



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



FABIANA DE ALMEIDA CURYLOFO

**EFEITO DE UM CURCUMIN MODIFICADO QUIMICAMENTE
SOBRE A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA E APOPTOSE.
ESTUDO IN VIVO E IN VITRO.**

Araraquara

2014



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



FABIANA DE ALMEIDA CURYLOFO

**EFEITO DE UM CURCUMIN MODIFICADO QUIMICAMENTE
SOBRE A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA E APOPTOSE.
ESTUDO IN VIVO E IN VITRO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração - Periodontia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*

Coorientador: *Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili*

ARARAQUARA

2014

FABIANA DE ALMEIDA CURYLOFO

**EFEITO DE UM CURCUMIN MODIFICADO QUIMICAMENTE
SOBRE A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA E APOPTOSE.
ESTUDO IN VIVO E IN VITRO.**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

2º Examinador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

3º Examinador: Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata

Araraquara, 19 de março de 2014.

DADOS CURRICULARES

Fabiana de Almeida Curylofo

Nascimento	17 de outubro de 1988 – Ribeirão Preto, SP
Filiação	José Paulo Curylofo Onirson Seabra de Almeida Curylofo
2008 – 2011	Graduação em Odontologia Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP
2012 – 2014	Pós-Graduação em Periodontia Nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista – UNESP

DEDICATÓRIA

A Deus,

Que está presente em todos os momentos da minha vida. Obrigada Senhor, pela força em todos os momentos difíceis e por iluminar sempre os meus caminhos.

Aos meus pais, Nice e José Paulo

Meus maiores exemplos de respeito e honestidade. Obrigada por todo amor e dedicação, e também pelo incentivo e apoio incondicional para que eu pudesse chegar até aqui. Saber que tenho vocês por perto me torna mais forte para prosseguir. Amo vocês.

A minha irmã, Patrícia

Obrigada pelo incentivo e pelo apoio incondicional sempre. Eu nada seria sem sua amizade e carinho. Muito obrigada por tudo. Amo você.

Ao meu noivo, Vicente

Sei o quanto você torce por mim e o quanto você se sente realizado com as minhas conquistas. Conforta-me, saber que posso contar com você. Obrigada por trilhar os caminhos da vida sempre ao meu lado. Eu amo você.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Carlos Rossa Junior,

Obrigada por todos os ensinamentos que me transmitiu durante todo este período. Sua competência, honestidade e senso de justiça são admiráveis. Tenho você como um exemplo a seguir e sinto-me honrada por ter tido você como mestre.

A amiga e co-orientadora Morgana Rodrigues Guimarães Stabili,

Obrigada por todos os ensinamentos que você me transmitiu durante estes dois anos, pelo acolhimento e também por poder contar com você em todos os momentos. Tenho você como um exemplo de dedicação e competência. Agradeço ainda, pela amizade, que é sem dúvida, um dos bens mais preciosos que levarei daqui.

As amigas Sabrina Garcia de Aquino e Fernanda Godoy Rocha,

Sinto-me feliz e muito honrada por ter pessoas tão especiais ao meu lado. Obrigada por todos os ensinamentos e também pela amizade leal e sincera. Vocês fizeram toda diferença nos meus dias.

Aos amigos Lígia Araújo Barbosa e Marcell Costa de Medeiros,

Obrigada pelo convívio agradável no laboratório e por todo companheirismo e amizade.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de sua Diretora, Profa. Dra. **Andréia Affonso Barreto Montandon**, e Vice-Diretora, Prof^ª. Dra. **Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

A todos docentes do curso de Pós-Graduação e aos docentes da Disciplina de Periodontia: Prof. Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**, Profa. Dra. **Daniela Leal Zandim**, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, Prof. Dr. **José Eduardo Cezar Sampaio**, Profa Dra **Rosemary Adriana Chierici Marcantonio**, Profa Dra **Silvana Regina Perez Orrico**, pela formação e orientação.

A todos os amigos do curso de Pós-Graduação, em especial: **Adriana, Cássio, Fernanda Florian, Guilherme, Haline, Jackeline, Paula, Rafael, Sâmara, Suzane, Vinícius de Paiva e Vinícius Ibiapina** que percorreram comigo esse caminho, obrigada pelas experiências transmitidas e pelo convívio diário.

Ao Prof. Dr. **Paulo Sérgio Cerri** e a **Priscila Aparecida de Oliveira** pela disponibilidade em ajudar e pela fundamental colaboração neste trabalho.

A todos os funcionários e amigos da Disciplina de Periodontia: **Maria José, Claudia, Leandro, Isabella, Regina Lucia, Priscila e Antônio** pelo agradável convívio, atenção e dedicação sempre presentes.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara** e **José Alexandre** por toda a atenção, gentileza, e extrema paciência para ajudar.

A todos os funcionários da Biblioteca, pela dedicação e colaboração.

A CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual não poderia realizar este trabalho.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina. "

(Cora Coralina)

Curylofo FA. Efeito de um curcumin modificado quimicamente sobre a reabsorção óssea inflamatória e apoptose. Estudo in vivo e in vitro. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

Curcumin (diferuloylmethane) é um composto polifenólico com efeito antiinflamatório e capacidade de prevenir a atividade osteolítica verificados em modelos in vitro e in vivo. No entanto, uma importante limitação no uso do curcumin são suas pobres propriedades farmacológicas, incluindo absorção e biodisponibilidade. Assim, é de grande interesse a síntese de análogos do curcumin com características bioquímicas que favoreçam suas propriedades farmacológicas, mantendo as características de segurança e efetividade. O objetivo foi avaliar o efeito de composto sintético análogo ao curcumin (CMC 2.24) sobre o processo inflamatório e osteoclastogênese em modelo de doença periodontal in vivo. A doença periodontal foi induzida em ratos por meio de injeção de 30 ug de LPS de *Escherichia coli*, realizadas 3x/semana durante 2 semanas. Os controles, contralaterais, receberam injeções do mesmo volume do veículo de diluição do LPS (PBS). A administração de CMC (30mg/kg) e curcumin (100mg/kg) foram feitas via intragástrica (gavagem oral) diariamente, durante 15 dias. A expressão de fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), indicativa de diferenciação osteoclástica, foi avaliada por meio de imunohistoquímica, a proporção de células inflamatórias e conteúdo de colágeno, em cortes corados com H/E, por estereometria, a fragmentação do DNA celular indicativa de apoptose foi avaliada por método TUNEL e a reabsorção óssea por análise de microtomografia computadorizada. Nos experimentos in vitro, células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6, foram estimuladas com RANKL e tratadas com curcumin e CMC em concentração de 10µM, em diferentes períodos. O número de osteoclastos foi avaliado pela visualização do anel de actina, e a expressão

gênica de MMP-9, indicativa de atividade osteoclástica, foi avaliada por RT-qPCR. De acordo com os resultados, tanto CMC quanto curcumin reduziram significativamente o infiltrado inflamatório ($p < 0.05$) e aumentaram a proporção de fibras colágenas nos tecidos gengivais ($p < 0.05$), em comparação ao controle-veículo. CMC, mas não curcumin, diminuiu significativamente ($p < 0.05$) a quantidade de células TRAP positivas e a perda óssea alveolar; porém apenas curcumin reduziu significativamente ($p < 0.05$) o número de células apoptóticas (TUNELpositivas). In vitro, tanto CMC quanto curcumin inibiram a diferenciação osteoclástica induzida por RANKL ($p < 0.05$), independentemente do momento em que CMC e/ou curcumin foram adicionados às culturas. No entanto, apenas CMC reduziu significativamente ($p < 0.05$) a expressão de MMP-9 nestas culturas induzidas por RANKL. Estes resultados sugerem que curcumin e CMC apresentam diferenças em seus efeitos biológicos relacionados à reabsorção óssea inflamatória neste modelo experimental de doença periodontal. Concluímos que CMC, mas não curcumin, inibe significativamente a reabsorção óssea inflamatória por um mecanismo que pode envolver a modulação da atividade de osteoclastos.

Palavras-chave: Periodontia; Curcumina; Reabsorção óssea.

Curylofo FA. Effect of a novel chemically modified curcumin in inflammatory bone resorption and apoptosis. In vivo and in vitro study. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

Curcumin (diferuloylmethane) is a polyphenolic compound with anti-inflammatory properties and the ability to prevent the osteolytic activity both in vitro and in vivo models. The clinical use of curcumin is limited by its poor pharmacological properties, including absorption and bioavailability. This justifies the interest on the synthesis of curcumin analogues with improved pharmacological properties that retain both safety and biological properties of the natural compound. The aim was to evaluate the effect of a curcumin synthetic analogue (CMC 2.24) on RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and on inflammatory-driven bone resorption in a periodontal disease model in vivo. Periodontal disease was induced in rats by injections of LPS from *Escherichia coli* (30 ug/injection) directly on the gingival tissues, performed 3x/week during 2 weeks. The opposite site (controls) received injections of the same volume of vehicle (PBS). CMC (30 mg/kg) and curcumin (100 mg/kg) were administered by oral gavage daily, during this 2 week experimental period. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) expression, which is indicative of osteoclast differentiation was assessed by immunohistochemistry, bone resorption was measured by microCT and the proportion of inflammatory cells and collagen was assessed by stereometry on H/E-stained section. Apoptosis was assessed in the gingival tissues and alveolar bone by TUNEL staining. Bone marrow stromal cells from C56BI/7 mice were stimulated with RANKL in the presence of M-CSF and treated with 10 μ M of curcumin or CMC 2.24 at different time points over a 6-day period. The number of the osteoclasts identified by actin-ring formation was counted and gene expression of MMP-9, indicative of osteoclast activity, was assessed by RT-qPCR. Both

curcumin and CMC significantly reduced the inflammatory infiltrate ($p < 0.05$ vs vehicle control); however only CMC significantly increased the proportion of collagen fibers in gingival tissues ($p < 0.05$ vs vehicle control). CMC, but not curcumin, decreased the number of TRAP positive cells ($p < 0.05$) and the alveolar bone loss ($p < 0.05$); however only curcumin reduced the number of TUNEL positive cells ($p < 0.05$). In vitro, both CMC and curcumin decreased the number of osteoclasts ($p < 0.05$); but only CMC reduced MMP-9 gene expression ($p < 0.05$). The data suggests that although curcumin and CMC have different biological mechanisms of action, both presented promising therapeutic properties in the treatment of inflammatory diseases, due to inhibition of inflammatory responses and improved healing process. However, only CMC was effective in reducing inflammatory-driven bone resorption in this experimental model.

