and its encapsulation efficiency was evaluated by liquid chromatography, as previously reported (45). The analytical method was validated for these specific formulations, showing good linearity (1 – 20 µg/mL, $r = 0.9998$), precision (RSD of 1.79% and 2.16% for the intra- and inter-day evaluation, respectively) and accuracy (recovery between 97.5 and 99.5%). Specificity was tested in presence of all other components, showing that they do not interfere in the curcumin assay. Limits of quantification and detection were 0.28 and 0.08 µg/mL, respectively.

Treatment

The treatments were initiated fifteen days after induction and lasted for 15 days, following the model of previous studies (37). All the treatments were administered by oral gavage, and the vehicle used was corn oil.

The animals were divided into 14 groups: CN+VEHICLE (control), healthy untreated; CN+ NC healthy treated with blank nanocapsules; CN + NC_{VD3} healthy treated with nanoencapsulated vitamin D₃ ; CN + NC_{CUR}, healthy treated with nanoencapsulated curcumin; CN + VD3-CUR healthy treated with a combination of vitamin D₃ and curcumin in the free form (not nanoencapsulated); CN + CUR, healthy treated with curcumin in the free form; CN + NC_{VD3-CUR}, healthy treated the a nanoencapsulated association of vitamin D₃ and curcumin; AIA+VEHICLE, untreated arthritic animals; AIA + NC, arthritic treated with blank nanocapsules; AIA + NC_{VD3}, arthritic treated with nanoencapsulated vitamin D₃; AIA + NC_{CUR}, arthritic animals treated with nanoencapsulated curcumin; AIA + VD3-CUR, arthritic treated with a combination of vitamin D₃ and curcumin in free form; AIA + CUR, arthritic treated with curcumin in the free form; and AIA + NC_{VD3-CUR}, arthritic treated with an association of vitamin D₃ and curcumin, both in the free form.

The groups NC_{VD3} received a previously prepared suspension (52.8 IU/mL VD3) which is equivalent to a dose of the 15.84 IU/day of the vitamin D₃. The groups CUR, received the formulation of 25mg/kg of curcumin, dissolved in 0.3 mL of corn oil. The NC_{CUR} groups received a formulation with nanocapsules of 4mg/kg of curcumin. The CN + VEHICLE and AIA + VEHICLE groups received corn oil and the NC groups

received blank formulation, only with the components to the formation of nanocapsules.

Aiming to reduce the number of animals used in the experiment, the induction model and the doses, as well as the treatments, were done according a previous study. Based on that, we did not include a group treated with free VD₃, which has shown results similar to the nanoencapsulated VD₃ although with higher doses in a previous study (36).

Experimental procedure

The experimental design is demonstrated in Figure 1. The assessment of arthritis (arthritis score, thermal hyperalgesia, and paw edema) was performed in three different timepoints: D0 (before-induction), D15 (fifteen days after induction), and D30 (fifteen days after treatment).

At the end of the treatments, the animals were anesthetized by inhalation of isoflurane and submitted to euthanasia by exsanguination and blood was collected by cardiac puncture whole blood was used to separate the cells, serum, and plasma.

All the animals were weighted on D7 (seven days after induction), D14 (fourteen days after induction) and D28 (twenty days after induction).

Isolation of lymphocytes and neutrophils from blood

Blood collected in a tube with 7.2 mg dipotassium EDTA (anticoagulant). The whole blood was layered in Ficoll-Histopaque according to Böyum (47). After centrifugation and formation of different density layers, a lymphocyte-rich mononuclear cell layer and a polymorphonuclear cell layer were collected and washed with saline. The protocol was carried out according to the manufacturer's instructions. The samples containing lymphocyte and neutrophil were used immediately for enzymatic assays.

Isolation of platelets from blood

For the isolation of platelets, platelet-rich plasma was separated from blood collected with anticoagulant Sodium Citrate 3.5% according to the method of Pilla et al., 1996 (48).

Evaluation of cell integrity

The integrity of cells was assayed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity in intact and disrupted cells using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer).

Separation of blood serum and plasma

The blood samples were collected in tubes without anticoagulant and gel serum separator, at room temperature were centrifuged at 1400×g min for 15 min. The resultant serum samples were aliquoted in proper microtubes and frozen for further analyses.

Plasma was separated from blood collected with EDTA, followed by centrifugation at 1800 × g for 10 min.

Protein content

The protein quantification was measured by the Coomassie Blue method described of Bradford (49) using serum albumin as a standard.

NTPDase activity determination in neutrophils

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM tris- HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μL as describe by Lunkes et al (50). Twenty microliters of the enzyme preparation (8-12 μg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM, and the time of incubation was 60 min. The enzyme assay was stopped by the addition of 200 μL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by method of Chan et al (51). using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Adenosine deaminase activity determination (E-ADA)

The method previously described by Giusti and Galanti (52) was used to measure E-ADA activity in lymphocytes, neutrophils, and platelets, and ADA in serum, based on the direct quantification of ammonia produced during the deamination of adenosine by ADA.

Twenty-five (25) μL of cells or serum was added to 21 mM/L of adenosine, pH 6.5, and incubated for 90 min at 37 °C. By adding 106.2 mM phenol and 167.8 mM sodium nitroprusside and hypochlorite solution, the reaction was stopped. Seventy-five (75) μM of ammonium sulfate was used as standard. The protein content was adjusted for lymphocytes (0.1-0.2 mg/mL), neutrophils (0.2-0.3 mg/mL) and platelets (0.4-0.6 mg/mL). All samples were run in triplicate and E-ADA activity was expressed in $\mu\text{mNH}_3/\text{min}/\text{mg}$ of protein and serum ADA activity was expressed in U/L. One unit (1U) equals the amount of enzyme needed to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

Myeloperoxidase (MPO) enzyme activity in plasma

MPO activity in plasma was analyzed spectrophotometrically by a modified peroxidase-coupled assay system involving phenol, 4-aminoantipyrine (AAP) and H_2O_2 Metcalf et al. (1986) (53). Briefly, 390 μL of AAP, 2.5 mM of phenol and 20 mM H_2O_2 will be placed in each tube, followed by 450 μL of 1.7 mM H_2O_2 . In the presence of H_2O_2 as the oxidizing agent, the oxidative coupling of phenol and AAP is catalyzed by MPO to give a colored product, quinoneimine, with a maximum absorbance at 500 nm. The results were expressed in micromolar of the quinoneimine produced in 30 min.

Reactive oxygen species (ROS) in plasma

ROS were measured using the 2'-7'-dichlorofluorescein fluorescence assay according to Myhre et al (54). The aliquots of plasma (50 μL) are added to a medium containing Tris-HCl buffer (0.01 mM, pH 7.4) and DCFH-DA 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (1 mM). After the addition of DCFH-DA, the medium is incubated in the dark for 1 h until fluorescence measurement (excitation at 488 nm and emission at 525 nm). Dichloro-oxidized fluorescein is determined using a standard curve of oxidized dichlorofluorescein and the results are expressed as DCFH-DA fluorescence.

Histological analyses

The liver and kidney were dissected for histopathological analysis. All the samples were fixed in 10% buffered formalin and were embedded in paraffin, sectioned, stained with hematoxylin and eosin, and analyzed by a pathologist under optical microscopy (Olympus bx 40) using the program Univision rel.48.

Biochemical parameters

The biochemical analyses of serum samples were performed using a semi-automatic chemistry analyzer (Bioplus, BIO-2000), using commercial kits (Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil), following the manufacturer's recommendations. The biochemical parameters measured were creatinine, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by Graphpad Prism 7.0 software. First, the data were tested for normality of Kolmogorov–Smirnov and then analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA) between groups, followed by the post hoc test of Tukey. The tests of assessment of arthritis were evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's test. The results were exhibited as mean \pm SEM, and a value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Nanocapsules formulations

Curcumin-loaded nanocapsule suspensions and CUR+VD3 nanocapsules had a bright orange color and opalescent aspect, while NC_{VD3} and NC formulations presented a white bluish color (Tyndall effect) and opalescent aspect (data not shown). Their physicochemical characteristics are shown in Table 2. The curcumin content of the formulations NC_{CUR} and NC_{VD3-CUR} was 0.513 ± 0.01 and 0.502 ± 0.03 mg/mL, respectively. Both formulations showed a curcumin encapsulation efficiency of 100%.

Evaluation of arthritis induction and the anti-inflammatory effects of treatments

To confirm the successful induction of inflammatory arthritis by CFA we evaluated three signals of chronic inflammation: arthritis score (Figure 2A), paw thermal latency (Figure 2B) and paw edema (Figure 2C). We also investigated the

possible anti-inflammatory effects of treatments in chronic inflammation.

Fifteen days after the CFA injection, the arthritis score increased significantly (Figure 2A), the paw thermal latency was considerably decreased (indicating the development of thermal hyperalgesia) (Figure 2B), and the paw thickness showed a large increase (paw edema) (Figure 2C) in all the AIA groups, indicating a successful induction of arthritis.

Once chronic inflammation was established, all free-form or nanocapsule treatments were successful in reducing clinical symptoms after 15 days of dosing, however curcumin and vitamin D₃ co-nanoencapsulation treatments achieved the most significant results. The results showed a reduction in the arthritis scores (Figure 1A), thermal hyperalgesia (Figure 2B), and paw edema (Figure 2C). At the same time, treatment with NC_{VD3} only reduced thermal hyperalgesia (Figure 2B) and paw edema (Figure 2C) 32.5 ± 10.6 and 42.9 ± 10.5 , respectively. The injection of CFA did not induce notably behavioral alterations.

Weight gain

The analysis of animal weight gain after arthritis induction is shown in figure 4. All animals with induced arthritis showed an intense and profound reduction in total weight, as demonstrated, only the arthritic animals sustained weight loss after the second week of evaluation. The AIA + VEHICLE animals maintained a reduction in body weight throughout the experiment. In contrast, treatments with VD3-CUR, CUR, NC_{CUR}, NC_{VD3-CUR}, after showing a reduction in the first 7 days after induction, returned to gain weight normally. The groups of non-induced animals did not show changes in weight gain, as did the arthritic animals in the NC group (data not shown).

E- NTPDase activity in neutrophils

The activity of E-NTPDase degrading ATP of neutrophils is shown in Figure 5A. The arthritis-induced group (134.57 ± 10.3 , $P < 0.05$, $n=5$) showed a significant reduction in the catalytic activity in relation to the vehicle control group (CN-VEHICLE) (545.79 ± 67.7). The groups VD3-CUR (560.77 ± 42.44 , $P < 0.05$, $n=5$) and NC_{VD3-CUR} (592.93 ± 32.0 , $P < 0.05$, $n=5$) showed an elevation in ATP degradation in animals with induced arthritis. The AIA NC group (208.30 ± 38.5) had similar results to the AIA vehicle group. The CUR (501.81 ± 122.75), NC_{CUR} (485.28 ± 122.75), and NC_{VD3} (422.8 ± 56.9) groups did not show a significant increase in the activity of this enzyme.

Figure 5B shown the ADP hydrolysis by E-NTPDase. The breakdown of ADP is similar to the ATP hydrolysis seen in the AIA vehicle group (147.55 ± 16.8 , $P < 0.05$, $n=5$) and AIA NC (167.65 ± 25.2 , $P < 0.05$, $n=5$), which exhibited diminished enzymatic activity when compared with the vehicle control group (505.96 ± 21.2). The AIA animals in VD3-CUR group (496.58 ± 46.0 , $P < 0.05$, $n=5$), and NC_{VD3-CUR} groups (582.45 ± 27.5 , $P < 0.01$, $n=5$) demonstrated an increased catalytic activity. The results of AIA NC_{CUR} (465.75 ± 62.3), CUR (467.76 ± 111.3) and NC_{VD3} groups (472.66 ± 48.9) were not significantly different.

E-ADA activity in neutrophils

The degradation of adenosine by E-ADA of neutrophils is shown in Figure 6A. The arthritis-induced group (229.9 ± 19.0 , $P < 0.05$, $n=5$) showed a significant increase in the catalytic activity of E-ADA in relation to the vehicle control group (81.24 ± 18.7). The treatments with NC_{VD3} (77.13 ± 17.74 , $P < 0.05$, $n=5$), VD3-CUR (77.88 ± 17.23 , $P < 0.05$, $n=5$), and NC_{VD3-CUR} ($78,93 \pm 13.76$, $P < 0.05$, $n=5$) significantly reverted the increase of E-ADA activity in animals with induced arthritis. The AIA NC group had results similar to the vehicle group, and the groups CUR (123.22 ± 40.75) and NC_{CUR} (130.78 ± 27.18) did not show a significant decreased activity of this enzyme.

E-ADA activity in lymphocytes

The E-ADA activity in lymphocytes is demonstrated in Figure 6B. The adenosine hydrolysis was significantly lower in the AIA + VEHICLE group (91.8 ± 12.74 , $P < 0.01$, $n=5$) and AIA NC (86.67 ± 21.66 , $P < 0.01$, $n=5$) when compared with control vehicle (257.44 ± 30.82), the NC_{VD3} control ($120,27 \pm 9.60$) and NC_{VD3-CUR} control groups (178.94 ± 29.16) had similar effects in enzymatic activity. After 15 days of treatment, the AIA NC_{VD3} (222.15 ± 22.6 , $P < 0.05$, $n=5$), AIA VD3-CUR (232.50 ± 22.28 , $P < 0.05$, $n=5$), and AIA NC_{VD3-CUR} groups (230.06 ± 25.21 , $P < 0.05$, $n=5$) showed a significantly increased in E-ADA activity. The groups treated with CUR and NC_{CUR} did not show a reversion of E-ADA activity.

E-ADA activity in platelets

Figure 6C shows E-ADA activity in platelets. The degradation of adenosine was significantly higher in AIA (7.28 ± 0.45 , $P < 0.01$, $n=5$) and AIA+NC (6.44 ± 0.76 , $P < 0.05$, $n=5$) than in the CN+VEHICLE group (2.64 ± 0.68). All the control groups demonstrated

similar adenosine deamination. Only VD3-CUR (3.40 ± 0.36 , $P < 0.05$, $n=5$) and NC_{VD3}-CUR (3.30 ± 0.28 , $P < 0.05$, $n=5$) were capable to significantly revert the increase in ADA activity, showing values for similar basal.