Keywords: Periodontics; Curcumina; Bone resorption

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1 - proteína ativadora-1

Bcl-2 - células B de linfoma-2

BSA - albumina sérica bovina

COX-2 - ciclooxigenase-2

DMSO - dimetilsulfóxido

HEpG2 - células hepatocelulares

IL - interleucina

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

LPS - lipopolissacarídeos

M-CSF - fator estimulador de colônia de macrófagos

MCP-1 - proteína quimiotática de monócitos-1

MIP-1 α - proteína inflamatória macrofágica

MMP-9 - metaloproteinase de matriz-9

NF- κ B - fator de transcrição nuclear kappa B

NO - óxido nítrico

PMA -13-acetato-12-myristate-forbol

PEZBIN - inibidores poli-enólicos que se ligam a zinco

RANK - receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL - ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

ROS - produtos de oxigênio reativo

SPF - animais livres de patógenos específicos

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TNF- β - fator de necrose tumoral beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Curcumin: características e atividades biológicas.....	18
1.3 Curcumin como modulador do processo apoptótico.....	25
1.4 Curcumin quimicamente modificado (CMC) e suas perspectivas terapêuticas na doença periodontal.	28
2 PROPOSIÇÃO	32
3 MATERIAL E MÉTODO	34
3.1 Obtenção e manutenção dos animais.....	35
3.2 Administração dos compostos e indução da doença periodontal	35
3.3 Eutanásia dos animais, obtenção de amostras e delineamento experimental	36
3.4 Estereometria	38
3.5 Imunohistoquímica.....	39
3.6 Método TUNEL	41
3.7 Microtomografia computadorizada (μCT)	43
3.8 Obtenção das culturas celulares primárias.....	44
3.9 Viabilidade Celular	45
3.10 Experimentos de osteoclastogênese.....	45
3.11 Extração de RNA total, Transcrição reversa e PCR em tempo real	46
3.12 Análise Estatística.....	47
4 RESULTADO	48
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO.....	71

7 REFERÊNCIAS	73
ANEXO.....	82

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Curcumin: características e atividades biológicas

Curcumin (diferuloylmethane) é um polifenol hidrofóbico de cor amarela derivado do rizoma seco de uma planta, *Curcuma longa*, pertencente à família *Zingiberaceae* (Shehzad et al.⁷⁸, 2013) e é amplamente utilizado na culinária como agente aromatizante e colorante, principalmente no sudeste da Ásia (Anand et al.⁵, 2007).

Curcumin, apresenta-se instável em pH básico, possui baixo peso molecular (368,37) e ponto de fusão de 183 ° C e em espectrofotometria de luz seu pico máximo de absorção ocorre em 420nm. Devido a sua natureza hidrofóbica, curcumin é mais solúvel em etanol, dimetilsulfóxido (*dimethyl sulfoxide*, DMSO) ou em acetona do que em veículos aquosos, além de apresentar-se instável na presença de luz (Sharma et al.⁷⁵, 2005). Em relação a seus efeitos adversos, a administração oral de curcumin em doses de 1,2 a 2,1g durante 2 a 6 semanas foi avaliada em pacientes com artrite reumatóide e não causou nenhuma toxicidade (Elmore et al.²¹, 2007) . Em outro estudo, pacientes com lesões pré-malignas toleraram sem efeitos adversos notáveis a ingestão de doses diárias de até 12g durante 3 meses a (Aggarwal et al.², 2009). Poucos são os relatos sobre os efeitos adversos relacionados à ingestão de curcumin, os quais foram detectados em uma minoria dos pacientes e incluíram apenas distúrbios gastrointestinais leves, como náusea e diarreia, sem, no entanto, haver relação com a dose ingerida (Epstein et al.²², 2010).

Devido às suas múltiplas ações biológicas, incluindo ações antiinflamatória, antioxidante, antiangiogênica, imunomodulatória, citotóxica, antimicrobiana e antiapoptótica, a aplicação terapêutica de curcumin vem sendo avaliada em modelos pré-clínicos e estudos clínicos de várias doenças (Maheshwari et al.⁵⁴, 2006; Sharma et al.⁷⁵, 2005). As doenças periodontais são caracterizadas por níveis aumentados de mediadores inflamatórios como citocinas, fatores quimiotáticos e fatores crescimento, sintetizados a partir da ativação de

vários tipos celulares durante o processo inflamatório desencadeado, mantido e modulado por interações microbiota-hospedeiro. Assim, a liberação prolongada ou excessiva destes mediadores inflamatórios pode causar a degradação de tecidos mineralizados e não-mineralizados. Com o objetivo de reduzir uma resposta exacerbada do hospedeiro, morte celular programada (apoptose) é iniciada e é fundamental para a resolução do processo inflamatório (Serhan et al.⁷³, 2007), pois uma resolução ineficiente ou ausente pode contribuir para persistência da inflamação, levando ao surgimento de doenças crônicas como a artrite reumatóide (Filep et al.²⁴, 2009).

Recentemente, os efeitos pró-apoptóticos do curcumin em condições como o câncer têm sido avaliados, após tratar células de câncer de fígado com o composto, houve inibição significativa da proliferação celular de maneira dose- e tempo-dependente, demonstrando que o tratamento com curcumin inibiu a proliferação e reduziu a viabilidade das células quando comparado ao controle (sem tratamento). Neste estudo, o aumento da proporção de células em apoptose foi induzido por meio da modulação da via extrínseca, particularmente, pela inibição de células B de linfoma-2 (*B-cell lymphoma 2*, Bcl-2) e ativação de caspase -3 (Tian-Yu et al.⁸³, 2013). Dai et al.¹⁶ (2013) também avaliaram os efeitos pró-apoptóticos do curcumin sobre células de câncer de fígado (*human liver cancer cell line*, HEPG2), e verificaram que a atividade de caspase-3 foi aumentada com o tratamento com curcumin, provocando aumento de células em apoptose.

Existem evidências que curcumin inibe, *in vitro*, a expressão de vários mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), interleucina-8 (*interleukin 8*, IL-8), interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12), proteína inflamatória macrofágica 1-alfa (*macrophage inflammatory protein-1 alpha*, MIP-1 α), metaloproteinase de matriz-9 (*matrix metalloproteinase-9*, MMP-9), óxido nítrico (*nitric oxide*, NO), ciclooxigenase-2 (*cyclooxygenase-2*, COX-2) em diversos

tipos celulares (Lantz et al.⁵¹, 2005; Surh et al.⁸¹, 2002; Saja et al.⁷², 2007; Shakibaei et al.⁷⁷, 2007; Brouet et al.¹³, 1995; Swarnakar et al.⁸², 2005; Abe et al.¹, 1999). Como o desequilíbrio na expressão destes mediadores pró-inflamatórios está estreitamente relacionado a várias condições e doenças caracterizadas pela degradação da matriz extracelular mineralizada e não-mineralizada, diversos estudos têm avaliado o efeito terapêutico do curcumin em condições como câncer (Sharma et al.⁷⁶, 2001; Sharma et al.⁷⁴, 2004; Garcea et al.²⁸, 2004), artrite reumatóide (Deodhar et al.¹⁷, 1980), doença de Crohn (Holt et al.⁴¹, 2005), doença intestinal inflamatória (Bundy et al.¹⁵, 2004), colite (Hanai et al.³⁵, 2006), psoríase (Heng et al.³⁸, 2000) e, mais recentemente, em modelo in vivo de doença periodontal (Guimaraes et al.³², 2012; Guimaraes, et al.³³, 2011).

Em relação às propriedades antiinflamatórias do curcumin, estas parecem ser mediadas pela modulação de vias de sinalização e fatores de transcrição, especialmente como o fator de transcrição nuclear kappa B (*factor nuclear kappa B*, NF-kB) (Kim et al.⁴⁹, 2012) que desempenha um papel importante na resposta imune inata (Hoffmann et al.⁴⁰, 1999) e em condições inflamatórias crônicas (Ghosh et al.³⁰, 1998).

Apesar da variedade de mecanismos biológicos e evidências sugerindo que curcumin tem excelente potencial para utilização terapêutica como agente modulador da resposta do hospedeiro, grande parte da inconsistência dos resultados e limitações na eficácia do curcumin in vivo são atribuídas à sua má solubilidade em veículos aquosos, baixa taxa de absorção no trato gastrointestinal e curta meia-vida do composto na circulação (Anand et al.⁵, 2007). Em um dos primeiros estudos publicados sobre a ação do curcumin, 1g/kg de curcumin foi administrado via oral a ratos, constatou-se que aproximadamente 75% da dose era rapidamente excretada pelas fezes (Wahlstrom et al.⁸⁸, 1978). Após a administração oral de curcumin em doses de 500 a 12.000 mg/dia a vinte quatro pacientes voluntários saudáveis, o nível sérico deste composto foi avaliado uma, duas e quatro horas após a finalização da dose

testada. Em apenas dois dos pacientes que ingeriram doses de 10.000 e 12.000 mg foram encontrados vestígios de curcumin nos três períodos avaliados, nos demais, níveis séricos de curcumin não foram detectados (Lao et al.⁵², 2006).

Devido à sua natureza hidrofóbica, após administração oral em modelos animais e em humanos, curcumin parece ser metabolizado por conjugação e redução, levando à formação de sulfatos e glucuronídeo de curcumin no fígado e no intestino o que torna este composto polifenólico biologicamente inativo (Aggarwal, Sung³, 2009). Associações a outros compostos, como piperine, que é conhecido por ser inibidor da metabolização hepática e intestinal têm sido investigadas, além de outros adjuvantes como quercetin (Heeba et al.³⁷, 2012), genistein e epigallocatechin gallate (EGCG) (Mirza et al.⁵⁸, 2013; Zhou et al.⁹³, 2013) para o tratamento de desordens inflamatórias e câncer. Novas formulações também têm sido propostas com o objetivo de aumentar o tempo de circulação e a resistência do composto aos processos metabólicos, como o uso de nanopartículas (Bisht et al.¹⁰, 2011), lipossomas, micelas, complexos de fosfolipídios e ainda o desenvolvimento de compostos análogos do curcumin (Anand et al.⁵, 2007).

Enfim, existem relatos de variações importantes nas propriedades biológicas dos curcumins modificados quimicamente (CMCs), como alguns compostos mais potentes e outros menos efetivos em comparação ao composto natural (Anand et al.⁶, 2008; Bharti et al.⁹, 2004). A síntese dos CMCs é uma estratégia para a superação das limitações farmacocinéticas do composto natural, além da melhora das propriedades farmacocinéticas, os análogos cinéticos do curcumin podem também favorecer as propriedades antiinflamatórias, mantendo um padrão de segurança e ausência de citotoxicidade similar ao do composto natural.

1.2 Curcumin como modulador da resposta do hospedeiro

Curcumin pode modular mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento de doenças, incluindo fatores de transcrição, moléculas de adesão, além de mecanismos ligados a apoptose e moléculas envolvidas na sinalização intracelular (Ambili et al.⁴, 2005; Anand et al.⁵, 2007).

NF- κ B é um dos principais fatores de transcrição encontrado em mamíferos (Hoffman et al.⁴⁰, 1999; Bremner, Heirich¹¹ 2002), e participa da regulação de mais de 200 genes envolvidos com diversas funções celulares e, notoriamente, com inflamação (Pereira, Oakley⁶⁸, 2008). Este fator de transcrição parece desempenhar papel fundamental na resposta imune inata e em condições inflamatórias crônicas como artrite reumatóide, doença intestinal inflamatória, pancreatite, líquen plano, além das periodontites (Min et al.⁵⁷, 2013; Ardite et al.⁷, 1988; Liu et al.⁵³, 2013; Santoro et al.⁷¹, 2003; Kim et al.⁴⁹, 2012). De fato, Ambili et al.⁴ (2005) por meio de reação de imunohistoquímica, correlacionaram a presença de p50/p65 e I κ B em pacientes saudáveis e com periodontite crônica. A proporção de p50 e p65 nos tecidos periodontais foi significativamente maior em pacientes com periodontite crônica em comparação aos saudáveis e I κ B foi encontrado em apenas 5% dos tecidos periodontais com doença, o que sugere que os inibidores específicos de NF- κ B podem ter um papel relevante como terapia imunomodulatória desta condição.

A família de NF- κ B é composta por 5 membros, com combinações de homo e heterodímeros: NF- κ B1 (p50 e seu precursor p105), NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100), Rel A (p65), Rel B e c-Rel, os heterodímeros p50/p65 são considerados como a forma clássica ou canônica da ativação de NF- κ B. Na ausência de estímulos externos, os dímeros de NF- κ B estão inativos e isolados no citoplasma por proteínas inibidoras de κ B (I κ B α , β e γ) e por seus precursores inativos p100 e p105 (Pereira, Oakley⁶⁸, 2008). Isto impede, o reconhecimento do sinal da localização nuclear por NF- κ B, mantendo portanto, este fator de transcrição no

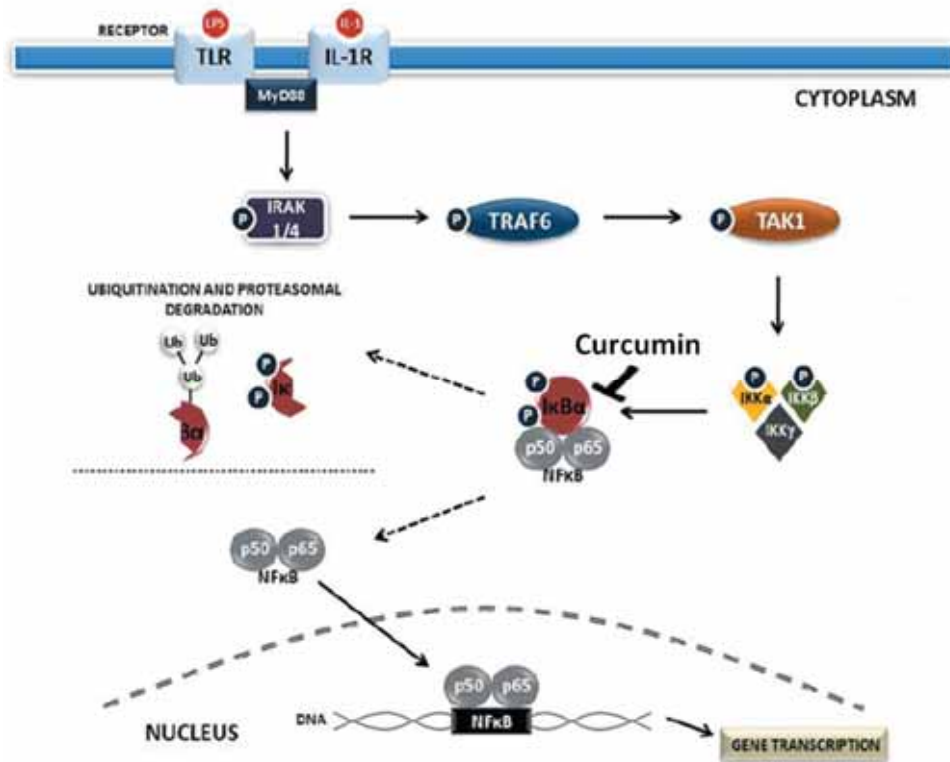
citoplasma. Frente a um estímulo celular, ocorre a fosforilação e degradação de I κ B, o que permite a translocação nuclear de NF- κ B. No núcleo, NF- κ B se liga a sítios regulatórios do DNA, para modular (ativar ou reprimir) a expressão do gene-alvo específico (Barnes et al.⁸, 1997).

A ativação de NF- κ B pode ocorrer rapidamente em resposta a inúmeros estímulos extracelulares incluindo bactérias, vírus, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, estímulos ultra-violeta e estresse oxidativo, os quais podem ativar a transcrição de genes pró-inflamatórios, COX-2 (*cyclooxygenase-2*, COX-2), iNOS (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) e Bcl2 (Viatour et al.⁸⁶, 2005). Esta ativação pode ocorrer pela via clássica (canônica) ou alternativa (não-canônica). A ativação da via clássica ocorre em resposta à liberação de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 ou em resposta a produtos bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS), já a ativação da via alternativa ocorre em resposta a CD40 e TNF- β (Hayden, Ghosh³⁶, 2004; Perkins et al.⁶⁹, 2006).

Kim et al.⁴⁸ (2011) avaliaram os efeitos do curcumin sobre produção de IL-6 por células RAW 264.7 estimuladas com LPS de *Prevotella intermédia*. Curcumin suprimiu a produção de IL-6 e não inibiu a degradação de I κ B α , porém bloqueou a subunidade p50 de NF- κ B. Além disso, atenuou a atividade de ligação entre p50 e p65 ao DNA, impedindo a transcrição de IL-6. Em outro estudo, após estímulo com IL-1 α e TNF- α em células da medula óssea, curcumin inibiu a ativação de NF- κ B e do fator de transcrição proteína ativadora-1 (*activating protein-1*, AP-1), que está envolvido em processos celulares de diferenciação, proliferação e apoptose. Esta inibição ocorreu ainda em células estimuladas com 13-acetato-12-myristate-forbol (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA) e água oxigenada (Bremner et al.¹¹, 2002).

O mecanismo pelo qual curcumin inibe NF-kB ocorre pelo bloqueio da fosforilação de I κ B α e p65, prevenindo a degradação de I κ B e,consequentemente, impedindo que ocorra a translocação nuclear da subunidade p65 de NF-kB (Aggarwal et al.², 2006) (Figura 1).

Figura 1 - Representação da via da NF-kB (adaptado de Souza et al.⁸⁰, 2012).



Desta forma, por ser um fator chave na sinalização da resposta imune e inflamatória, a via de NF-kB é um importante alvo para o desenvolvimento de fármacos (Oliveira et al.⁶³, 2012), os quais buscam inibir as proteínas quinases que podem fosforilar I κ B, prevenindo sua degradação e liberação/ativação de NF-kB ou ainda bloquear sua atividade impedindo que NF-kB se ligue ao DNA por meio de interferência na atividade de deacetilases, ou até mesmo impedindo que haja a translocação de seus dímeros (p50/p65) para o núcleo (Souza et al.⁸⁰, 2012).