ADA activity in serum

The measurement of ADA in serum (figure 6D) showed a significant increase in the activity of ADA in the groups of rats with induced arthritis, AIA +VEHICLE (13.42 ± 0.61) and AIA + NC (13.02 ± 1.2) compared to the CN+VEHICLE group (6.54 ± 0.73). All the treatments were significantly efficient in revert the activity of ADA in serum.

Myeloperoxidase enzyme activity in plasma

The activity of the MPO is shown in figure 7. The AIA vehicle group (3.87 ± 0.24) showed a significant increase compared to the CN+VEHICLE group (2.20 ± 0.46). Regarding all the treatments, the NC_{VD3} (2.59 ± 0.36), NC_{CUR} (2.12 ± 0.17), VD3-CUR (1.63 ± 0.12), CURC (1.83 ± 0.19) and NC_{VD3-CUR} (1.7 ± 0.17) has shown a significant reduction in the increased the MPO activity when compared arthritic non-treated groups.

Reactive oxygen species in plasma

The results of the reactive oxygen species levels in plasma is demonstrated in figure 8. The AIA groups and the control groups treated or untreated, showed no difference in ROS levels.

Histological analyses

No relevant histopathological changes were observed in the hepatic analyzes of the animals, healthy or arthritic, untreated or treated with nanocapsules or with a free formulation. All liver samples were well preserved with a normal hepatic capsule, liver space and liver parenchyma (data not shown). Furthermore, in any of the nanocapsule-treated animal samples, no granulomatous body formation was found.

In relation to the histopathological analyzes of the kidneys (Figure 3), vehicle + AIA animals showed a certain compression of the renal tubules, greater vascularization, and disorganization of the glomeruli in relation to the control animals. Animals that were not induced or those with induced arthritis and treated with

nanocapsules of curcumin and vitamin D₃ or free forms did not present histopathological alterations.

Biochemical parameters

The biochemical parameters, ALT, AST and creatinine tested in the serum of all the groups did not present any difference of values. Data not shown.

Discussion

The development of RA comprises processes of articular infiltrate involving diverse immune cells (neutrophils, macrophages, autoreactive T cells, platelets, and dendritic cells) responsible for the increase in the levels of proinflammatory cytokines, besides presenting synovial hyperplasia, bone erosion, and remodeling of articular cartilage (55). Animal models of arthritis provide us with a controlled environment with precise knowledge on the onset of the disease, which is difficult to diagnose early in humans. Very well-established and widely used models explore the contributions of different cells to the pathogenesis of arthritis and analyze potential therapies (56). We investigated the effects of a new formulation of nanocapsules, associating vitamin D₃ and curcumin, on the inflammatory process of arthritis involving the purine metabolism as well as histological, biochemical and oxidative stress parameters in a murine model of induced arthritis.

The characteristic process that occurs in arthritis can be demonstrated fifteen days post-induction of arthritis with CFA in the animals. On the arthritis score, paw swelling, coloration, and claw position were significantly increased in animals after induction. Also, we saw a reduction in the latency time in arthritic animals, signaling that the animals became more sensitive to pain and thermal hyperalgesia, probably because they were suffering from the presence of an inflammatory state. Together with these analyses, the paw edema indicates the success of induction of arthritis. We determined the establishment of an inflammatory process (swelling, pain, color) and also showed that the reduced function can be reverted by the main treatments.

Our data suggest that the increase in the inflammatory process, an important factor of the RA, leads to incapacity and severe pain, which may have compromised the food intake leading to weight loss in arthritic animals. However, the treatments were successful in reducing these effects and causing the animals to maintain their normal eating regimen and expected weight gain. All treatments demonstrated success in the

clinical view of the disease. However, both associations of curcumin and VD₃, in particular the nanoencapsulated, should be highlighted because of the prominent reductions in the signs and symptoms of the disease with a large dose reduction.

Regarding the effects of induced arthritis, both compounds tested have excellent therapeutic effects on this disease. Curcumin, when administered intravenously in the form of nanocapsules, demonstrated a similar effect to methotrexate (MTX), the most commonly used disease-modifying antirheumatic therapy (14).

Also, curcumin nanocapsules administered by the oral route in animals showed excellent antiarthritic effects in the CFA arthritis model (30). In a previous study, our group has already demonstrated the ability of vitamin D₃ in inhibiting pro-inflammatory effects to reduce signs and symptoms of adjuvant-induced arthritis (37). Thus, the use of bionanotechnology provides us with proven antiarthritic effects with significant dose reduction and safety of both compounds and increased oral bioavailability of the natural (57). In this scenario, to the best of our knowledge, this study is the first report about evaluating the *in vivo* effects of an association of curcumin and vitamin D-loaded nanocapsules in a model of arthritis.

Our hypothesis about the improved effects by their association is supported by our previous reports, showing the ability of nanoencapsulation to reduce by approximately 6.25 fold the concentration of curcumin and 7.60 fold the concentration of vitamin D₃ compared to an association in the free form. Nanocapsules suspensions produced in our study showed suitable properties for the *in vivo* studies. Their particle size distributions were monomodal and their mean particle size were about 200 nm. Regarding the zeta potential measurements, all formulations had a negative zeta potential of about – 10 mV, which can be explained by the presence of the non-ionic surfactant (Polysorbate 80) on the surface of the nanocapsules (43). The presence of the drug or the use of Vitamin D₃ or TCM, as oil, did not interfere in their physicochemical properties, as size, zeta potential, and PDI. Curcumin content was close to the expected concentration, which shows that the production process did not lead to any curcumin loss. Moreover, curcumin showed high encapsulation efficiency in the nanocapsules, regardless of the type of oil (TCM or Vitamin D₃). The high encapsulation efficiency is in agreement with our previous report using grape seed oil instead of TCM or Vitamin D₃ (46).

Studies on the role of neutrophils in RA have grown in recent years. In addition to its inflammatory action through the release of cytotoxic products, the neutrophils of RA patients (58) contribute to the pathogenesis and maintenance of the disease in a more comprehensive way. Some of the mechanisms involved in these processes are the neutrophil extracellular traps (NETs) that can trigger autoantigens (anti-citrullinated protein antibodies) (59), cytokine-dependent change in gene expression that extends the life of neutrophils (60), increased production of reactive species (58), regulation of the function of other inflammatory cells (39), and an exocytotic release of ATP by neutrophil-secreting vesicles as a pro-inflammatory signal molecule of the medium(61).

Considering that neutrophils are fundamental to the onset and advancement of disease in AIA in mouse (62,63), we can describe, for the first time, the activity of E-ADA and E-NTPDase enzymes in neutrophils during the inflammatory response to AIA. Moreover, we evaluated the effects formulations of the nanocapsules of VD3 and curcumin, free and associated, in this background.

The release of ATP by neutrophils results in autocrine purinergic signaling that results in chemotaxis and activation of these cells, causing damage in the sites of inflammation (64). The activity of E-NTPDase regulates the actions of ATP, through its degradation (65,66). An increase in the activity of this enzyme controls ATP levels and consequent reduction in the migration of other neutrophils, as well as competing for the directed actions of ATP on receptors such as P2X7, which is well-described as pro-arthritisogenic. Our data corroborate with this since a reduction in the activity of E-NTPDase, degrading both ATP and ADP in animals with induced arthritis maintained the inflammatory status of the disease.

A possible synergistic anti-inflammatory effect can be described in relation to the association of curcumin and VD₃ in the neutrophil E-NTPDase activity. The increased activity of the this enzyme degrading ATP is related to negative modulation of neutrophil function with regards to vitamin D₃ (67) and decrease in infiltration and activation by curcumin (68,69).

The formation of adenosine by the hydrolysis of extracellular nucleotides acts as a mechanism that counteracts the inflammatory effects of the disease. However, the action of the E-ADA, controls and finalizes the anti-inflammatory actions of the adenosine (70). In general, ADA activity is increased in inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis (71). In our study, animals with induced arthritis had significantly higher adenosine degradation by E-ADA than healthy animals, maintaining the

inflammatory status of the disease. Our treatments with free or nanoencapsulated association were effective in reducing the activity of this enzyme, as well as the treatment with NC-VD3 as well.

Among the proposed synergistic effects, binding of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ to vitamin D receptors (VDRs) in neutrophils causes reduction in the release of IL-1 β (70), a proinflammatory cytokine, and well-described in the pathogenesis of arthritis. IL-1 β , together with the reduced actions of matrix metalloproteinase expression and the induction of apoptosis of synovial fibroblasts (22), may reduce the activation of neutrophils and other subclasses of cells leading to a reduction in the release of ATP (72) and consequent activation of the purinergic cascade until the degradation of adenosine.

The ADA activity was verified in different cellular subtypes, in order to describe an action profile of this enzyme in RA. Unlike in neutrophils, the activity of E-ADA degradation in lymphocytes has been shown to be reduced in animals with arthritis (37). These results are in agreement with the previous studies, where our group found a reduction of the activity of E-ADA in lymphocytes of patients with RA (73) and in an animal model of arthritis (37).

During rheumatoid arthritis, inflammatory stimuli are maintained by pro-inflammatory cytokine concentrations such as TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12 (74). The actions of adenosine on T cells are mainly due to its binding to the A2a receptor (75) with high affinity which would mediate intracellular signals that will redirect a proinflammatory response to an immunosuppressive phenotype, also justified by the production of Tregs-promoting TGF β 1 and IL10 cytokines (76). The kinetic difference observed in this cellular subtype can be explained by the body's attempt to counterbalance the inhibitory effects of E-ADA on adenosine hydrolysis. However, the treatments with both formulations in combination (oral and nanoencapsulated solution) and vitamin D₃ were able to revert the activity of this ectoenzymes to values similar to the healthy population. In fact, vitamin D inhibits T lymphocyte proliferation and alter immunomodulatory responses by promoting a shift in the cellular phenotype from Th1 to Th2 (77,78). Curcumin appears to exert anti-proliferative effects on T cells (79), as well as inhibitory antigen presentation (80). Thus, the combined effects combat inflammatory activation by the less activation and proliferation of T cells. Therefore, the purinergic signaling generated by the consequent release and degradation of ATP is reduced and the body's feedback on the alteration in adenosine metabolism by E-ADA

in lymphocytes does not occur.

Platelets form an important part of the joint and systemic lesion of arthritis (81). Platelets from RA patients are hyperresponsive (82) and bind to other leukocytes, facilitating their activation in addition to adhesion to the endothelium (83), giving impetus to local inflammation. Corroborating that, a profile similar to that found in neutrophils, adenosine deamination on platelets was elevated 15 days after the induction of arthritis. This data is similar to that found in other studies with patients with rheumatoid arthritis (71,84), suggesting a decrease in circulating adenosine levels and consequent worse prognosis (71), strengthening the idea that a set of interactions between these cells may be occurring, by means of the molecules of the purinergic system. Our results showed that both the association (VD3-CUR) and the nanoencapsulated association (NC_{VD3-CUR}) in AIA, decreased E-ADA activities in platelets of rats.

Serum ADA is a nonspecific marker of inflammation (85,86). However, in the context of RA, it is already well-described as a diagnostic marker and disease severity (87,88), contributing to the pathogenesis of arthritis by limiting the anti-inflammatory activities of adenosine (71). As seen in patients, animals with induced arthritis presented elevation in serum ADA levels, however, treatments in both free and nanoencapsulated forms were able to decrease the activity of this enzyme when compared to the control groups, indicating that this marker was affected by the treatments. The generation of adenosine by the ectonucleotidases and the control of the ADA activity will act as a mechanism to spare this nucleoside, favoring the control of the inflammatory state related to arthritis can be suggested. It is worth mentioning that the treatments in association showed a greater decrease in ADA activity, being again indicative of a possible synergistic effect in the modulation of the purinergic system during the inflammatory process.

Since the initial inflammatory event, the activation and invasion of inflammatory immune cells (granulocytes, lymphocytes, platelets) in the joints the purinergic system has participation. The results of the present study corroborate with this assertion and prove that this system participates in the pathogenesis of arthritis and can be modulated by treatments which are known to provide an improvement in active RA, such as methotrexate effects (14).

The increase in MPO observed in animals with induced arthritis is also seen in people with rheumatoid arthritis and indicates activation of neutrophils which play an

important role in the innate immune activation and may also take part in the pathogenesis and severity of the disease (89,90). However, the high significance in the decrease in MPO generation by treatments with curcumin and vitamin D₃ in nanocapsules indicate an important inhibitory effect of this inflammatory pathway (7).

Our results demonstrated that there was no increase in the production of ROS in serum following the induction of arthritis. Also, ROS levels remained unchanged with the treatments, confirming the independence of the formation of ROS with disease or MPO levels. Although MPO catalyzes reactions responsible for the formation of oxidative stress, it may not be responsible for raising ROS levels at the serological level, but locally in the affected tissue. Stamp et al (2012) demonstrated that plasma MPO contributes to oxidative stress and disease activity in the synovial fluid of RA patients (89).

The administration of the nanocapsules to the Wistar rats did not demonstrate apparent histological alterations in the main metabolic organs, the hepatic and renal structures. These data confirm that the dose used in our study is safe, even when compared to a toxicity study performed by Bulcão et al (2012) who administered intraperitoneal nanocapsules (91).

The changes at the renal level may indicate possible development of membranous nephropathy, glomerulitis, vasculitis or secondary amyloidosis. However, renal involvement in arthritis is rare and there are few histopathological patterns for comparison (92,93).

The association of vitamin D₃ and curcumin modulated the purinergic system enzymes in the immune cells involved in the onset and maintenance of RA. This effect was particularly seen in neutrophils as confirmed by reduction of MPO activity, a marker of inflammation and neutrophil activation. It is also important emphasize that the treatments did not show any signs of toxicity in the biochemical parameters and histological morphology in the organs responsible for their metabolism.

In summary, the results of this study indicate that RA treatment with the combination of nanoencapsulated curcumin and vitamin D₃ significantly improved the symptoms, positively modulated the purinergic enzymes and reduced inflammatory processes without causing detectable damage in biochemical and histological parameters. These effects can be attributed to association effects, the ability of vitamin D₃ to modulate the immune system, by the control of cellular activation control, the production of immunoglobulins by B cells and the production of cytokines (36). The

anti-inflammatory and antioxidant action potential exhibited by curcumin is mainly justified by its action on various molecular targets involved in inflammation of arthritis, including blocking the expression of cytokines like IL-1b, IL-6, IL-8, TNF- α , and diminishing activity of nuclear factor -B (NF- κ B) (94).