1.3 Curcumin como modulador do processo apoptótico

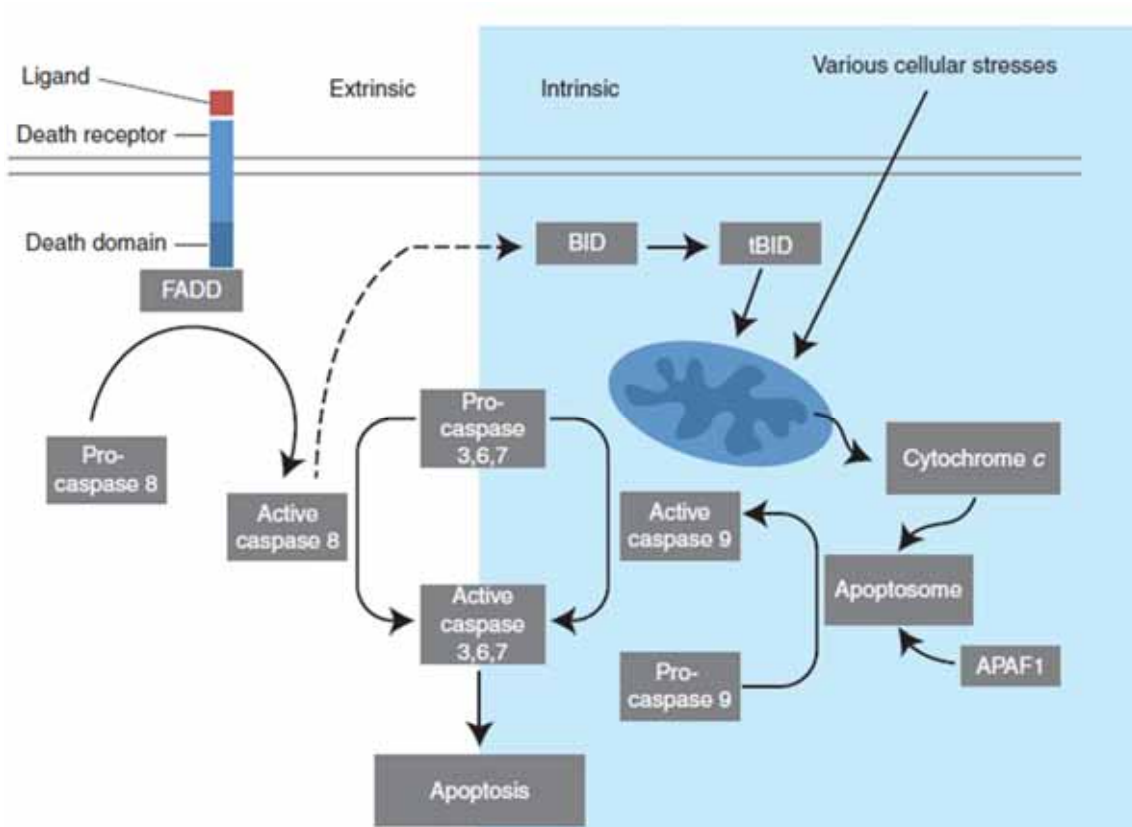
Apoptose é um processo coordenado e dependente de energia e que muitas vezes envolve a ativação de um grupo de cisteína-proteases chamado ‘caspases’, as quais estão envolvidas em uma cascata complexa de eventos que iniciam e culminam em morte celular. Várias são as alterações morfológicas que podem ser observadas durante apoptose. No processo inicial ocorre o encolhimento celular e picnose, que é o resultado da condensação da cromatina, as organelas tornam-se mais próximas e o citoplasma fica denso tornando a célula menor. Em seguida ocorre a fragmentação do núcleo e subsequentemente da célula em corpos apoptóticos, que serão fagocitados por macrófagos (Elmore et al.²¹, 2007).

Existem duas vias principais para que a apoptose ocorra: a via do receptor de morte (ou extrínseca) e a via mitocondrial (ou intrínseca). Porém, há relatos que estas duas vias se relacionam, pois moléculas que são relacionadas a uma via também podem influenciar a outra (Igney, Krammer⁴², 2002).

Apoptose extrínseca é desencadeada por sinais extracelulares que ativam os receptores de morte (*death receptors*, DRs) e são membros desta via: a família do fator de necrose tumoral (TNF), que inclui receptor TNF-1 (TNFR1), CD95 (também conhecido como FAS ou APO-1), receptor de morte 3 (DR3), ligante do receptor TNF-1 relacionado a indução da apoptose (TRAIL-R1, também conhecido como DR4) e TRAIL-R2 (ou DR5, em humanos). Em termos genéricos, a ativação destes receptores por sinais externos culminam com a ativação de caspases. Atualmente, as caspases são classificadas de acordo com seu papel no processo de apoptose (caspase -3, -6, -7, -8 e -9 em mamíferos) e na inflamação (caspase -1, -4, -5 e -12 em humanos). Já as funções das caspases -2, -10 e -14 ainda são pouco conhecidas. As caspases envolvidas na apoptose são classificadas ainda de acordo com seu mecanismo de ação em caspases iniciadoras (caspases -8 e -9) e executoras (caspases -3, -6 e -7) (McIlwain et al.⁵⁶, 2013) (Figura 2).

Já a via intrínseca (ou mitocondrial) depende de fatores relacionados à mitocôndria. Esta via é ativada por uma vasta gama de estresses celulares, incluindo a ausência de fatores de crescimento, rompimento do citoesqueleto, danos ao DNA, o acúmulo de proteína desdobrada, hipóxia, entre outros. A partir da permeabilização da membrana, ocorre a liberação de fatores pró-apoptóticos para o citosol (por ex., citocromo c) o que leva a ativação das caspases executoras (Brenner et al.¹², 2009).

Figura 2 - Representação das vias extrínseca e intrínseca do processo de apoptose (McIlwain et al.⁵⁶, 2013).



Especula-se que o curcumin poderia promover a resolução da inflamação devido à sua capacidade de acelerar a apoptose de neutrófilos e, assim, inibir a produção de produtos de oxigênio reativo (*reactive oxygen species*, ROS) e outros mediadores inflamatórios por estas células (Jancinová et al.⁴⁴, 2011; Jancinová et al.⁴³, 2012; Srivastava et al.⁷⁹, 2011). De fato,

Jancinová et al.⁴⁴ (2011) em estudo *in vitro*, comprovaram os efeitos pró-apoptóticos do curcumin, pois o tratamento com o composto promoveu aumento da apoptose de neutrófilos bem como da atividade de caspase-3, além disso curcumin reduziu a formação de ROS pelas células; esses resultados concordam com o experimento *in vivo* realizado em modelo de artrite reumatóide, no qual se observou uma diminuição do número de neutrófilos presentes no sangue periférico dos animais tratados com curcumin em comparação ao grupo controle.

Especificamente nas doenças periodontais, os estudos que avaliaram o processo apoptótico nos tecidos gengivais não permitem uma conclusão clara se este processo está aumentado ou reduzido na situação de doença. Um estudo realizado com amostras de humanos demonstrou que a quantidade de células apoptóticas detectadas nas biópsias dos pacientes com periodontite raramente excedeu 10%. Poucos neutrófilos TUNEL e caspase-3 positivos foram identificados nos tecidos gengivais com doença em comparação aos tecidos saudáveis. A presença da proteína anti-apoptótica e pró-sobrevivência celular Bcl-2 foi observada tanto nos sítios saudáveis quanto nos sítios doentes; porém, um número maior de células Bcl-2-positivas foi observado no infiltrado inflamatório dos pacientes com periodontite. A expressão do receptor de FAS e de seu ligante (FASL), que é um indutor de apoptose, foi observada apenas nos sítios periodontais com doença (Gamonal et al.²⁶, 2001), o que pode indicar uma acentuação do processo apoptótico com a inflamação.

Outras evidências indicam que a apoptose de outros tipos celulares pode ter influência sobre as doenças periodontais, como por exemplo, a apoptose de células epiteliais, que pode contribuir para a perda da função da barreira epitelial (Dickinson et al.¹⁸, 2011). Além disso, a perda de fibroblastos gengivais por apoptose contribui para a progressão da doença periodontal e pode estar relacionada à perda de inserção do tecido conjuntivo (Zappa et al.⁹⁰, 1992).

A apoptose é um processo fisiológico que contribui para homeostase no microambiente periodontal, e como existem evidências de que o composto natural (curcumin) testado pode modular este processo, incluímos neste trabalho a avaliação do processo apoptótico, uma vez que a modulação deste processo pode alterar significativamente o microambiente, em termos das proporções de diferentes tipos celulares e presentes e, conseqüentemente, dos mediadores biologicamente ativos capazes de modular não apenas a resposta inflamatória, mas também processos como a osteoclastogênese.

1.4 Curcumin quimicamente modificado (CMC) e suas perspectivas terapêuticas na doença periodontal.

CMC utilizado nesta proposta apresenta baixa toxicidade e potente ação inibitória de metaloproteases de matriz (*matrix metalloproteinases*, MMPs) (Zhang et al.⁹², 2012). Estas propriedades justificam uma avaliação deste composto em modelos in vivo. Os CMCs fazem parte de uma classe de compostos inibidores poli-enólicos e que se ligam a zinco (*polyenolic zinc-binding inhibitors*, PEZBIN) capazes de inibir tanto MMPs quanto citocinas. Estes compostos foram desenvolvidos como análogos sintéticos 1,3-bi cetônicos, com base no papel fundamental da região β -bi cetônica ligante a zinco para os efeitos de modulação da resposta do hospedeiro por doses não-antimicrobianas das tetraciclinas (Golub et al.³⁴, 1992; Vernillo et al.⁸⁵, 1994).