It is also worth mentioning that the co-nanoencapsulation process provided us with the possibility of associating vitamin D₃ and curcumin, allowing for a significant reduction in the doses of these compounds with the same or even significantly better results. The nanoencapsulation process has been shown to be effective in overcoming the instability barriers presented by the compounds, as indicated by the of their *in vivo* effects as well as their stability in analytical tests.

In addition to dose reduction and safety, the development of an adjuvant therapy to rheumatoid arthritis with curcumin and vitamin D₃ nanocapsules may also increase adherence to treatment as it could be administered only once daily.

Conclusion

This is the first work to demonstrate and evaluate the free and nanoencapsulated association of curcumin with vitamin D₃ in an arthritis model. This research confirms and reinforces previous studies with vitamin D₃ or curcumin isolated treatments, indicating that the nanoencapsulated association is a good alternative to be explored as an adjuvant in the treatment of this disease.

Our study presents a new adjuvant alternative for the treatment of rheumatoid arthritis. Nanocapsules containing the co-encapsulation of Vitamin D₃ and curcumin were produced and reported for the first time. In general, the association of vitamin D₃ with curcumin had positive effects against the inflammation presented by the disease model. Although the combination of treatments had shown promising effects on arthritis therapy, further studies exploring the causal mechanisms of compound responses should be developed.

References

1. Scott DL, Wolfe F. Huizinga TW. Rheum arthritis Lancet. 2010;376:1094–108.
2. Praveen DK, Suchita M. Herbal sources of anti-arthritic potential: A comprehensive review. Int J Pharm Biomed Res. 2013;88–92.
3. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of

- seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol*. 2017 Dec;17(1):60.
4. LaBranche TP, Jesson MI, Radi ZA, Storer CE, Guzova JA, Bonar SL, et al. JAK inhibition with tofacitinib suppresses arthritic joint structural damage through decreased RANKL production. *Arthritis Rheum*. 2012;64(11):3531–42.
 5. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023–38.
 6. Fernandes RMSN, Silva NP da, Sato EI. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2012;32(6):1605–9.
 7. Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Macrophage–neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunol Cell Biol*. 2001;79(5):502–6.
 8. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining How “High-Grade” Systemic Inflammation Accelerates Vascular Risk in Rheumatoid Arthritis. *Circulation*. 2003 Dec;108(24):2957 LP-2963.
 9. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2006 Oct;81(1):1–5.
 10. Burnstock G, Boeynaems J. Purinergic signalling and immune cells. 2014;529–64.
 11. Padovan M, Vincenzi F, Govoni M, Bortoluzzi A, Borea PA, Varani K. Adenosine and adenosine receptors in rheumatoid arthritis. *Int J Clin Rheumatol*. 2013;8(1):13.
 12. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2008;1783(5):673–94.
 13. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, et al. Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 2001;97(3):587–600.
 14. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate Mechanism in Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Jt Bone Spine*. 2018;
 15. Lampropoulos CE, Orfanos P, Bournia VK, Karatsourakis T, Mavragani C, Pikazis D, et al. Adverse events and infections in patients with rheumatoid arthritis treated with conventional drugs or biologic agents: a real world study. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(2):216–24.
 16. Amalraj A, Varma K, Jacob J, Divya C, Kunnumakkara AB, Stohs SJ, et al. A Novel Highly Bioavailable Curcumin Formulation Improves Symptoms and Diagnostic Indicators in Rheumatoid Arthritis Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Two-Dose, Three-Arm, and Parallel-Group Study. *J Med Food*. 2017;20(10):1022–30.
 17. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Immunomodulatory effects of vitamin D in peripheral blood monocyte-derived macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med*. 2014;14(3):275–83.
 18. Song GG, Bae S-C, Lee YH. Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2012;31(12):1733–9.
 19. Wang J, Wei T, Gao J, He H, Chang X, Yan T. Effects of Naringenin on inflammation in complete Freund’s adjuvant-induced arthritis by regulating Bax/Bcl-2 balance. *Inflammation*. 2015;38(1):245–51.
 20. Kerr GS, Sabahi I, Richards JS, Caplan L, Cannon GW, Reimold A, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency/deficiency in rheumatoid arthritis and associations with disease severity and activity. *J Rheumatol*. 2011;38(1):53–9.
 21. Rao JK, Mihaliak K, Kroenke K, Bradley J, Tierney WM, Weinberger M. Use of

- complementary therapies for arthritis among patients of rheumatologists. *Ann Intern Med.* 1999;131(6):409–16.
22. Park C, Moon D-O, Choi I-W, Choi BT, Nam T-J, Rhu C-H, et al. Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E2 production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med.* 2007;20(3):365–72.
 23. Weisberg SP, Leibel R, Tortoriello D V. Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes. *Endocrinology.* 2008;149(7):3549–58.
 24. Xie L, Li X-K, Funeshima-Fuji N, Kimura H, Matsumoto Y, Isaka Y, et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by curcumin treatment through inhibition of IL-17 production. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(5):575–81.
 25. Panahi Y, Alishiri GH, Parvin S, Sahebkar A. Mitigation of systemic oxidative stress by curcuminoids in osteoarthritis: results of a randomized controlled trial. *J Diet Suppl.* 2016;13(2):209–20.
 26. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(1):40–59.
 27. Liu W, Chen XD, Cheng Z, Selomulya C. On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. *J Food Eng.* 2016;169:189–95.
 28. Wikene KO, Bruzell E, Tønnesen HH. Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. *Eur J Pharm Sci.* 2015;80:26–32.
 29. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials.* 2014;35(10):3365–83.
 30. Zheng Z, Sun Y, Liu Z, Zhang M, Li C, Cai H. The effect of curcumin and its nanoformulation on adjuvant-induced arthritis in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:4931.
 31. M Yallapu M, Jaggi M, C Chauhan S. Curcumin nanomedicine: a road to cancer therapeutics. *Curr Pharm Des.* 2013;19(11):1994–2010.
 32. Joshi RP, Negi G, Kumar A, Pawar YB, Munjal B, Bansal AK, et al. SNEDDS curcumin formulation leads to enhanced protection from pain and functional deficits associated with diabetic neuropathy: an insight into its mechanism for neuroprotection. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2013;9(6):776–85.
 33. Arora R, Kuhad A, Kaur IP, Chopra K. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats. *Eur J Pain.* 2015;19(7):940–52.
 34. Wimalawansa SJ. Non-musculoskeletal benefits of vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;175:60–81.
 35. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheumatol.* 2004;50(1):72–7.
 36. Bragazzi NL, Watad A, Neumann SG, Simon M, Brown SB, Abu Much A, et al. Vitamin D and rheumatoid arthritis: an ongoing mystery. *Curr Opin Rheumatol.* 2017;29(4):378–88.

37. da Silveira KL, da Silveira LL, Thorstenberg MLP, Cabral FL, Castilhos LG, Rezer JFP, et al. Free and nanoencapsulated vitamin D3: effects on E-NTPDase and E-ADA activities in an animal model with induced arthritis. *Cell Biochem Funct.* 2016;34(4):262–73.
38. Dolati S, Sadreddini S, Rostamzadeh D, Ahmadi M, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment. *Biomed Pharmacother.* 2016;80:30–41.
39. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2011;11(8):519–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3024>
40. Simjee SU, Jawed H, Quadri J, Saeed SA. Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R91.
41. Gemeinhardt I, Puls D, Gemeinhardt O, Taupitz M, Wagner S, Schnorr B, et al. Near-infrared fluorescence imaging of experimentally collagen-induced arthritis in rats using the nonspecific dye tetrasulfocyanine in comparison with gadolinium-based contrast-enhanced magnetic resonance imaging, histology, and clinical score. *J Biomed Opt.* 2012;17(10):106008.
42. Dalmolin GD, Silva CR, Bellé NA V, Rubin MA, Mello CF, Calixto JB, et al. Bradykinin into amygdala induces thermal hyperalgesia in rats. *Neuropeptides.* 2007;41(4):263–70.
43. Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie A-M, Epstein CJ, Basbaum AI. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature.* 1998;392(6674):390.
44. Venturini CG, Jäger E, Oliveira CP, Bernardi A, Battastini AMO, Guterres SS, et al. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2011;375(1–3):200–8.
45. Jäger E, Venturini CG, Poletto FS, Colomé LM, Pohlmann JPU, Bernardi A, et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J Biomed Nanotechnol.* 2009;5(1):130–40.
46. Jaques JA dos S, Doleski PH, Castilhos LG., da Rosa MM, Souza V do CG, Carvalho FB, et al. Free and nanoencapsulated curcumin prevents cigarette smoke-induced cognitive impairment and redox imbalance. *Neurobiol Learn Mem.* 2013;100:98–107.
47. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:77–89. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77–89.
48. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJF, et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* [Internet]. 1996 Jan 1;7(4):225–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/09537109609023582>
49. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976;72(1):248–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>
50. Lunkes GIL, Lunkes DS, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch ALB, Miron R, et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced

- diabetes. 2004;65:1–6.
51. K M Chan, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* [Internet]. 1986;157(2):375–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269786906408>
 52. Guisti G, Galanti B. Colorimetric Method. In: *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim; 1984. p. 315–23.
 53. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM & RR. *Laboratory manual of neutrophil function*. Vol. 2, Raven. 1986.
 54. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(10):1575–82.
 55. Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *JCR J Clin Rheumatol*. 2005;11(3):S39–44.
 56. Wooley PH. Animal models of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1991;3(3):407–20.
 57. Gu W, Wu C, Chen J, Xiao Y. Nanotechnology in the targeted drug delivery for bone diseases and bone regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2305.
 58. Eggleton P, Wang L, Penhallow J, Crawford N, Brown KA. Differences in oxidative response of subpopulations of neutrophils from healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1995;54(11):916.
 59. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017;23(3):279.
 60. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(10):593.
 61. Wang X, Chen D. Purinergic regulation of neutrophil function. *Front Immunol*. 2018;9:399.
 62. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2001;167(3):1601–8.
 63. Tanaka D, Kagari T, Doi H, Shimoizato T. Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. *Immunology*. 2006;119(2):195–202.
 64. Chen Y, Yao Y, Sumi Y, Li A, To UK, Elkhali A, et al. Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Sci Signal*. 2010;3(125):ra45.
 65. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, et al. ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. *Science* (80-) [Internet]. 2006 Dec 15;314(5806):1792 LP-1795. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/314/5806/1792.abstract>
 66. Corriden R, Chen Y, Inoue Y, Beldi G, Robson SC, Insel PA, et al. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine. *J Biol Chem*. 2008;283(42):28480–6.
 67. Takahashi K, Nakayama Y, Horiuchi H, Ohta T, Komoriya K, Ohmori H, et al. Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2002;24(3):335–47.
 68. Srivastava R. Inhibition of neutrophil response by curcumin. *Agents Actions*. 1989;28(3–4):298–303.
 69. Jancinová V, Perecko T, Nosal R, Kostálová D, Bauerová K, Drábiková K.

- Decreased activity of neutrophils in the presence of diferuloylmethane (curcumin) involves protein kinase C inhibition. *Eur J Pharmacol.* 2009;612(1–3):161–6.
70. Rani HS, Madhavi G, Srikanth BM V, Jharna P, Rao URK, Jyothy A. Serum ADA and C-reactive protein in rheumatoid arthritis. *Int J Hum Genet.* 2006;6(3):195–8.
 71. Yuji N, Masahiro K, Takashi N, Saori H, Ryuichi S, Masahiro K, et al. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2003 Feb;48(3):668–74.
 72. Al-Shukaili A, Al-Kaabi J, Hassan B. A Comparative Study of Interleukin-1 β Production and P2x7 Expression After Atp Stimulation by Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated From Rheumatoid Arthritis Patients and Normal Healthy Controls. *Inflammation.* 2008;31(2):84–90.
 73. Jaques JA dos S, Becker LV, Souza V do CG, Leal CAM, Bertoldo TMD, Vargas Pinheiro K, et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct.* 2013;31(5):395–9.
 74. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):429–42.
 75. Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood.* 1997;90(4):1600–10.
 76. Ohta A, Sitkovsky M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol.* 2014;5(JUL):1–9.
 77. Jeffery LE, Raza K, Hewison M. Vitamin D in rheumatoid arthritis—towards clinical application. *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Oct;12:201.
 78. Bouillon R. Extra-Skeletal Effects of Vitamin D. In: *Frontiers of Hormone Research.* 2017. p. 72–88.
 79. Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Piwocka K, Janusz S, Radziszewska E. Inhibition of proliferation and apoptosis of human and rat T lymphocytes by curcumin, a curry pigment. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(8):899–907.
 80. Shirley SA, Montpetit AJ, Lockey RF, Mohapatra SS. Curcumin prevents human dendritic cell response to immune stimulants. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374(3):431–6.
 81. Harifi G, Sibilija J. Pathogenic role of platelets in rheumatoid arthritis and systemic autoimmune diseases: Perspectives and therapeutic aspects. *Saudi Med J.* 2016;37(4):354.
 82. Mac Mullan PA, Peace AJ, Madigan AM, Tedesco AF, Kenny D, McCarthy GM. Platelet hyper-reactivity in active inflammatory arthritis is unique to the adenosine diphosphate pathway: a novel finding and potential therapeutic target. *Rheumatology.* 2010 Feb;49(2):240–5.
 83. Ehlers R, Ustinov V, Chen Z, Zhang X, Rao R, Luscinskas FW, et al. Targeting Platelet–Leukocyte Interactions: Identification of the Integrin Mac-1 Binding Site for the Platelet Counter Receptor Glycoprotein Iba α . *J Exp Med.* 2003;198(7):1077–88.
 84. Becker L V., Rosa CS, Souza V do CG, Bagatini MD, Casali EA, Leal CAM, et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 2010;43(13–14):1096–100.
 85. Ungerer JP, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Vermaak WJ. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clin Chem.*

- 1992;38(7):1322–6.
86. Sands BE. Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1275–85.
 87. Erer B, Yilmaz G, Yilmaz FM, Koklu S. Assessment of adenosine deaminase levels in rheumatoid arthritis patients receiving anti-TNF- α therapy. *Rheumatol Int*. 2009;29(6):651–4.
 88. Demir G, Borman P, Ayhan F, Özgün T, Kaygısız F, Yilmez G. Serum Adenosine Deaminase Level is High But Not Related with Disease Activity Parameters in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Open Rheumatol J* [Internet]. 2014;8(1):24–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4166793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 89. Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, et al. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2012;51(10):1796–803.
 90. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018;640(November 2017):47–52.
 91. Bulcão RP, Freitas FA, Venturini CG, Dallegrove E, Durgante J, Göethel G, et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly (ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. *Toxicol Sci*. 2012;132(1):162–76.
 92. Husby G. Amyloidosis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 1985;3(2):173–80.
 93. Helin HJ, Korpela MM, Mustonen JT, Pasternack AI. Renal biopsy findings and clinicopathologic correlations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum Off J Am Coll Rheumatol*. 1995;38(2):242–7.
 94. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev*. 2009;14(2).