Estudos anteriores identificaram que estes novos compostos (CMCs) podem ser mais potentes do que o curcumin natural (não modificado) na inibição da atividade de MMPs in vitro (IC50 do composto CMC 2.5 para inibição in vitro da atividade de MMP-9 é 16 μ M, em comparação à IC50 de 29 μ M do curcumin natural) (Zhang et al.⁹¹⁻⁹², 2012). Esta maior potência do CMC foi confirmada em estudo in vitro utilizando monócitos humanos estimulados com LPS bacteriano. Nestes experimentos, curcumin natural inibiu de forma

significativa a produção de TNF- α em concentrações de 50 e 100 μ M, as quais foram associadas com significativa citotoxicidade causada pela precipitação do composto. Por outro lado, em uma concentração não-citotóxica de 2 μ M, CMC 2.5 inibiu a produção de TNF- α , IL-1 β , proteína quimiotática de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) e IL-6 em 63%, 41%, 74% e 30%, respectivamente (Zhang et al.⁹², 2012).

Este mesmo composto (CMC 2.5) foi avaliado em modelo in vivo de diabetes tipo I em ratos com significativa inibição da atividade de MMP-2, -8 e -9 no soro, derme e tecidos gengivais. Nestes experimentos, CMC 2.5 não teve nenhum efeito na glicemia, indicando que a inibição de MMPs observada não é devida à melhora do controle metabólico do diabetes induzido nos animais (Zhang et al.⁹², 2012).

Mais recentemente, foram sintetizados CMCs 'aminas', que apresentam um grupo fenil-aminocarbonil no Carbono 4. Estes novos CMCs demonstraram maior hidrossolubilidade do que o composto natural (curcumin não modificado) e também em comparação a versões anteriores dos CMCs (por ex., CMC 2.5). A potência de diferentes versões de CMCs aminados como inibidores da atividade de diversas MMPs foi avaliada in vitro, e estes compostos mostraram-se significativamente mais potentes do que CMC 2.5 e CMC 2.24, em particular, apresentou os menores valores de IC50 (Zhang et al.⁹¹⁻⁹², 2012). Estudos em andamento de nossos colaboradores utilizando um modelo de destruição inflamatória de cartilagem in vitro (degradação de 35S-proteoglicano induzida por IL-1 β) demonstraram que CMC 2.24 inibiu a destruição da cartilagem em 96% em comparação ao controle veículo após 72 h, enquanto que tanto curcumin natural (não modificado) quanto CMC 2.5 não tiveram qualquer efeito e, neste sentido, não foram diferentes do controle veículo (Elburki et al.²⁰, 2012).

É importante destacar que compostos imunomoduladores eficientes e de baixa toxicidade são de grande interesse para aplicações terapêuticas em diversas doenças e

condições associadas à inflamação e resposta imune. Evidências da literatura e nossos próprios experimentos anteriores com o curcumin 'natural' e CMC 2.24 indicam que o curcumin tem significativo efeito na inibição da inflamação e reabsorção óssea associadas à doença periodontal. Algumas das limitações farmacológicas do curcumin 'natural' justificam o desenvolvimento dos CMCs, os quais, como qualquer novo composto, necessitam de uma avaliação cuidadosa em experimentos *in vitro* e *in vivo* (Guimaraes et al.³²⁻³³, 2011,2012; Zhou et al.⁹⁴, 2013).

As doenças periodontais representam uma condição de elevada prevalência, constituindo-se na doença lítica do osso mais comum em humanos. É uma das principais causas de perda dental e apresenta mais severidade em indivíduos portadores de condições sistêmicas associadas às alterações da resposta imune, representando uma carga infecciosa/inflamatória adicional em indivíduos com resistência já comprometida, como por exemplo, em portadores de diabetes. Esta inflamação crônica localizada juntamente com a persistência de um biofilme microbiano como desafio infeccioso estão, possivelmente, associados à etiologia e agravamento de condições sistêmicas de elevada morbidade e mortalidade, particularmente doenças cardiovasculares (Kebuschull et al.⁴⁷, 2010). Assim, além de sua própria relevância como condição que afeta a saúde humana, a atenuação da inflamação associada às doenças periodontais pode ter reflexos ou impactos sistêmicos positivos. Outro aspecto importante a considerar é o fato das informações derivadas dos estudos utilizando o modelo de doença periodontal serem de interesse para várias outras condições associadas com reabsorção óssea mediada pela resposta imune-inflamatória, como artrite reumatóide e osteoartrite (Garcia de Aquino et al.²⁹, 2009).

Em que pesem a intensidade e qualidade da pesquisa relacionada às doenças periodontais, sua etiologia, patogênese e tratamento, não ocorreram melhoras significativas na abordagem terapêutica-padrão das doenças periodontais nos últimos 50 anos; sendo uma das

possíveis exceções representada pelo desenvolvimento e introdução do uso de doses não antimicrobianas de doxiciclina (Periostat), com atividade de inibição de MMPs e aprovado como terapia adjunta ao tratamento periodontal convencional por agências regulatórias americanas, canadenses e européias (Elavarasu et al.¹⁹, 2012).

As perspectivas terapêuticas do curcumin na doença periodontal in vivo foram demonstradas em experimentos anteriores de nosso grupo de pesquisa, em que a administração oral de curcumin resultou em significativa redução do infiltrado inflamatório e potente inibição de diversos mediadores inflamatórios, incluindo IL-6, TNF e PGE2-sintase (hômologo murino de COX-2) (Guimaraes et al.³², 2012). No entanto, surpreendentemente, não verificamos efeito significativo do curcumin na modulação da reabsorção óssea in vivo (Guimaraes et al.³², 2012). Este achado se correlacionou diretamente com a ausência de inibição da expressão de RNAm de RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL*) no tecido gengival em nosso modelo experimental, mas é particularmente intrigante considerando as evidências de que o curcumin inibe, in vitro, a diferenciação osteoclástica de células precursoras, tanto de roedor (Bharti et al.⁹, 2004; Oh et al.⁶², 2008) quanto de humanos (von Metzler et al.⁸⁷, 2009); além de induzir apoptose em osteoclastos, possivelmente, por meio da inibição de NF-kB (Ozaki et al.⁶⁵, 1997; Ozaki et al.⁶⁴, 2000). Além disso, existem evidências de um efeito protetor do curcumin no tecido ósseo em modelos animais de osteoporose pós-menopausa (French et al.²⁵, 2008) e diabetes (Hie et al.³⁹, 2009).

Assim, este estudo foi proposto com objetivo de explorar os efeitos do CMC 2.24 na modulação da reabsorção óssea inflamatória, com base nas evidências indicando maior potência biológica deste composto e propriedades farmacológicas superiores do CMC 2.24 em comparação ao composto natural (curcumin).

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

A hipótese deste trabalho é que a administração oral de CMC 2.24 inibe a reabsorção óssea inflamatória em modelo experimental de doença periodontal induzida por LPS. Como hipóteses secundárias, este efeito inibidor da reabsorção óssea por CMC 2.24 é mediado por interferência direta na osteoclastogênese induzida por RANKL e também por modulação da apoptose de osteoclastos e células inflamatórias. Para avaliar estas hipóteses, os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1) Determinar, em modelo in vivo de doença periodontal experimental, a influência de CMC 2.24 na modulação da reabsorção óssea, aspectos histológicos, número de osteoclastos e apoptose em comparação ao composto natural (curcumin).
- 2) Avaliar os efeitos do CMC 2.24 na modulação da osteoclastogênese induzida por RANKL in vitro.

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Obtenção e manutenção dos animais

Foram utilizados 50 ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus Holtzman*) machos e adultos, com peso entre 150 e 200g. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) desta instituição, que aprovou o protocolo deste experimento (Anexo 1). Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno, em estante isoladora em condições SPF com temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (65–70%) controladas, além de ciclo de luz-escuro a cada 12 h. Receberam alimentação granulada (Labina/Purina) e água *ad libitum*, sendo pesados semanalmente.

3.2 Administração dos compostos e indução da doença periodontal

Curcumin (C1386, Sigma Chem Co.,) foi dissolvido em óleo de milho e CMC 2.24 (preparados e fornecidos graciosamente pelo grupo do Dr. Lorne M. Golub, Department of Oral Biology and Pathology, State University of New York at Stony Brook) em carboximetilcelulose 2% e foram administrados aos animais via oral, diariamente, nas dosagens de 100 (curcumin) e 30 (CMC 2.24) mg/Kg de peso corporal, uma vez ao dia durante os 15 dias do experimento.

No dia seguinte ao início da administração do curcumin ou CMC 2.24, foi iniciada a indução da doença periodontal. Neste estudo, foi utilizado modelo de indução de doença periodontal por injeção de LPS na região palatina, utilizando como controle negativo a injeção do mesmo volume de tampão fosfato (PBS, sem Ca e Mg, pH 7.4), o veículo utilizado na diluição do LPS.

A anestesia geral foi induzida e mantida pela inalação de uma mistura de isofluorano/oxigênio. Três vezes por semana foram realizadas injeções de 30 μg de LPS

purificado de culturas de *Escherichia coli* (strain 055:B5, Sigma Chem Co.,) diluído em PBS (concentração de 10 mg/mL). Em cada injeção foi utilizado um volume total de 3 µL, injetados no tecido gengival palatino, próximo a margem gengival entre 1°. e 2°. molares superiores utilizando uma microseringa do tipo Hamilton com agulha customizada de *gauge* 30 e comprimento de 0.6 cm (Agilent). Em um período de 2 semanas (15 dias) foram realizadas 6 injeções, num total de 180 µg de LPS aplicados em cada sítio. Os controles, contralaterais, receberam injeções do mesmo volume (3 µL) do veículo de diluição do LPS (PBS) (Tabela 1). Para efeito de padronização do procedimento experimental, as injeções de LPS foram sempre realizadas no lado esquerdo do animal e o lado direito utilizado para as injeções do veículo.

Tabela 1 - Grupos experimentais segundo o composto administrado sistemicamente. Todos os animais receberam injeções de LPS e PBS no tecido gengival de forma contralateral.