TABLES

Table 1

Pharmaceutical composition of organic and aqueous phases of the following formulations: NC, NC_{VD3}, NC_{CUR} and NC_{VD3-CUR}.

Component	NC	NC _{VD3}	NC _{CUR}	NC _{VD3-CUR}
Poly(ϵ -caprolactone)	1.00 g	1.00	1.00	1.00
Sorbitan monoestearate	0.38 g	0.38 g	0.38 g	0.38 g
TCM	1.65 mL		1.65 mL	
Vitamin D3*		1.65 mL		1.65 mL
Curcumin			0.05 g	0.05 g
Acetone	267 mL	267 mL	267 mL	267 mL
Polysorbate 80	0.77 g	0.77 g	0.77 g	0.77 g
Water	534 mL	534 mL	534 mL	534 mL

* Addera D₃[®] oral solution, which consists of vitamin D₃ dissolved in a caprylic and capric triglycerides mixture (TCM) (3,300 UI/mL).

NC: Blank nanocapsules; NC_{VD3}: vitamin D₃ lipid-core nanocapsules; NC_{CUR} curcumin lipid-core nanocapsules; NC_{VD3-CUR} vitamin D₃ and curcumin lipid-core nanocapsules.

Table 2Physicochemical characteristics of formulations NC, NC_{VD3}, NC_{CUR} and NC_{VD3-CUR}.

Formulations	NC	NC_{VD3}	NC_{CUR}	NC_{VD3-CUR}
Parameters				
Zeta potential (mV)	-11.3	-12.4	-10.1	-11.0
Particle size (nm)	222	234	227	214
PDI	0.169	0.130	0.144	0.118
D[4,3]	0.512	0.507	0.503	0.491
Dv (90)	0.672	0.604	0,660	0.646
Span	0.606	0.666	0.602	0.601
Curcumin content (mg/mL)	-	-	0.513	0.502
Curcumin EE (%)	-	-	100	100

NC: Blank nanocapsules; NC_{VD3}: vitamin D₃ lipid-core nanocapsules; NC_{CUR} curcumin lipod-core nanocapsules; NC_{VD3-CUR} vitamin D₃ and curcumin lipid-core nanocapsules; PDI: Polydispersity index; D[4,3]: Diameter volume medium; Dv(90): 90% below the volumetric diameter; Curcumin EE: encapsulation efficiency of curcumin

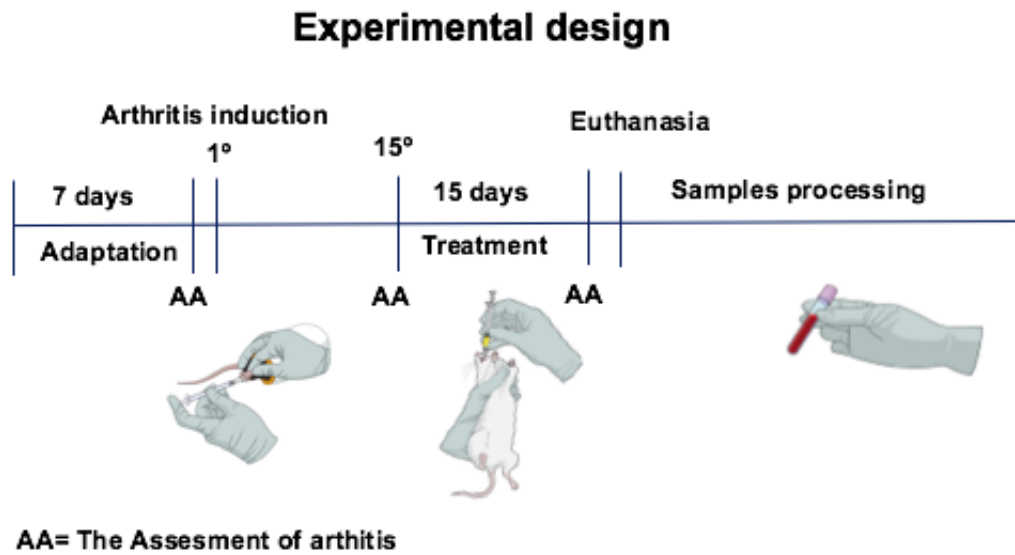
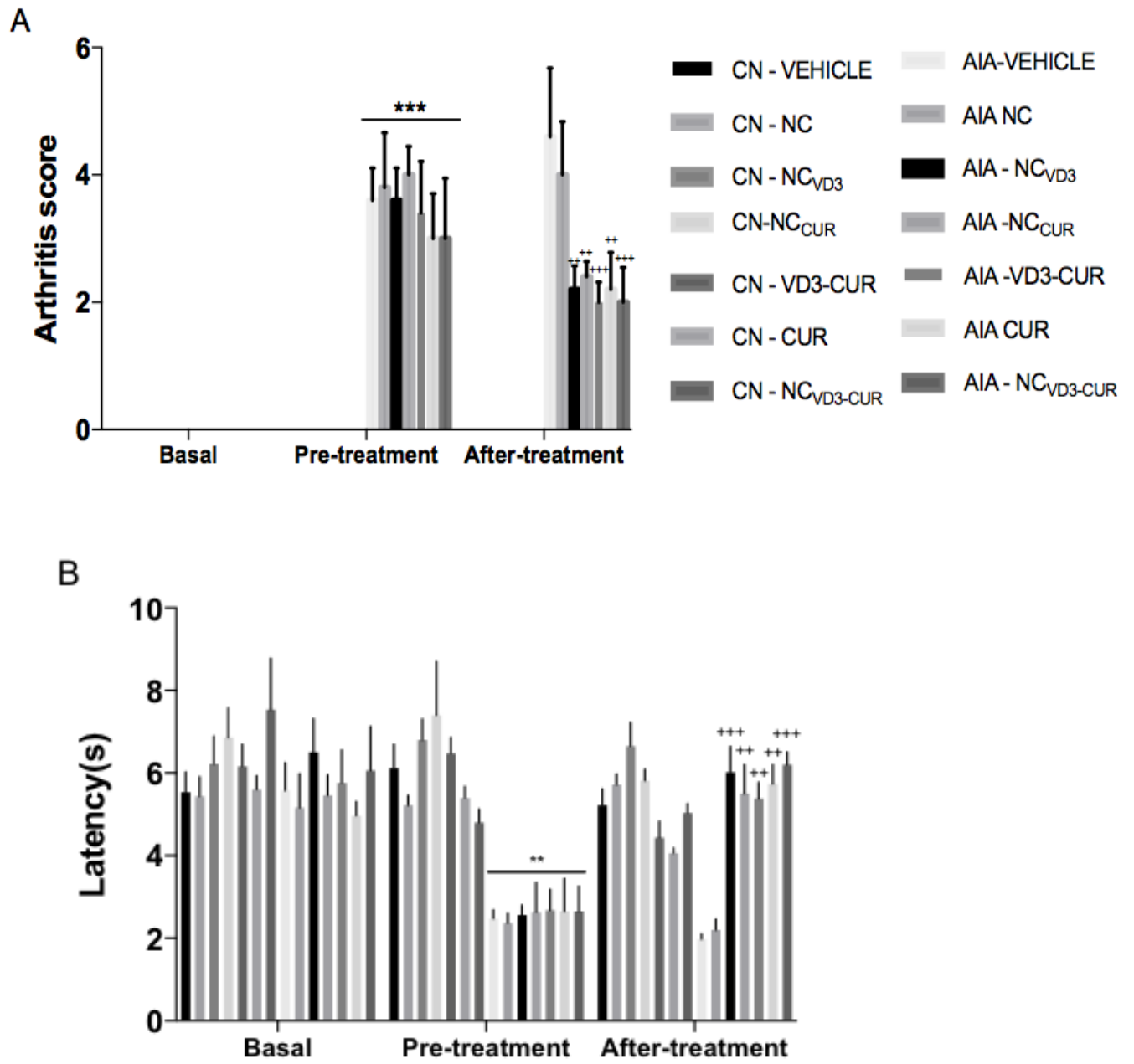
FIGURES CAPTIONS**Figure 1** Experimental procedure.

Figure 2.



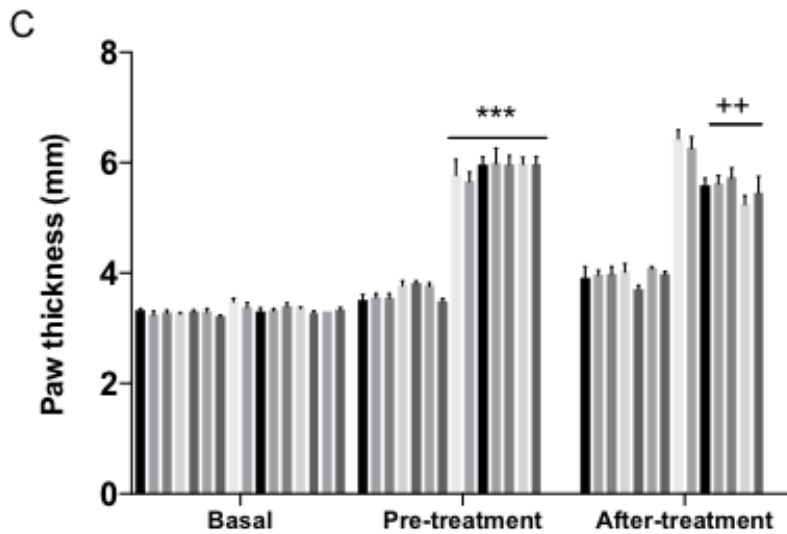


Figure 2. Effect of the treatments (oral solution and nanoencapsulated) on clinical inflammatory changes induced by intraplantar CFA. The evaluation on the arthritis score increase (A), thermal hyperalgesia (B) and edema formation (C) were performed in rats induced by arthritis (AIA) and control rats treated for 15 days with corn oil (VEHICLE), blank nanocapsules (NC), vitamin D₃ nanocapsules (NC-VD₃), curcumin nanocapsules (NC-CUR), association of vitamin D₃ and curcumin in free form (VD3-CUR), curcumin (CUR) and association of vitamin D₃ and curcumin in nanocapsules (NC-VD₃-CUR). The results were analyzed using two-way ANOVA followed by post hoc of Bonferroni. The results were expressed as the mean \pm SEM. * indicates that the value is significantly different from the control group. + indicates that the value is significantly different from the AIA vehicle group. *($P < 0.05$, $n = 5$), **($P < 0.01$, $n = 5$), ***($P < 0.001$, $n = 5$) + ($P < 0.05$, $n = 5$), ++ ($P < 0.01$, $n = 5$), +++ ($P < 0.001$, $n = 5$).

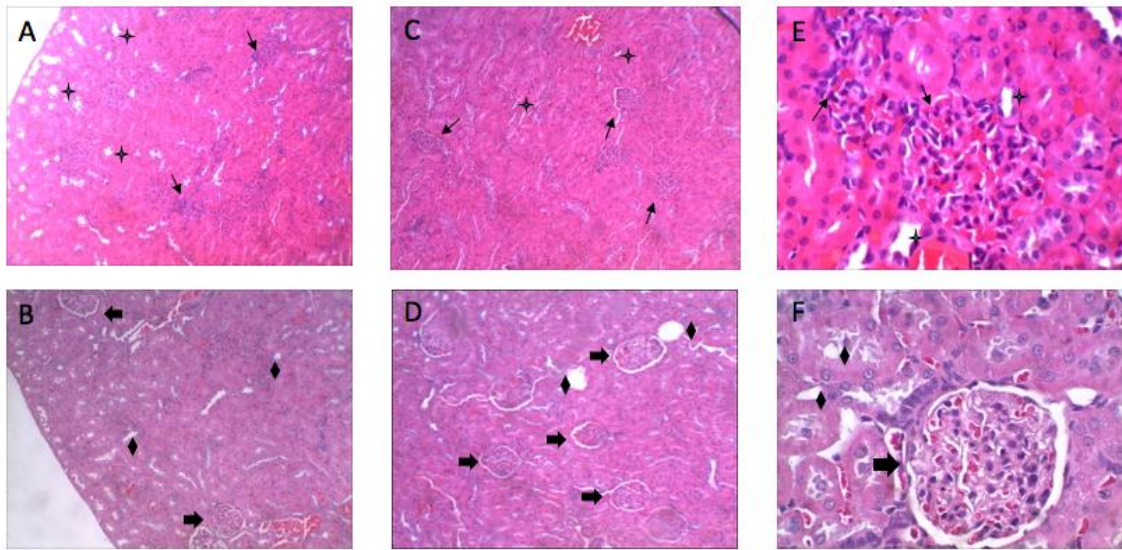
Figure 3

Figure 3 Histological photomicrographs using hematoxylin and eosin staining of the kidney (A, B, C and D 100x) and (E and F 400x)(n=5); black arrows indicate disorganized glomerulus; stars indicate compaction of the renal tubules; arrow thick indicates glomerulus well defined and rhombus indicates normal-sized renal tubules. A- AIA vehicle group; B- AIA+ NC_{VD3}; C- AIA+ NC, D- AIA +NC_{CUR}, E- AIA vehicle group and F- AIA+ NC_{VD3-CUR}.

Figure 4

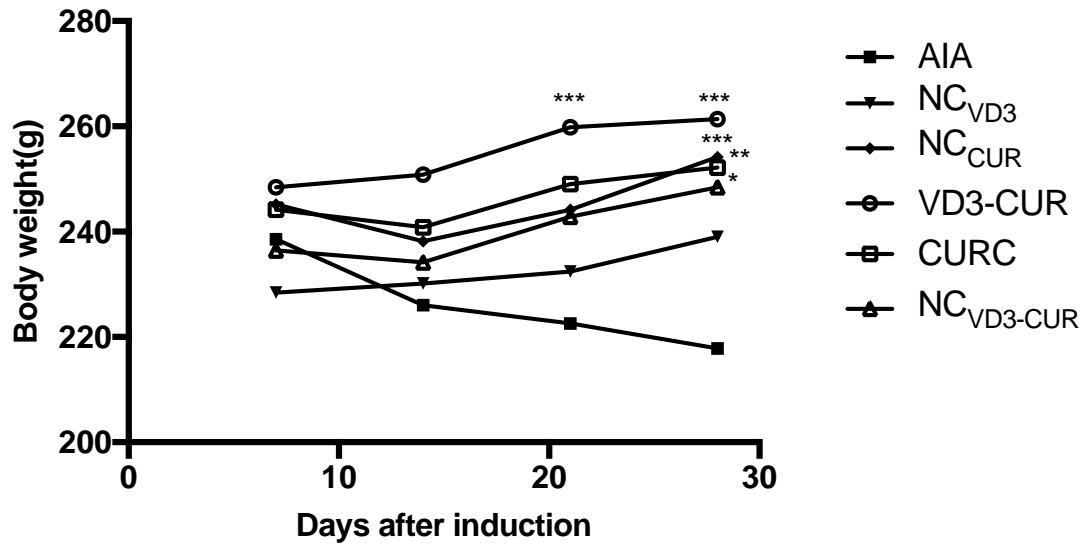


Figure 4 Effect of the treatments (oral solution and nanoencapsulated) on body weight of AIA rats (except NC group). Changes of body weight in arthritis-induced rats (AIA) treated for 15 days vitamin D₃ nanocapsules (NC_{VD3}), curcumin nanocapsules (NC_{CUR}), the association of vitamin D₃ and curcumin in free form (VD3-CUR), curcumin (CURC) and association of vitamin D₃ and curcumin in nanocapsules (NC_{VD3-CUR}). The results were expressed as the mean \pm SEM. * indicates that the value is significantly different from the AIA group *($P < 0.05$, $n = 5$), **($P < 0.01$, $n = 5$), ***($P < 0.001$, $n = 5$).

Figure 5

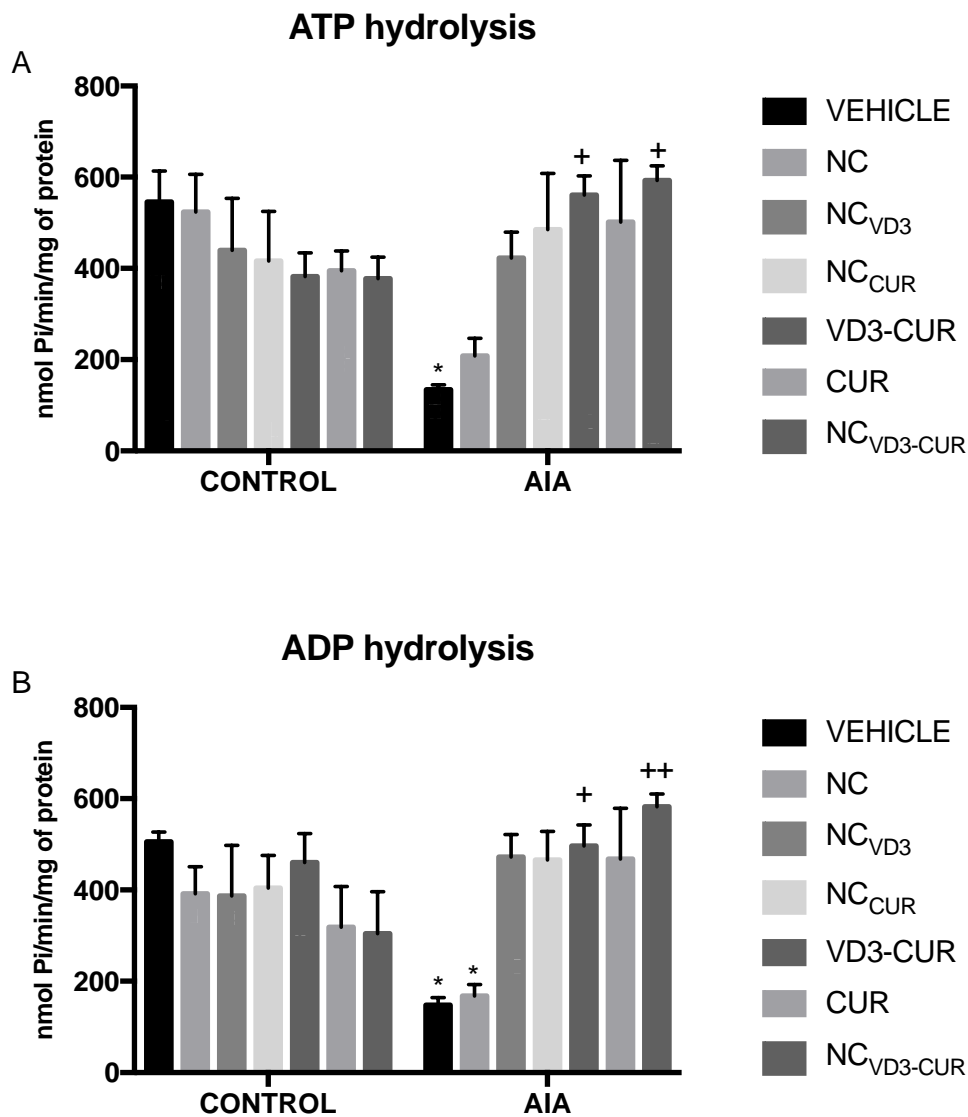


Figure 5 E-NTPDase activity in ATP and ADP hydrolysis in neutrophils of arthritis-induced rats (AIA) and control rats treated for 15 days with corn oil (VEHICLE), blank nanocapsules (NC), vitamin D₃ nanocapsules (NC_{VD3}), curcumin nanocapsules (NC_{CUR}), association of vitamin D₃ and curcumin in free form (VD3-CUR), curcumin (CUR) and association of vitamin D₃ and curcumin in nanocapsules (NC_{VD3-CUR}). Enzyme activities are reported as nmol Pi/min/mg of protein. The results were analyzed using two-way ANOVA followed by post hoc of Tukey. The results were expressed as the mean \pm SEM. * indicates that the value is significantly different from the control group. + indicates that the value is significantly different from the AIA vehicle group.

* ($P < 0.05$, $n = 5$), + ($P < 0.05$, $n = 5$), ++ ($P < 0.01$, $n = 5$).

Figure 6

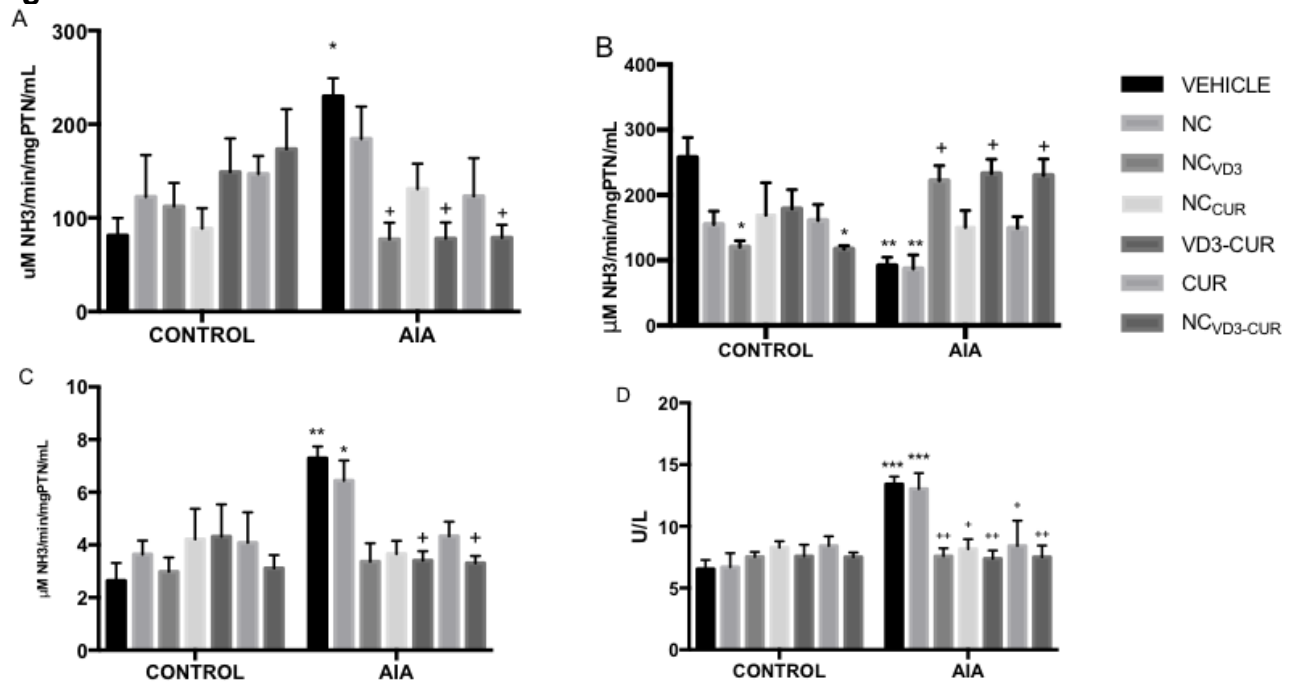


Figure 6 Adenosine deamination in neutrophils(A), lymphocytes(B), platelets(C) and serum (D) of arthritis-induced rats (AIA) and control rats treated for 15 days with corn oil (VEHICLE), blank nanocapsules (NC), vitamin D₃ nanocapsules (NC_{VD3}), curcumin nanocapsules (NC_{CUR}), association of vitamin D₃ and curcumin in free form (ASS), curcumin (CUR) and association of vitamin D₃ and curcumin in nanocapsules (NC_{VD3-CUR}). Enzymatic activities are reported as μmNH₃/min/mg of protein in cells and U/L in serum. The results were analyzed using two-way ANOVA followed by post hoc of Tukey. The results were expressed as the mean ± SEM. * indicates that the value is significantly different from the control group. + indicates that the value is significantly different from the AIA vehicle group.

*($P < 0.05$, $n = 5$), **($P < 0.01$, $n = 5$), ***($P < 0.001$, $n = 5$) + ($P < 0.05$, $n = 5$), ** ($P < 0.01$, $n = 5$).

Figure 7

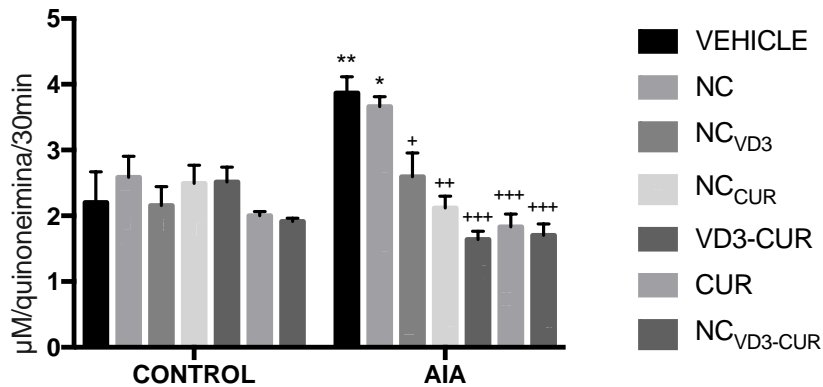


Figure 7 Myeloperoxidase activity in plasma of arthritis induced rats(AIA) and control rats treated for 15 days with corn oil (VEHICLE), nanocapsules blank(NC), nanocapsules with vitamin D₃ (NC_{VD3}), nanocapsules with curcumin (NC_{CUR}), association of vitamin D₃ and curcumin in free form(VD3-CUR), curcumin(CUR) and association of vitamin D₃ and curcumin in nanocapsules (NC_{VD3-CUR}). Enzyme activities are reported as ($\mu\text{M}/\text{quinoneimina}/30\text{min}$). The results were analyzed using two-way ANOVA followed by post hoc of Tukey. The results were expressed as the mean \pm SEM. * indicates that the value is significantly different from the control vehicle group. + indicates that the value is significantly different from the AIA vehicle group.

*($P < 0.05$, $n = 5$), **($P < 0.01$, $n = 5$), + ($P < 0.05$, $n = 5$), ** ($P < 0.01$, $n = 5$), *** ($P < 0.001$, $n = 5$).

Figure 8

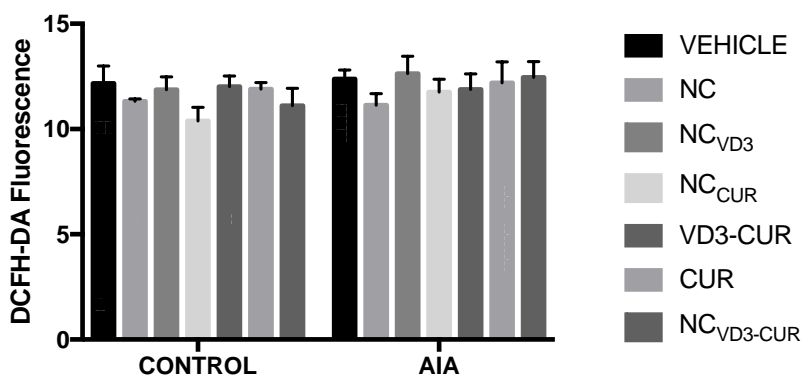


Figure 8 Reactive oxygen species in plasma of arthritis induced rats (AIA) and control rats treated for 15 days with corn oil (VEHICLE), nanocapsules blank (NC), nanocapsules with vitamin D₃ (NC_{VD3}), nanocapsules with curcumin (NC_{CUR}), association of vitamin D₃ and curcumin in free form (VD3-CUR), curcumin (CUR) and association of vitamin D₃ and curcumin in nanocapsules (NC_{VD3-CUR}). Dosage is reported as (DCFH-DA Fluorescence). The results were analyzed using two-way ANOVA followed by post hoc of Tukey. The results were expressed as the mean \pm SEM.