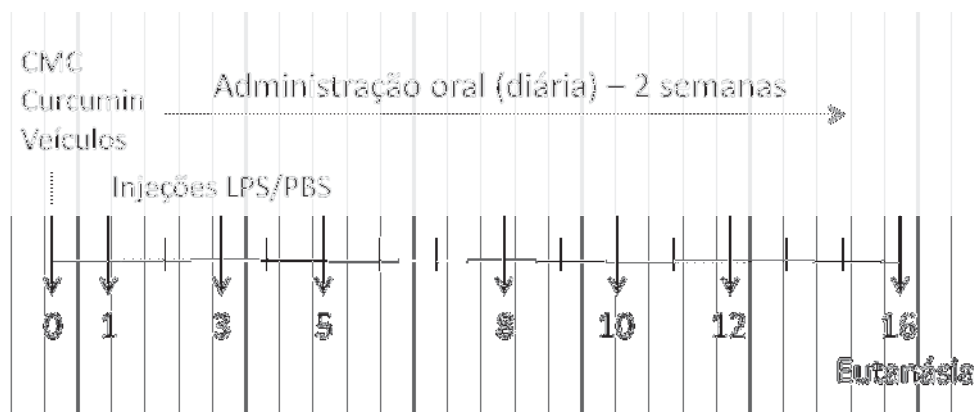
<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Tratamento</i>
Controles	10	Não receberam
Controle CMC	10	Carboximetilcelulose 2%
CMC 2.4	10	30 mg/Kg
Controle curcumin	10	Óleo vegetal
Curcum in	10	100mg/kg

3.3 Eutanásia dos animais, obtenção de amostras e delineamento experimental

Após 15 dias do início da indução de doença periodontal e 16 dias após o início da administração oral dos compostos, os animais foram sacrificados. O período de 15 dias foi selecionado por ser representativo da doença instalada em nível moderado/avançado de

severidade, como indicado por estudo anterior de nosso grupo de pesquisa (Garcia de Aquino et al.²⁹, 2009). A cronologia do experimento está representada na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do desenho experimental do experimento in vivo.



Imediatamente após a eutanásia, a maxila de cada animal foi removida e separada em duas hemimaxilas. O tecido mole gengival de um tamanho aproximado de 1.5 x 3 mm na área em que foram realizadas as injeções foi cuidadosamente dissecado de 5 amostras de cada condição experimental e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo armazenado a -80°C até o momento da extração de proteínas totais. Todas as peças (hemimaxilas) foram utilizadas para a análise de microtomografia computadorizada (μ CT). Após o escaneamento no microtomógrafo, as 5 peças de cada condição experimental das quais não foram coletados os tecidos moles foram submetidas a processamento histológico de rotina para inclusão em parafina (como descrito a seguir) e utilizadas nas análises histológica e imunohistoquímica.

As peças para estereometria, imunohistoquímica e detecção de apoptose pelo método TUNEL foram fixadas em formol tamponado a 10% durante 48h e então desmineralizadas em solução de EDTA (0.5 M, pH 8.0) sob agitação à temperatura ambiente durante 2-3 meses (com troca da solução 3x/semana), e posteriormente foram incluídas em parafina. Cortes seriados de 5 μ m de espessura foram obtidos na direção vestibulo-lingual (plano frontal), e

montados em lâminas de vidro silanizadas. As lâminas destinadas à análise estereométrica do processo inflamatório receberam a coloração H/E.

3.4 Estereometria

A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz (Leica DM 2500, Wetzlar, Alemanha) na magnificação de 200 X. Esta técnica foi empregada nos cortes corados com hematoxilina e eosina (H/E) para avaliar a proporção e o número de componentes teciduais em um plano bidimensional por microscopia. Este procedimento permite a avaliação quantitativa do processo inflamatório nas proximidades da agressão, de acordo com o protocolo descrito por Odze et al.⁶¹ (1996). Com esta metodologia, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) de fibras colágenas e número de células inflamatórias (células mononucleares e neutrófilos) presentes no tecido gengival.

A fim de padronizar a região a ser quantificada para as fibras colágenas, uma reta de 400µm foi traçada por meio de software (Leica Application Suite 3.8, Wetzlar, Alemanha), a partir da porção mais apical do epitélio juncional do 1º molar superior em direção ao tecido conjuntivo palatino. Foi padronizada como região de interesse toda extensão do tecido conjuntivo que estivesse situada a partir do ponto final da reta traçada (Figura 6a). As imagens foram capturadas em magnificação de 200 X com auxílio de câmera fotográfica acoplada em microscópio de luz (Leica DM 2500, Wetzlar, Alemanha) e um total de 2 lâminas por animal e 2 cortes por dente, com distância de 100 µm entre eles, foi avaliado.

A quantificação de fibras colágenas foi feita com o auxílio de grades confeccionadas com a dimensão de 40 µm x 40 µm, com área de 1600 µm² (10 x 13 quadrados de 40 µm de lado). Estas grades foram posicionadas sobre as imagens digitalizadas dos cortes histológicos e foram contados 108 pontos coincidentes sobre as estruturas histológicas. Em seguida, foi

feita uma análise percentual de fibras colágenas em relação ao número total de pontos contados.

Para análise do infiltrado inflamatório, a região de interesse foi padronizada da mesma forma descrita anteriormente para as fibras colágenas, porém, a análise foi realizada por visualização direta em microscópio de luz (Leica DM 2500, Wetzlar, Alemanha). Foram contados 4 campos aleatórios em aumento de 600x e por meio de sua morfologia foram distinguidas células mononucleares e neutrófilos polimorfonucleares. A contagem foi feita por examinador “cego” para os grupos experimentais e previamente treinado. As lâminas de um mesmo grupo foram avaliadas duas vezes, com intervalo de tempo de 3 dias entre as avaliações, a fim de se certificar que os critérios morfológicos de identificação e os tipos celulares eram consistentes.

3.5 Imunohistoquímica

3.5.1 Fosfatase Ácida Tártaro-Resistente (TRAP)

Com o objetivo de verificar a presença de osteoclastos já diferenciados localizados nas proximidades do osso alveolar, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, reidratados em uma seqüência decrescente de álcool (100 a 70%) e posteriormente incubados por 30 minutos com solução de metanol com peróxido de hidrogênio 3% (9:1) para bloqueio da atividade de peroxidase endógena. Para bloquear interações não específicas do anticorpo primário, os cortes foram incubados com solução de bloqueio (X0909, Dako) por 10 minutos. Em seguida, após lavagem em água destilada, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal de cabra para marcação de células TRAP-positivas (sc-30833, Santa Cruz Biotechnology). O anticorpo primário foi diluído 1:100 em diluente de anticorpo (S3022, Dako) e deixado sobre os cortes por 18 h (*overnight*) a 4°C em um compartimento umidificado. A detecção do anticorpo primário foi feita com anticorpo secundário biotilado

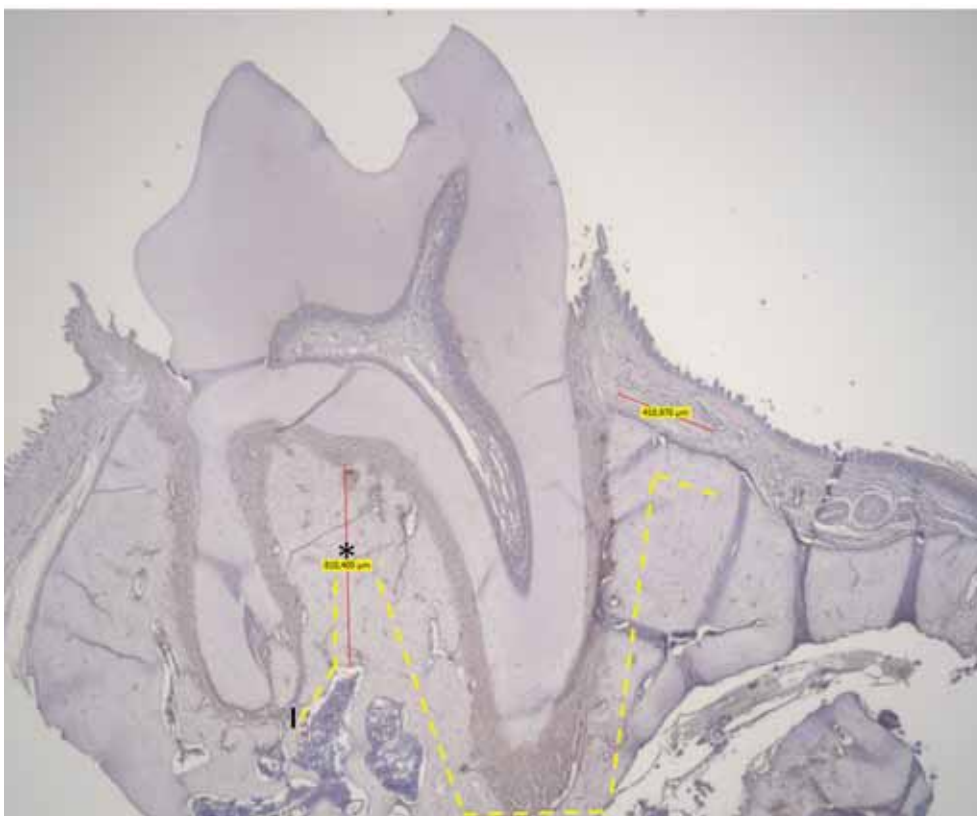
anti-cabra diluído 1:1 em diluente de anticorpo por 30 minutos, e a detecção da proteína-alvo foi feita pelo sistema DAB-streptavidina (LSAB2, Dako Cytomation). O controle negativo foi realizado substituindo o anticorpo primário por incubação de cortes em volume equivalente de BSA 2%. Ao final do protocolo de marcação, os cortes foram contracolorados com hematoxilina (S3309, Mayer's Hematoxylin, Dako) por 24 segundos, deixados secar a temperatura ambiente por 2 h, e em seguida recobertos com as lamínulas montadas com permount. Após 24 h, as imagens foram observadas e capturadas em microscópio de luz (Leica DM 2500, Wetzlar, Alemanha) na magnificação de 200 X, mantendo-se constante os parâmetros de captura da imagem (brilho, contraste, tempo de exposição).