5 CONCLUSÃO

- O modelo de indução de artrite foi bem-sucedido e representou a doença com semelhanças morfológicas e comportamentais evidenciadas e bem estabelecidas pelos testes de escore de artrite, edema de pata, hiperalgésica termal. Entretanto, todos os tratamentos foram capazes de reduzir esses sinais e sintomas, sendo as associações nanoencapsuladas com maior poder.
- Os animais com artrite induzida apresentaram perda de peso corporal. Já os animais com artrite induzida e tratados com associação nanoencapsulada ou na forma livre, mantiveram ou aumentaram seu peso corporal ressaltando o poder anti-inflamatório dos tratamentos.
- Percebeu-se uma diminuição na atividade da E-NTPDase (ATP e ADP) em neutrófilos dos animais com artrite induzida, porém os tratamentos com associação de curcumina e vitamina D₃ foram capazes de reverter estas alterações elevando a hidrólise desses nucleotídeos e reduzindo a sinalização pró inflamatória desses.
- O aumento da atividade da E-ADA em neutrófilos e plaquetas e ADA em soro de animais induzidos sugere uma diminuição da concentração de adenosina e aumento da inflamação nos animais. Contudo, se verificou diminuição de atividade da E-ADA em linfócitos, onde a diferença cinética é sugestiva de um efeito do organismo do animal em contrabalançar os efeitos inibitórios da enzima.
- Os tratamentos com a vitamina D₃ e curcumina nanoencapsulada foram capazes de reverter às atividades das ectoenzimas a níveis similares aos basais em todas as populações de células e enzimas analisadas, demonstrando influência da associação das substâncias no metabolismo do sistema purinérgico e a redução da sinalização inflamatória.

- Os veículos utilizados (óleo de milho e nanocapsulas brancas) não mostraram ter influência sobre a atividade das enzimas E-NTPDase, E- E-ADA, ADA, mieloperoxidase de ratos controle ou induzidos, confirmando que as ações verificadas no estudo foram oriundas das substâncias em análise e não dos veículos utilizados.
- A atividade da mieloperoxidase apresentou-se elevada nos grupos com artrite confirmando o processo inflamatório e o envolvimento da ativação de neutrófilos presente nesta patologia, os tratamentos com associação livre e nanoencapsulada foram capazes de normalizar a atividade desta enzima, revelando papel anti-inflamatório.
- Os níveis de espécies reativas de oxigênio não se alteraram em todos os grupos testados, em soro, demonstrando que tanto modelo quanto tratamentos não foram capazes modificar os níveis de espécies reativas de oxigênio analisadas. Assim, podemos descrever uma independência da elevação mieloperoxidase com os níveis de EROS a nível sorológico, contudo a nível tecidual elas devem estar relacionadas.
- As alterações histopatológicas renais encontradas nos animais artríticos foram revertidas de pelos tratamentos com associação de nanocapsulas de curcumina e vitamina D₃. A avaliação histológica não evidenciou alterações hepáticas nos animais com artrite induzida, bem como os tratamentos com nanocapsulas não provocaram quaisquer alterações nas estruturas testadas, demonstrando a segurança desses tratamentos.
- Nenhum dos parâmetros bioquímicos relacionados ao dano hepático, demonstraram alteração nos grupos induzidos, saudáveis ou nos grupos tratados, bem como o marcador de função renal se manteve sem modificação, confirmando que os tratamentos com nanocapsulas não provocam alterações a nível bioquímico.

- A vitamina D₃, em conjunto com a curcumina, na forma de nanocapsulas permitiu que essas substâncias, apresentassem os efeitos anti-inflamatórios mais proeminentes deste estudo.
- O uso da nanotecnologia por meio do co-nanoencapsulamento de curcumina e vitamina D₃ apresentou efeitos somatórios dessas substâncias, de maneira segura e estável e assim traz a possibilidade do desenvolvimento de uma nova terapia adjuvante para o tratamento da artrite reumatoide.

REFERÊNCIAS

ADLOWITZ, Diana G. et al. Expansion of activated peripheral blood memory B cells in rheumatoid arthritis, impact of B cell depletion therapy, and biomarkers of response. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0128269, 2015.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 1, p. 40–59, 2009.

AGGARWAL, B. B.; SURH, Y.-J.; SHISHODIA, S. **The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2007. v. 595

AGMON-LEVIN, N.; THEODOR, E.; SEGAL, R. M.; SHOENFELD, Y. Vitamin D in systemic and organ-specific autoimmune diseases. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 45, n. 2, p. 256–266, 2013.

ALETAHA, D.; NEOGI, T.; SILMAN, A. J.; FUNOVITS, J.; FELSON, D. T.; BINGHAM III, C. O.; BIRNBAUM, N. S.; BURMESTER, G. R.; BYKERK, V. P.; COHEN, M. D. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569–2581, 2010.

ALPÍZAR-RODRÍGUEZ, D.; PLUCHINO, N.; CANNY, G.; GABAY, C.; FINCKH, A. The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 56, n. 8, p. 1254–1263, 2016.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.

ANTICO, A.; TAMPOIA, M.; TOZZOLI, R.; BIZZARO, N. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 2, p. 127–136, 2012.

ANTONIOLI, L.; BLANDIZZI, C.; PACHER, P.; HASKÓ, G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 842, 2013a.

ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; MOTTA, C. La; TUCCORI, M.; AWWAD, O.; SETTIMO, F. Da; BLANDIZZI, C.; FORNAI, M. Adenosine Deaminase in the Modulation of Immune System and its Potential as a Novel Target for Treatment of Inflammatory Disorders. p. 842–862, 2012.

ANTONIOLI, Luca et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355-367, 2013.

ARNSON, Y.; AMITAL, H.; SHOENFELD, Y. Vitamin D and autoimmunity: new

aetiological and therapeutic considerations. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, n. 9, p. 1137–1142, 2007.

ARORA, R.; KUHAD, A.; KAUR, I. P.; CHOPRA, K. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats. **European Journal of Pain**, v. 19, n. 7, p. 940–952, 2015.

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S. C. Ecto-nucleotidases of the CD39 / NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 36, p. 217–222, 2006.

BARON, L.; GOMBAULT, A.; FANNY, M.; VILLERET, B.; SAVIGNY, F.; GUILLOU, N.; PANEK, C.; LE BERT, M.; LAGENTE, V.; RASSENDREN, F. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 2, p. e1629, 2016.

BARSOZZI, C.; IPATA, P. L. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 11, p. 2214–2225, 2004.

BATTASTINI, A. M. O.; ZANIN, R. F.; BRAGANHOL, E. Recentes avanços no estudo das enzimas que hidrolisam o ATP extracelular. **Ciência e Cultura**, v. 63, n. 1, p. 26–28, 2011.

BAX, M.; VAN HEEMST, J.; HUIZINGA, T. W. J.; TOES, R. E. M. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Immunogenetics**, v. 63, n. 8, p. 459–466, 2011.

BECKENKAMP, A.; DAVIES, S.; WILLIG, J. B.; BUFFON, A. DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? **Tumor Biology**, v. 37, n. 6, p. 7059–7073, 2016.

BECKER, L. V.; ROSA, C. S.; SOUZA, V. do C. G.; BAGATINI, M. D.; CASALI, E. A.; LEAL, C. A. M.; DA SILVA, J. C. N.; MORETTO, M. B.; PINHEIRO, F. de V.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. R. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 13–14, p. 1096–1100, 2010.

BENDELE, A. Animal models of rheumatoid arthritis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 1, n. 4, p. 377–385, 2001.

BENNIKE, T. B.; ELLINGSEN, T.; GLERUP, H.; BONDERUP, O. K.; CARLSEN, T. G.; MEYER, M. K.; BØGSTED, M.; CHRISTIANSEN, G.; BIRKELUND, S.; ANDERSEN, V.; STENSBALLE, A. Proteome Analysis of Rheumatoid Arthritis Gut Mucosa. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 1, p. 346–354, jan. 2017.

BERTRAND, N.; LEROUX, J.-C. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 152–163, 2012.

BIKLE, D. Nonclassic actions of vitamin D. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 26–34, 2009.

BIRK, A. V.; BROEKMAN, M. J.; GLADEK, E. M.; ROBERTSON, H. D.; DROSOPOULOS, J. H. F.; MARCUS, A. J.; SZETO, H. H. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 140, n. 3, p. 166–175, 5 nov. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1067/mlc.2002.126719>>.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**, v. 12, n. 7, p. 620–636, 2011.

BOUILLON, R. Extra-Skeletal Effects of Vitamin D. In: **Frontiers of Hormone Research**. [s.l.: s.n.]50p. 72–88.

BOURS, M. J. L.; SWENNEN, E. L. R.; VIRGILIO, F. Di; CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5' -triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 358–404, 2006.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471–1483, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Therapeutic developments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. September, p. 1–55, 2017.

BURNSTOCK, Geoffrey; BOEYNAEMS, Jean-Marie. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic signalling**, v. 10, n. 4, p. 529-564, 2014.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Receptors for purines and pyrimidines. In: **Purinergic Signalling and the Nervous System**. [s.l.] Springer, 2012. p. 119–244.

BYKOV, V. J. N.; LAMBERT, J. M. R.; HAINAUT, P.; WIMAN, K. G. Mutant p53 rescue and modulation of p53 redox state. **Cell Cycle**, v. 8, n. 16, p. 2509–2517, 2009.

CALGAROTO, N. S.; DA COSTA, P.; CARDOSO, A. M.; PEREIRA, L. B.; VIEIRA, J. M.; DALENOGARE, D.; PELINSON, L. P.; BALDISSARELLI, J.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Vitamin D3 prevents the increase in ectonucleotidase activities and ameliorates lipid profile in type 1 diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 405, n. 1–2, p. 11–21, 2015.

CANTORNA, M. T.; HAYES, C. E.; DELUCA, H. F. 1, 25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 1, p. 68–72, 1998.

CARRILHO, F. M. da C. C.; FERREIRA, T. **Influência de níveis de vitamina D na actividade da artrite reumatóide**, 2009.

CASANOVA, V.; NAVAL-MACABUHAY, I.; MASSANELLA, M.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.; BLANCO, J.; GATELL, J. M.; GARCÍA, F.; GALLART, T.; LLUIS, C.;

MALLOL, J.; FRANCO, R.; CLIMENT, N.; MCCORMICK, P. J. Adenosine Deaminase Enhances the Immunogenicity of Human Dendritic Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals. **Plos One**, v. 7, n. 12, p. e51287, 11 dez. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051287>>.

CASTILHOS, L. G.; REZER, J. P.; RUCHEL, J. B.; THORSTENBERG, M. L. M. L.; JAQUES, J. A. do. S.; SCHLEMMER, J. B.; DOLESKI, P. H.; ROSSATO, M. F.; DA SILVA, M. A.; CASALLI, E. A.; DA CRUZ, R. C.; FERREIRA, J.; ATHAYDE, M. L.; GONÇALVES, J. F.; LEAL, D. B. R. Effect of *Uncaria tomentosa* extract on purinergic enzyme activities in lymphocytes of rats submitted to experimental adjuvant arthritis model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.

CATRINA, A. I.; JOSHUA, V.; KLARESKOG, L.; MALMSTRÖM, V. Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 269, n. 1, p. 162–174, 2016.

CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Methotrexate—how does it really work? **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 3, p. 175, 2010.

CHEN, J.; WRIGHT, K.; DAVIS, J. M.; JERALDO, P.; MARIETTA, E. V.; MURRAY, J.; NELSON, H.; MATTESON, E. L.; TANEJA, V. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 43, 2016.

CHEN, Y.; YAO, Y.; SUMI, Y.; LI, A.; TO, U. K.; ELKHAL, A.; INOUE, Y.; WOEHRLE, T.; ZHANG, Q.; HAUSER, C.; JUNGER, W. G. Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. **Science Signaling**, v. 3, n. 125, p. ra45, 2010.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, n. suppl_5, p. v3–v11, 2012.

CHOY, E. H.; KAVANAUGH, A. F.; JONES, S. A. The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 3, p. 154, 2013.

CONIGLIARO, P.; CHIMENTI, M. S.; TRIGGIANESE, P.; SUNZINI, F.; NOVELLI, L.; PERRICONE, C.; PERRICONE, R. Autoantibodies in inflammatory arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 7, p. 673–683, 2016.

CORRIDEN, R.; CHEN, Y.; INOUE, Y.; BELDI, G.; ROBSON, S. C.; INSEL, P. A.; JUNGER, W. G. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 42, p. 28480–28486, 2008.

CUTOLO, M.; PLEBANI, M.; SHOENFELD, Y.; ADORINI, L.; TINCANI, A. Vitamin D endocrine system and the immune response in rheumatic diseases. In: **Vitamins & Hormones**. [s.l.] Elsevier, 2011. 86p. 327–351.

DA SILVEIRA, K. L.; DA SILVEIRA, L. L.; THORSTENBERG, M. L. P.; CABRAL, F. L.; CASTILHOS, L. G.; REZER, J. F. P.; DE ANDRADE, D. F.; BECK, R. C. R.; EINLOFT PALMA, H.; DE ANDRADE, C. M.; PEREIRA, R. da S.; MARTINS, N. M. B.;

BERTONCHEL DOS SANTOS, C. de M.; LEAL, D. B. R. Free and nanoencapsulated vitamin D3: effects on E-NTPDase and E-ADA activities in an animal model with induced arthritis. **Cell Biochemistry and Function**, v. 34, n. 4, p. 262–273, 2016.

DANTAS, A. T.; DUARTE, Â. L. B. P.; MARQUES, C. D. L. A vitamina D na artrite reumatoide e no lúpus eritematoso. **O reumatologista revista, Pernambuco**, v. 2, n. 64, p. 53–59, 2009.

DE STEFANO, R.; FRATI, E.; NARGI, F.; BALDI, C.; MENZA, L.; HAMMOUD, M.; GALEAZZI, M. Comparison of combination therapies in the treatment of rheumatoid arthritis: leflunomide-anti-TNF-alpha versus methotrexate-anti-TNF-alpha. **Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 5, p. 517–524, 2010.

DEANE, K. D. Learning about the natural history of rheumatoid arthritis development through prospective study of subjects at high risk of rheumatoid arthritis-related autoimmunity. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 6, p. 1708–1712, 2012.