Para quantificação de osteoclastos, foram contadas as células localizadas próximas ao osso alveolar e a área determinada para contagem foi estabelecida da seguinte forma (Figura 4):

- Uma reta de 400 µm foi traçada da porção mais apical do epitélio juncional em direção ao tecido conjuntivo palatino (considerando que as injeções de LPS e PBS foram feitas no tecido palatino e não na margem ou sulco gengival).
- O limite final da contagem foi estabelecido pela face vestibular da coroa do 1º molar superior.

A análise contagem do número de células TRAP-positivas nesta área de interesse foi feita por examinador treinado sem conhecimento dos grupos experimentais.

Figura 4 - Fotomicrografia mostrando corte de maxila submetido à reação de imunohistoquímica para TRAP e contra-corada com hematoxilina para detecção de osteoclastos. Foram contadas as células TRAP positivas situadas entre a superfície do osso alveolar propriamente dito e a metade do assoalho da fossa nasal (limite representado pelo asterisco), a partir de um ponto distante 400 μm do topo da crista óssea percorrendo-se toda extensão da raiz palatina e da raiz vestibular até o seu plano vestibular, representado pela porção vestibular da região mais apical da raiz vestibular (traçado em preto). As medidas foram determinadas por meio de um software (Leica Application Suite 3.8, Wetzlar, Alemanha).



3.6 Método TUNEL

Para detecção da fragmentação do DNA celular indicativa de apoptose nos cortes histológicos utilizamos o kit Apop-Tag Plus (Oncor, Gaithersburg, MD), conforme as instruções do fabricante. Esta técnica permite a detecção de quebras nas cadeias de DNA em células apoptóticas individuais através de uma marcação enzimática. O kit é capaz de detectar estágios precoces de fragmentação do DNA antes mesmo que o fragmento torne-se detectável no citoplasma, o que é especialmente interessante nos casos em que as células apoptóticas são rapidamente e eficientemente removidas, como nos casos de processos apoptóticos avaliados in vivo.

Esta técnica baseia-se na incorporação de nucleotídeos (d-UTP = 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com o corante fluorescente FITC (Isotiocianato de fluoresceína) na região livre 3'OH das quebras do DNA fita simples ou fita dupla. Esta reação é catalisada por uma enzima denominada *terminal deoxynucleotidyl transferase* que irá polimerizar os nucleotídeos modificados nas regiões de fragmentação do DNA. A incorporação de d-UTP fluoresceína é então amplificada por várias reações enzimáticas secundárias, podendo, desta forma, ser detectada por microscopia de fluorescência.

Após a marcação das células TUNEL-positivas, para visualização dos núcleos celulares e distinção das células TUNEL-negativas, os cortes foram incubados com o corante de DNA DAPI (F6057, Fluoroshield with DAPI, Sigma-Aldrich) e lamínula de vidro foi colocada sobre a lâmina.

A análise das células foi realizada por meio de microscópio de fluorescência (Evos fl, AMG Micro Group Inc.), utilizando dois filtros distintos: GFP/FITC para detecção da fluorescência correspondente ao comprimento de onda da cor verde que identifica as células apoptóticas (TUNEL-positivas), e DAPI para detecção da fluorescência correspondente ao comprimento de onda da cor azul, que identifica as células viáveis (TUNEL-negativas).

Duas diferentes localizações anatômicas da porção palatina do 1º molar foram analisadas para avaliar a presença de células TUNEL-positivas:

- Tecido gengival: células presentes no tecido conjuntivo em área situada a 400 µm do dente, a partir da porção mais apical do epitélio juncional, tomando como delimitação inferior a porção mais coronal do osso palatino (considerando que as injeções de LPS e PBS foram feitas no tecido palatino).
- Tecido ósseo: osteócitos localizados na crista óssea alveolar, adjacente ao dente (situados dentro de uma área de 200 µm x 200 µm, delimitada com auxílio do software do microscópio).

Um total de 2 cortes, com distância de 100 μm entre eles, e 4 animais por grupo foram utilizados e a quantificação de células foi feita por examinador “cego” para os grupos experimentais em aumento de 200 X.

3.7 Microtomografia computadorizada (μCT)

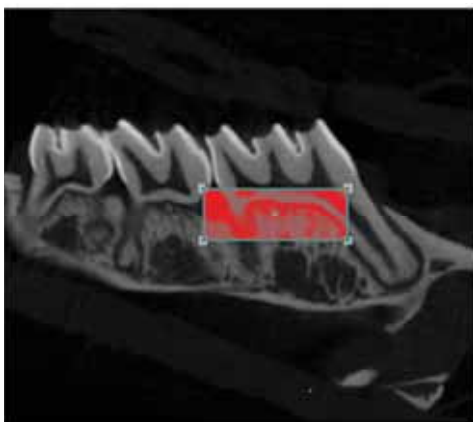
As peças destinadas a análise por microtomografia computadorizada foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas e então imersas e conservadas em etanol a 70% até o momento da análise, que foi realizada pela varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia computadorizada (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003). As imagens tridimensionais foram geradas pelo microtomógrafo SkyScan (projeto FAPESP 2009/54080-0), utilizando cortes de 18 μm (50Kv e 500 μ) e a escala de tons de cinza, as imagens obtidas pela projeção dos raios X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas pelo NRecon (SkyScan, versão 1.6.6.0) e reorientadas pelo software DataViewer (SkyScan, versão 1.4.4 64-bit) em uma orientação-padrão utilizando referências anatômicas definidas e padronizada (Park et al.⁶⁶, 2007).

No software CT Analyser (Skyscan, versão 1.12.4.0), foi estabelecido um limite de contraste (threshold 200-60 na escala de tons de cinza) para distinguir tecidos mineralizados de não-mineralizados. Para a determinação da região de interesse (ROI), uma caixa volumétrica padrão (1100 x 3100 x 1400 micrômetros) foi construída para determinação da fração do volume ocupado por tecido mineralizado (Figura 5).

A partir da delimitação da área de interesse ‘ROI’ em 2D, o software promoveu a análise em 3D pela soma do conjunto de fatias transversais da amostra.

Os valores foram fornecidos como a proporção ou percentual (%) de tecido mineralizado na região de interesse. As análises foram realizadas por um examinador previamente treinado e “cego” para os grupos experimentais.

Figura 5 - Representação da área de interesse (ROI), delimitada a partir da JCE da raiz mesial do segundo molar, incluindo a região interproximal e região de furca do primeiro molar.



3.8 Obtenção das culturas celulares primárias

Nos experimentos *in vitro*, utilizamos culturas primárias de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos como células precursoras de osteoclastos, segundo protocolo descrito por Marim et al.⁵⁵ (2010). Os ossos longos (fêmur e tíbia) foram obtidos dos camundongos após o sacrifício por deslocamento cervical. Fêmur e tíbia dissecados e limpos dos tecidos moles em condições assépticas tiveram suas epífises removidas com tesouras e a porção medular enxaguada com meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 2 lavagens (centrifugação a 350 g / 5 min, RT) em PBS+10% FBS, as células foram ressuspensas em meio α -MEM suplementado com 10% de FBS e 30 ng/ml de M-CSF e transferidas para placas de cultura de baixa adesão (Optilux, BD Biosciences). Após 3 dias de diferenciação e expansão, o meio foi aspirado e foi realizada lavagem com PBS para remoção das células não aderidas. As células aderentes foram removidas das placas de cultura com PBS + 0,02% de EDTA, contadas em hemocitômetro e plaqueadas para os experimentos de osteoclastogênese.

3.9 Viabilidade Celular

Como o efeito modulador de apoptose do curcumin é conhecido e para avaliar o efeito deste e de CMC na osteoclastogênese independentemente de um possível efeito citotóxico, avaliamos a citotoxicidade do CMC e curcumin em macrófagos primários, utilizamos o método de exclusão de azul de trypan (15250-061, Invitrogen). Este método permite a diferenciação de células viáveis e não viáveis com base na integridade da membrana plasmática. Células viáveis apresentam membrana plasmática íntegra e evitam (excluem) a penetração do corante no citoplasma, enquanto células não viáveis permitem a penetração do corante e apresentam-se com o citoplasma corado em azul. Utilizamos macrófagos primários diferenciados da forma descrita anteriormente e plaqueados em placa de 96 poços (5×10^3 células por poço) e cultivadas em α -MEM suplementado com 10% de FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, 30ng/mL de M-CSF e 100ng/mL de RANKL por 5 dias. M-CSF e RANKL eram novamente acrescentados ao meio de cultura a cada 2 dias. No dia zero as células foram tratadas com 10 μM de CMC ou curcumin. Ao final do 5º dia, metade do volume de meio de cultura em cada poço foi removido e substituído por solução de azul de trypan 0.4%, seguindo de incubação por 2 minutos. A contagem foi realizada em hemocítmetro de Neubauer e a porcentagem de células viáveis nos poços tratados com curcumin ou CMC foram estimadas em relação controle (sem CMC e curcumin, estimulado com 30ng/ml de M-CSF).