DEB, K. D.; GRIFFITH, M.; MUINCK, E. D.; RAFAT, M. Nanotechnology in stem cells research: advances and applications. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, p. 1747–1760, 2012.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J. M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O. R. Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587–600, 2001.

DITTMER, K. E.; THOMPSON, K. G. Vitamin D metabolism and rickets in domestic animals: a review. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 2, p. 389–407, 2011.

DOUGADOS, M.; SOUBRIER, M.; ANTUNEZ, A.; BALINT, P.; BALSÀ, A.; BUCH, M. H.; CASADO, G.; DETERT, J.; EL-ZORKANY, B.; EMERY, P. Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 1, p. 62–68, 2014.

DWYER, K. M.; DEAGLIO, S.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; STROM, T. B.; ROBSON, S. C. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 1–2, p. 171, 2007.

BIANCHI E.M. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–5, out. 2006.

ERNST, P. B.; GARRISON, J. C.; THOMPSON, L. F. Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 4, p. 1993–1998, 15 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3036969/>>.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis. **Annual Review of Immunology**, v. 14, n. 1, p. 397–440, 1996.

- FELDMANN, M. et al. Rheumatoid Arthritis. **Cell**, v. 85, n. 3, p. 307–310, mar. 1996.
- FERNANDES, R. M. S. N.; SILVA, N. P. da; SATO, E. I. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 6, p. 1605–1609, 2012.
- FERNÁNDEZ, P.; PEREZ-ASO, M.; SMITH, G.; WILDER, T.; TRZASKA, S.; CHIRIBOGA, L.; FRANKS JR, A.; ROBSON, S. C.; CRONSTEIN, B. N.; CHAN, E. S. L. Extracellular generation of adenosine by the ectonucleotidases CD39 and CD73 promotes dermal fibrosis. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 6, p. 1740–1746, 2013.
- FIRESTEIN, G. S. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 11, n. 3, p. S39–S44, 2005.
- FIRESTEIN, G. S. The disease formerly known as rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 16, n. 3, p. 2–4, 2014.
- FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Review Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 183–196, 2017.
- FOSSATI, G.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Differential role of neutrophil Fcγ receptor IIIB (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 5, p. 1351–1361, 2002.
- FREDERICK, W.; KALEB, M. Predicting depression in rheumatoid arthritis: The signal importance of pain extent and fatigue, and comorbidity. **Arthritis Care & Research**, v. 61, n. 5, p. 667–673, abr. 2009.
- GOMBAULT, A.; BARON, L.; COUILLIN, I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 414, 8 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539150/>>.
- GOMES, R. P.; BRESSAN, E.; SILVA, T. M. da; GEVAERD, M. da S.; TONUSSI, C. R.; DOMENECH, S. C. Padronização de modelo experimental adequado a estudos do efeito do exercício na artrite. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 1, p. 76–82, 2013.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 117739280700200000, 2007.
- HAMEED, A. K. M.; EL-SAID, T. O.; ASKAR, H. Y.; ELKADY, B. A. Performance of serum adenosine deaminase in measuring disease activity in rheumatoid arthritis patients. **The Egyptian Rheumatologist**, 2018.
- HAROON, N.; AGGARWAL, A.; LAWRENCE, A.; AGARWAL, V.; MISRA, R. Impact of rheumatoid arthritis on quality of life. **Modern Rheumatology**, v. 17, n. 4, p. 290–295, 2007.
- HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate

immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 33–39, 2004.

HAYES, C. E.; HUBLER, S. L.; MOORE, J. R.; BARTA, L. E.; PRASKA, C. E.; NASHOLD, F. E. Vitamin D actions on CD4+ T cells in autoimmune disease. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 100, 2015.

HONG, J.; BOSE, M.; JU, J.; RYU, J.-H.; CHEN, X.; SANG, S.; LEE, M.-J.; YANG, C. S. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related β -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A 2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 9, p. 1671–1679, 2004.

HORTA-BAAS, G.; ROMERO-FIGUEROA, M. D. S.; MONTIEL-JARQUÍN, A. J.; PIZANO-ZÁRATE, M. L.; GARCÍA-MENA, J.; RAMÍREZ-DURÁN, N. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017.

HUANG, G.; YANG, Y.; XU, Z.; ZHOU, P.; GONG, W.; LI, Y.; FAN, J.; HE, F. Downregulation of B lymphocyte stimulator expression by curcumin in B lymphocyte via suppressing nuclear translocation of NF- κ B. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 451–457, 2011.

JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130–140, 2009.

JAGETIA, G. C.; AGGARWAL, B. B. “Spicing up” of the immune system by curcumin. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 1, p. 19–35, 2007.

JAQUES, J. A. dos S.; BECKER, L. V.; SOUZA, V. do C. G.; LEAL, C. A. M.; BERTOLDO, T. M. D.; VARGAS PINHEIRO, K.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. R. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 5, p. 395–399, 2013a.

JAQUES, J. A. dos S.; DOLESKI, P. H.; CASTILHOS, L. G. .; DA ROSA, M. M.; SOUZA, V. do C. G.; CARVALHO, F. B.; MARISCO, P.; THORSTENBERG, M. L. P.; REZER, J. F. P.; RUCHEL, J. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C. R.; RUBIN, M. A.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. R. Free and nanoencapsulated curcumin prevents cigarette smoke-induced cognitive impairment and redox imbalance. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 98–107, 2013b.

JAQUES, J. A.; REZER, J. F.; GONCALVES, J. F., SPANEVELLO, R. M., GUTIERRES, J. M.; PIMENTEL V. C. The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, p. 703–707, 2011a.

JAQUES, J. A. S.; REZER, J. F.; RUCHEL, J. B.; BECKER, L. V.; DA ROSA, C. S.; SOUZA, V. G. do C.; DA LUZ, C. A.; GUTIERRES, J. M.; GONÇALVES, J. F.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. R. Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 1, p. 109–115, 2011b.

JAQUES, J. A. S.; RUCHEL, J. B.; SCHLEMMER, K. B.; PIMENTEL, V. C.; BAGATINI, M.; C., S. V. do; MORETTO, M. B; MORSCH, V. . M.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. Effects of curcumin on the activities of the enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from cigarette smoke-exposed rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, p. 630–635, 2011c.

JIANG, C. X.; WU, L.; WU, J.; YU, Z. M.; LI, X. K. Curcumin analog exhibited anti-inflammatory activity through inhibiting ERK/JNK and NF- κ B signaling pathway. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 47, n. 16, p. 2871–2876, 2016.

JOSEPH, A.; BRASINGTON, R.; KAHL, L.; RANGANATHAN, P.; CHENG, T. P.; ATKINSON, J. Immunologic rheumatic disorders. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S204–S215, 2010.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201–212, 18 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4209705/>>.

KALJAS, Y.; LIU, C.; SKALDIN, M.; WU, C.; ZHOU, Q.; LU, Y.; AKSENTIJEVICH, I.; ZAVIALOV, A. V. Human adenosine deaminases ADA1 and ADA2 bind to different subsets of immune cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. September, p. 555–570, 2016.

KILLEEN, M. E.; FERRIS, L.; KUPETSKY, E. A.; FALO, L.; MATHERS, A. R. Signaling through Purinergic Receptors for ATP Induces Human Cutaneous Innate and Adaptive Th17 Responses: Implications in the Pathogenesis of Psoriasis. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 4324 LP-4336, abr. 2013.

KLARESKOG, L.; AMARA, K.; MALMSTRÖM, V. Adaptive immunity in rheumatoid arthritis: anticitrulline and other antibodies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 72–79, 2014.

KOCH, A. E. Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. suppl 2, p. ii60 LP-ii67, nov. 2003.

KRIVOSIKOVA, M.; DALLOS, T.; MASLINSKI, W.; BUC, M. B cell activating factor, its role in autoimmunity, and targeting in autoimmune diseases. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 110, n. 3, p. 137–145, 2009.

LAO, C. D.; RUFFIN, M. T.; NORMOLLE, D.; HEATH, D. D.; MURRAY, S. I.; BAILEY, J. M.; BOGGS, M. E.; CROWELL, J.; ROCK, C. L.; BRENNER, D. E. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 1, p. 10, 2006.

LAURINDO, I. M. M.; XIMENES, A. C.; LIMA, F. A. C.; PINHEIRO, G. R. C.; BATISTELLA, L. R.; BERTOLO, M. B.; ALENCAR, P.; XAVIER, R. M.; GIORGI, R. D. N.; CICONELLI, R. M. Artrite reumatóide: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 6, p. 435–442, 2004.

LEAL, D. B.; STREHER, C. A.; BERTONCHELI CDE, M.; CARLI, L. F.; LEAL, C. A.; DA SILVA, J. E.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1746, n. 2, p. 129-134, 2005

LEDDEROSE, C.; BAO, Y.; KONDO, Y.; FAKHARI, M.; SLUBOWSKI, C.; ZHANG, J.; JUNGER, W. G. Purinergic signaling and the immune response in sepsis: a review. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 1054–1065, 2016.

LEFKOWITZ, D. L.; LEFKOWITZ, S. S. Macrophage–neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. **Immunology and Cell Biology**, v. 79, n. 5, p. 502–506, 2001.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 775–787, 2001.

LIU, W.; CHEN, X. D.; CHENG, Z.; SELOMULYA, C. On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 169, p. 189–195, 2016.

LOURIDO, L.; BLANCO, F. J.; RUIZ-ROMERO, C. Defining the proteomic landscape of rheumatoid arthritis: progress and prospective clinical applications. **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 5, p. 431–444, 2017.

LUNKES, G. I.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, V. M.; MAZZANTI, C. M.; SCHETINGER, M. R. C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 189–194, 5 nov. 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(03\)00178-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(03)00178-6)>.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 836–843, 2012.

M., E. J.; CORD, S.; DIRK, F.; THOMAS, V.; JOHANNES, R. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 3, p. 557–566, maio 2009.

MALMSTRÖM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 60, dez. 2017.

MANDERS, S. H. M.; KIEVIT, W.; ADANG, E.; BRUS, H. L.; MOENS, H. J. B.; HARTKAMP, A.; HENDRIKS, L.; BROUWER, E.; VISSER, H.; VONKEMAN, H. E. Cost-effectiveness of abatacept, rituximab, and TNFi treatment after previous failure with TNFi treatment in rheumatoid arthritis: a pragmatic multi-centre randomised trial. **Arthritis Research & Therapy**, v. 17, n. 1, p. 134, 2015.

MARTIN, M.; HUGUET, J.; CENTELLES, J. J.; FRANCO, R. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 10, p. 4630–4643, 1995.

MATEEN, S.; MOIN, S.; KHAN, A. Q.; ZAFAR, A.; FATIMA, N. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Plos one**, v. 11, n. 4, p. e0152925, 2016.

MATTNER, F.; SMIROLDO, S.; GALBIATI, F.; MULLER, M.; DI LUCIA, P.; POLIANI, P. L.; MARTINO, G.; PANINA-BORDIGNON, P.; ADORINI, L. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1, 25-dihydroxyvitamin D3. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 2, p. 498–508, 2000.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, dez. 2011.

MENEZES, R. R. Monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos Holtzman e avaliação dos efeitos induzidos pelo tratamento crônico com tiamina ou riboflavina. 2013.

MERLINO, L. A.; CURTIS, J.; MIKULS, T. R.; CERHAN, J. R.; CRISWELL, L. A.; SAAG, K. G. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. **Arthritis & Rheumatology**, v. 50, n. 1, p. 72–77, 2004.

MINCHIN, R. Nanomedicine: sizing up targets with nanoparticles. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 1, p. 12, 2008.

MOMTAZI-BOROJENI, A. A.; HAFTCHESHMEH, S. M.; ESMAEILI, S.-A.; JOHNSTON, T. P.; ABDOLLAHI, E.; SAHEBKAR, A. Curcumin: A natural modulator of immune cells in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 2, p. 125–135, 2018.

MORCIANO, G.; SARTI, A. C.; MARCHI, S.; MISSIROLI, S.; FALZONI, S.; RAFFAGHELLO, L.; PISTOIA, V.; GIORGI, C.; DI VIRGILIO, F.; PINTON, P. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. **Nature Protocols**, v. 12, n. 8, p. 1542, 2017.

MORENO, E.; CANET, J.; GRACIA, E.; LLUÍS, C.; MALLOL, J.; CANELA, E. I.; CORTÉS, A.; CASADÓ, V. Molecular Evidence of Adenosine Deaminase Linking Adenosine A2A Receptor and CD26 Proteins. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. February, p. 1–18, 2018.

MOTA, L. M. H. da; LAURINDO, I. M. M.; SANTOS NETO, L. L. dos. Artrite reumatoide inicial: conceitos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 227–229, 2010.

NELL-DUXNEUNER, V.; MACHOLD, K.; STAMM, T.; EBERL, G.; HEINZL, H.; HOEFLER, E.; SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis: a follow-up study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 01, p. 169 LP-174, jan. 2010.

NEVE, A.; CORRADO, A.; CANTATORE, F. P. Immunomodulatory effects of vitamin D in peripheral blood monocyte-derived macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 14, n. 3, p. 275–283, 2014.

NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its applications in medicine. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 81–89, 2015.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health–. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 491S–499S, 2008.

O'SHEA, J. J.; SCHWARTZ, D. M.; VILLARINO, A. V; GADINA, M.; MCINNES, I. B.; LAURENCE, A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. **Annual Review of Medicine**, v. 66, p. 311–328, 2015.

OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUL, p. 1–9, 2014.

OLIVEIRA, P. G.; BRENOL, C. V.; EDELWEISS, M. I.; MEURER, L.; BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M. Subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 4, p. 184–187, 2007.

PACHECO, R.; MARTINEZ-NAVIO, J. M.; LEJEUNE, M.; CLIMENT, N.; OLIVA, H.; GATELL, J. M.; GALLART, T.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9583–9588, 2005.

PANAHI, Y.; ALISHIRI, G. H.; PARVIN, S.; SAHEBKAR, A. Mitigation of systemic oxidative stress by curcuminoids in osteoarthritis: results of a randomized controlled trial. **Journal of Dietary Supplements**, v. 13, n. 2, p. 209–220, 2016.