3.10 Experimentos de osteoclastogênese

Para os experimentos de osteoclastogênese, os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços com 5×10^3 céls/poço e cultivados em α -MEM suplementado com 30ng/mL de M-CSF, na presença de 100 ng/mL de RANKL por 6 dias, com adição destes suplementos a cada 2 dias. Curcumin ou CMC diluídos em DMSO foram acrescentados ao

meio de cultura em concentração não citotóxica (10 μ M, determinada pelo experimento de viabilidade celular descrito anteriormente) nos dias 0, 2 e 4 após a adição inicial de RANKL (dia 0).

Ao final do período experimental de 6 dias, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 2 minutos, e coradas com 100 μ g/mL de Faloidina conjugada à FITC (Sigma Chem Co.) por 45 minutos. Ao final deste período as células foram lavadas novamente com PBS e o DNA genômico marcado com 5 μ g/mL de DAPI (Sigma Chem Co., D9542) para identificação dos núcleos celulares. O número de osteoclastos diferenciados, identificados em microscopia de fluorescência pela visualização de anel de actina contendo três ou mais núcleos, foi contados em toda a placa por examinador treinado e sem conhecimento dos grupos experimentais.

3.11 Extração de RNA total, Transcrição reversa e PCR em tempo real

O efeito do curcumin e CMC na ativação dos osteoclastos diferenciados por RANKL foi avaliado por meio da análise da expressão gênica de MMP-9 após 6 dias de cultura. Para este experimento, macrófagos foram plaqueados em placas de 35 mm e cultivados em α -MEM suplementado com M-CSF e RANKL, nas concentrações descritas anteriormente, com adição destes suplementos a cada 2 dias. Curcumin e CMC foram adicionados no dia 0, e após 6 dias as células aderidas foram coletadas para isolamento do RNA e realização das reações de RT-qPCR.

O RNA total foi extraído com sistema de colunas de afinidade para isolamento e purificação do RNA total, incluindo o tratamento com DNase (RNAqueous-4-PCR, Ambion). Após quantificação do RNA total em espectrofotômetro UV de microvolumes (Nanovue, GE Health Sciences), 400 ng de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA, utilizando *random hexamers primers* e *moloney leukemia virus reverse transcriptase*,

segundo as instruções do fornecedor do kit (High Capacity Reverse Transcription kit, Applied Biosystems).

A reação de PCR em tempo real foi feita utilizando conjuntos de primers e sondas pré-desenhados (TaqMan gene expression assays, Applied Biosystems) para detecção do gene-alvo MMP-9 (Mn 0044299, #1222984) e do gene constitutivo (GAPDH) (Mn 99999915, #1243782), utilizando o sistema TaqMan (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems) e a termocicladora StepOne Plus (Applied Biosystems) com as condições de ciclagem otimizadas pelo fabricante (10 minutos a 95°C para desnaturação inicial seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C).

A avaliação dos resultados foi feita pelo método Δ (Δ Ct), utilizando a expressão de GAPDH para normalização dos resultados a partir do *cycle threshold* determinado automaticamente pelo software de controle da termocicladora (StepOne Plus, Applied Biosystems). Os resultados foram expressos como alteração relativa (*fold change*) em relação ao controle negativo.

3.12 Análise Estatística

Os dados obtidos a partir de cada experimento foram analisados separadamente, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e com base em medidas de tendência central calculadas a partir dos diferentes experimentos e considerando cada condição experimental como um evento independente. Para as comparações entre períodos dentro de um mesmo grupo, ou entre grupos em um dado período experimental foi utilizado o teste t de Student, não pareado com correção de Welch para variâncias desiguais entre os grupos. Nestas comparações, a suposição é que os dados comparados eram completamente independentes. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$) para todas as análises.

RESULTADO

4 RESULTADO

4.1 CMC 2.24 e curcumin reduzem o infiltrado inflamatório e preservam o conteúdo de colágeno nos tecidos gengivais.

Tanto CMC quanto curcumin modularam a resposta do hospedeiro em modelo de doença periodontal induzida por LPS, diminuindo a inflamação, tal como representado por uma redução significativa do infiltrado celular, especificamente células mononucleares e polimorfonucleares nos tecidos gengivais (Figuras 6a - 6i). Interessantemente, curcumin foi mais potente na redução da prevalência de PMNs, não atingindo significância na redução de células mononucleares. Por outro lado, os efeitos de CMC foram mais potentes na inibição de células mononucleares. Além disso, por meio de análise estereométrica observou-se que os animais tratados com CMC, mas não com curcumin, apresentaram um aumento na proporção de fibras colágenas nos tecidos gengivais, o que pode estar relacionado ao aumento da proliferação e/ou da atividade de síntese de matriz extracelular pelos fibroblastos presentes na região ou, alternativamente, por uma menor degradação do colágeno pré-existente associada à atenuação da resposta inflamatória. (Figuras 7a - 7d).

Figura 6 - Características histológicas dos tecidos gengivais submetidos à indução de doença periodontal por injeção de LPS (corados com hematoxilina e eosina) de acordo com os grupos experimentais. Injeções de *Escherichia coli* (30 ug/injeção) foram realizadas 3 vezes por semana durante 15 dias na região palatina do primeiro molar, na região correspondente à caixa retangular da figura (a). O lado oposto (controle) recebeu o mesmo volume do veículo de diluição do LPS (PBS) na mesma região (d, em maior aumento). As injeções de LPS produziram um intenso infiltrado celular nos tecidos gengivais (e). Nos animais tratados com CMC (f), houve um aumento na proporção de células com características morfológicas de fibroblastos em comparação ao controle veículo do CMC (g). A administração oral de curcumina reduziu significativamente o infiltrado celular nos tecidos gengivais (h) em comparação aos animais tratados com seu veículo (i). As imagens foram obtidas em magnificação de 200x. Imagens em aumento de 600x (b e c) representam as características morfológicas de PMNs e células mononucleares contadas. A área de interesse foi localizada a 400um do dente (distância representada pela linha amarela na imagem a), de acordo com a região onde foram feitas as injeções e devido ao aumento do infiltrado inflamatório nessa região. AB, osso alveolar. R, raiz.

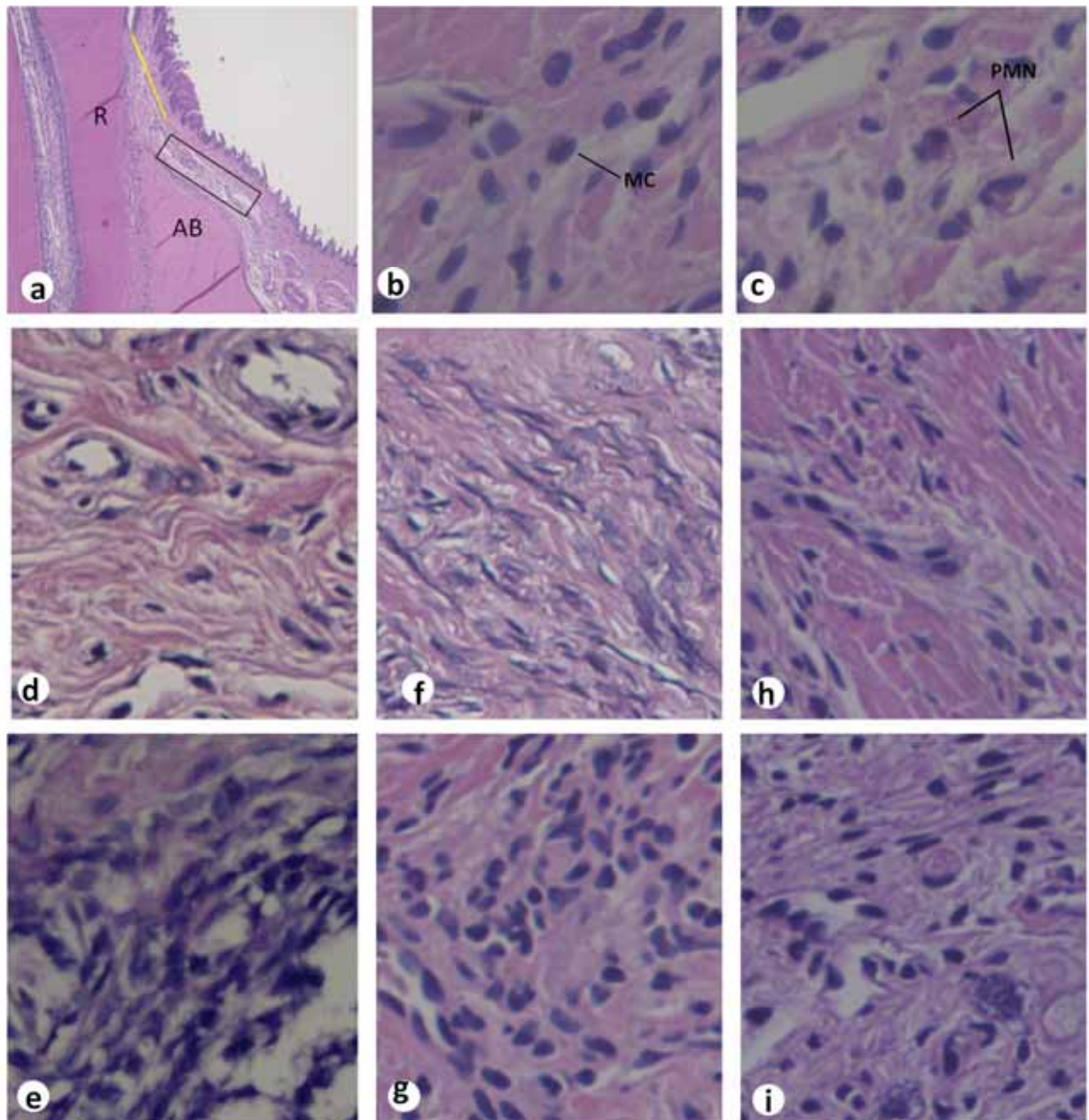