PASSOS, D. F.; BERNARDES, V. M.; DA SILVA, J. L. G.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. R. Adenosine signaling and adenosine deaminase regulation of immune responses: impact on the immunopathogenesis of HIV infection. **Purinergic Signalling**, 2018.

PATEL, M. R.; MARTIN-GONZALEZ, S.; FERNANDA, M. Characterization of ergocalciferol loaded solid lipid nanoparticles. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

PATEL, S.; FARRAGHER, T.; BERRY, J.; BUNN, D.; SILMAN, A.; SYMMONS, D. Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 56, n. 7, p. 2143–2149, 2007.

PENNA, G.; RONCARI, A.; AMUCHASTEGUI, S.; DANIEL, K. C.; BERTI, E.; COLONNA, M.; ADORINI, L. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. **Blood**, v. 106, n. 10, p. 3490–3497, 2005.

POLLARD, L.; CHOY, E. H.; SCOTT, D. L. The consequences of rheumatoid arthritis: quality of life measures in the individual patient. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 23, n. 5, p. S43, 2005.

QADIR, M. I.; NAQVI, S. T.; MUHAMMAD, S. A. Curcumin: a polyphenol with molecular targets for cancer control. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 6, p. 2735–2739, 2016.

RADNER, H.; YOSHIDA, K.; MJAAVATTEN, M. D.; ALETAHA, D.; FRITS, M.; LU, B.; IANNACCONE, C.; SHADICK, N.; WEINBLATT, M.; HMAMOUCHE, I.; DOUGADOS, M.; SMOLEN, J. S.; SOLOMON, D. H. Development of a multimorbidity index: Impact on quality of life using a rheumatoid arthritis cohort. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 2, p. 167–173, abr. 2015.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. **Drug News & Perspectives**, v. 16, n. 3, p. 133–40, 2003.

RAO, M. N. A. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 12, p. 1013–1016, 1994.

ROBERTS, E. L.; ROBERTS, O. T. Plasma adenosine deaminase isoform 2 in cancer patients undergoing chemotherapy. **British Journal of Biomedical Science**, v. 69, n. 1, p. 11–13, 2012.

ROLLET-LABELLE, E.; VAILLANCOURT, M.; MAROIS, L.; NEWKIRK, M. M.; POUBELLE, P. E.; NACCACHE, P. H. Cross-linking of IgGs bound on circulating neutrophils leads to an activation of endothelial cells: possible role of rheumatoid factors in rheumatoid arthritis-associated vascular dysfunction. **Journal of Inflammation**, v. 10, n. 1, p. 27, 2013.

ROSSINI, M.; BONGI, S. M.; LA MONTAGNA, G.; MINISOLA, G.; MALAVOLTA, N.; BERNINI, L.; CACACE, E.; SINIGAGLIA, L.; DI MUNNO, O.; ADAMI, S. Vitamin D deficiency in rheumatoid arthritis: prevalence, determinants and associations with disease activity and disability. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 6, p. R216, 2010.

ROY, T.; BANERJEE, I.; GHOSH, S.; DHALI, R. S.; DE PATI, A.; TRIPATHI, S. K. Effects of co-treatment with pioglitazone and methotrexate on experimentally induced rheumatoid arthritis in Wistar albino rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 49, n.

2, p. 168, 2017.

RUCHEL, J. B.; REZER, J. F. P.; THORSTENBERG, M. L.; DOS SANTOS, C. B.; CABRAL, F. L.; LOPES, S. T. A.; DA SILVA, C. B.; MACHADO, A. K.; DA CRUZ, I. B. M.; SCHETINGER, M. R. C. Hypercholesterolemia and Ecto-enzymes of Purinergic System: Effects of Paullinia cupana. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 1, p. 49–57, 2016.

RUDAN, I.; SIDHU, S.; PAPANA, A.; MENG, S.-J.; XIN-WEI, Y.; WANG, W.; CAMPBELL-PAGE, R. M.; DEMAIO, A. R.; NAIR, H.; SRIDHAR, D.; THEODORATOU, E.; DOWMAN, B.; ADELOYE, D.; MAJEED, A.; CAR, J.; CAMPBELL, H.; CHAN, K. Y. Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis. **Journal of Global Health**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.

RYAN, L. M.; RACHOW, J. W.; MCCARTY, D. J. Synovial fluid ATP: a potential substrate for the production of inorganic pyrophosphate. **The Journal of Rheumatology**, v. 18, n. 5, p. 716–720, 1991.

SAHEBKAR, A. Dual effect of curcumin in preventing atherosclerosis: the potential role of pro-oxidant–antioxidant mechanisms. **Natural Product Research**, v. 29, n. 6, p. 491–492, 2015.

SALESI, M.; GHAZVINI, R. A.; FARAJZADEGAN, Z.; KARIMIFAR, M.; KARIMZADEH, H.; MASOUMI, M.; EBRAHIMI, B. Serum adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. **Journal of Research in Pharmacy Practice**, v. 1, n. 2, p. 72, 2012.

SANMARTÍ, R.; GÓMEZ-PUERTA, J. A. Biomarcadores en la artritis reumatoide. **Reumatología Clínica**, v. 6, p. 25–28, 2011.

SATTAR, N.; MCCAREY, D. W.; CAPELL, H.; MCINNES, I. B. Explaining How “High-Grade” Systemic Inflammation Accelerates Vascular Risk in Rheumatoid Arthritis. **Circulation**, v. 108, n. 24, p. 2957 LP-2963, dez. 2003.

SCHER, J. U.; ABRAMSON, S. B. The microbiome and rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 10, p. 569, 2011.

SCHINNERLING, K.; AGUILLÓN, J. C.; CATALÁN, D.; SOTO, L. The role of interleukin-6 signalling and its therapeutic blockage in skewing the T cell balance in rheumatoid arthritis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 189, n. 1, p. 12–20, 2017.

SCHULER, P. J.; SAZE, Z.; HONG, C. S.; MULLER, L.; GILLESPIE, D. G.; CHENG, D.; HARASYMCZUK, M.; MANDAPATHIL, M.; LANG, S.; JACKSON, E. K.; WHITESIDE, T. L. Human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 177, n. 2, p. 531–543, 2014.

SHUREIQI, I.; BARON, J. A. Curcumin chemoprevention: the long road to clinical translation. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 3, p. 296–298, 2011.

SINGH, J. A.; SAAG, K. G.; BRIDGES JR, S. L.; AKL, E. A.; BANNURU, R. R.; SULLIVAN, M. C.; VAYSBROT, E.; MCNAUGHTON, C.; OSANI, M.; SHMERLING, R. H. 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 68, n. 1, p. 1–26, 2016.

SITKOVSKY, M. V.; OHTA, A. The ‘danger’ sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? **Trends in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 299–304, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490605001031>>.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 2016.

SOETIKNO, V.; SARI, F. R.; VEERAVEEDU, P. T.; THANDAVARAYAN, R. A.; HARIMA, M.; SUKUMARAN, V.; LAKSHMANAN, A. P.; SUZUKI, K.; KAWACHI, H.; WATANABE, K. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF- κ B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 35, 2011.

SONG, G. G.; BAE, S.-C.; LEE, Y. H. Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 12, p. 1733–1739, 2012.

SOUZA, V. do C. G.; SCHLEMMER, K. B.; NOAL, C. B.; JAQUES, J. A. S.; BAGATINI, M. D.; PIMENTEL, V. C.; CARLI, L. F. D.; LEAL, C. A. M.; FLECK, J.; MORETTO, M. B. Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 4, p. 753–762, 2012.

SRIVASTAVA, R. M.; SINGH, S.; DUBEY, S. K.; MISRA, K.; KHAR, A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 331–341, 2011.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A. E. Mechanisms of disease: Angiogenesis in inflammatory diseases. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 3, n. 11, p. 635–643, 2007.

TAK, P. P.; RIGBY, W. F.; RUBBERT-ROTH, A.; PETERFY, C. G.; VAN VOLLENHOVEN, R. F.; STOHL, W.; HESSEY, E.; CHEN, A.; TYRRELL, H.; SHAW, T. M. Inhibition of joint damage and improved clinical outcomes with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: the IMAGE trial. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 1, p. 39–46, 2011.

TU, L.; LI, S.; FU, Y.; YAO, R.; ZHANG, Z.; YANG, S.; ZENG, X.; KUANG, N. The therapeutic effects of daphnetin in collagen-induced arthritis involve its regulation of Th17 cells. **International immunopharmacology**, v. 13, n. 4, p. 417–423, 2012.

VAN DER WEYDEN, M. B.; KELLEY, W. N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 18, p. 5448–5456, 1976.

VARANI, K.; PADOVAN, M.; GOVONI, M.; VINCENZI, F.; TROTTA, F.; BOREA, P. A. The role of adenosine receptors in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 2, p. 61–64, 2010.

VIJAYAN, D.; YOUNG, A.; TENG, M. W. L.; SMYTH, M. J. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, p. 709, 23 out. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.86>>.

WANG, X.; CHEN, D. Purinergic regulation of neutrophil function. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 399, 2018.

WANG, Z.; LI, J.; CHO, J.; MALIK, A. B. Prevention of vascular inflammation by nanoparticle targeting of adherent neutrophils. **Nature Nanotechnology**, v. 9, n. 3, p. 204, 2014.

WANG, Z.; RUAN, J.; CUI, D. Advances and prospect of nanotechnology in stem cells. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 7, p. 593, 2009.

WIKENE, K. O.; BRUZELL, E.; TØNNESEN, H. H. Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, p. 26–32, 2015.

WORDSWORTH, P.; BELL, J. Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 15, n. 7, p. 673–683, 2016.

WORTHINGTON, J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Journal of autoimmunity**, v. 25, p. 16–20, 2005.

XIE, C.; MA, L.; LIU, J.; LI, X.; PEI, H.; XIANG, M.; CHEN, L. SKLB023 blocks joint inflammation and cartilage destruction in arthritis models via suppression of nuclear factor-kappa B activation in macrophage. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. e56349, 2013.

XIE, L.; LI, X.-K.; FUNESHIMA-FUJI, N.; KIMURA, H.; MATSUMOTO, Y.; ISAKA, Y.; TAKAHARA, S. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by curcumin treatment through inhibition of IL-17 production. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 5, p. 575–581, 2009.

XUE, M.; ZHU, H.; THAKUR, A.; WILLCOX, M. 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. **Immunology and Cell Biology**, v. 80, n. 4, p. 340–345, 2002.

YANG, Y.; WU, X.; WEI, Z.; DOU, Y.; ZHAO, D.; WANG, T.; BIAN, D.; TONG, B.; XIA, Y.; XIA, Y. Oral curcumin has anti-arthritic efficacy through somatostatin generation via cAMP/PKA and Ca²⁺/CaMKII signaling pathways in the small intestine. **Pharmacological Research**, v. 95, p. 71–81, 2015.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008.

ZAVIALOV, A. V; ENGSTRÖM, Å. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **Biochemical Journal**, v. 391, n. 1, p. 51–57, 2005.

ZHONG, J.; GONG, Q.; GOUD, A.; SRINIVASAMAHARAJ, S.; RAJAGOPALAN, S. Recent advances in dipeptidyl-peptidase-4 inhibition therapy: lessons from the bench and clinical trials. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, 2015.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.

ZITTERMANN, A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 552–572, 2003

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA UFSM (CEUA/UFSM)



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE VITAMINA D E CURCUMINA NANOENCAPSULADAS SOBRE A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM MODELO DE ARTRITE", protocolada sob o CEUA nº 8937281117, sob a responsabilidade de **Daniela Bitencourt Rosa Leal e equipe; Jean Lucas Gutknecht da Silva; Fernanda Licker Cabral; Viviane Martins Bernardes; Paula Ivanir Schimites** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 22/02/2018.

We certify that the proposal "EFFECT OF THE ASSOCIATION OF VITAMIN D AND CURCUMIN NANOENCAPSULATED ON PURINERGIC SIGNALING IN ARTHRITIS MODEL", utilizing 72 Heterogenics rats (72 females), protocol number CEUA 8937281117, under the responsibility of **Daniela Bitencourt Rosa Leal and team; Jean Lucas Gutknecht da Silva; Fernanda Licker Cabral; Viviane Martins Bernardes; Paula Ivanir Schimites** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 02/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2018** a **02/2020** Área: **Microbiologia E Parasitologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **8 a 10 semanas**

N: **72**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **150 a 200 g**

Resumo: A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica que atinge principalmente a membrana sinovial, cartilagem e osso. Esta patologia afeta 1% da população e está associada com morbidade significativa e aumento da mortalidade. Há evidências de que vitamina D, um hormônio esteroide responsável pela homeostase do cálcio, possui um importante papel imunomodulador na artrite reumatoide, pois exerce ação de inibição da proliferação de linfócitos T, especialmente Th1, bem como na produção e na ação de citocinas. Estes processos envolvem a sinalização purinérgica composta por nucleotídeos e nucleosídeo, seus respectivos receptores, bem como de enzimas responsáveis por sua degradação. Estudos envolvendo avaliação da atividade de enzimas que participam da cascata de degradação dos nucleotídeos da adenina, a expressão das mesmas e do receptor purinérgico P2X7, em plaquetas e linfócitos, são importantes para verificar a sinalização purinérgica na regulação da resposta imune e inflamatória durante a evolução clínica de várias doenças. A investigação da sinalização purinérgica já foi realizada em pacientes com artrite no entanto, torna-se importante a pesquisa de novas alternativas de tratamento da artrite, utilizando modelo animal. A curcumina possui importante ação anti-inflamatória e antioxidante e seus efeitos foram descritos por prevenir, alterações na sinalização purinérgica em modelo de exposição à fumaça do cigarro. Recentemente, a ação da vitamina D3 livre e nanoencapsulada foi testada em modelo de artrite induzida por adjuvante, onde observou-se resultados semelhantes à curcumina. Assim, baseando-se nos efeitos anti-inflamatórios encontrados no uso separado de curcumina e vitamina D3 nanoencapsuladas pretende-se avaliar os possíveis efeitos da associação destes compostos na forma nanoencapsulada, sobre a sinalização purinérgica, em modelo de artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA) e sua relação com o processo inflamatório.

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia - indução e tratamento Laboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (Prédio 20) - eutanásia

Santa Maria, 04 de fevereiro de 2019



Comissão de Ética no Uso de Animais

da *Universidade Federal de Santa Maria*

Prof. Dr. Denis Brook Roseberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria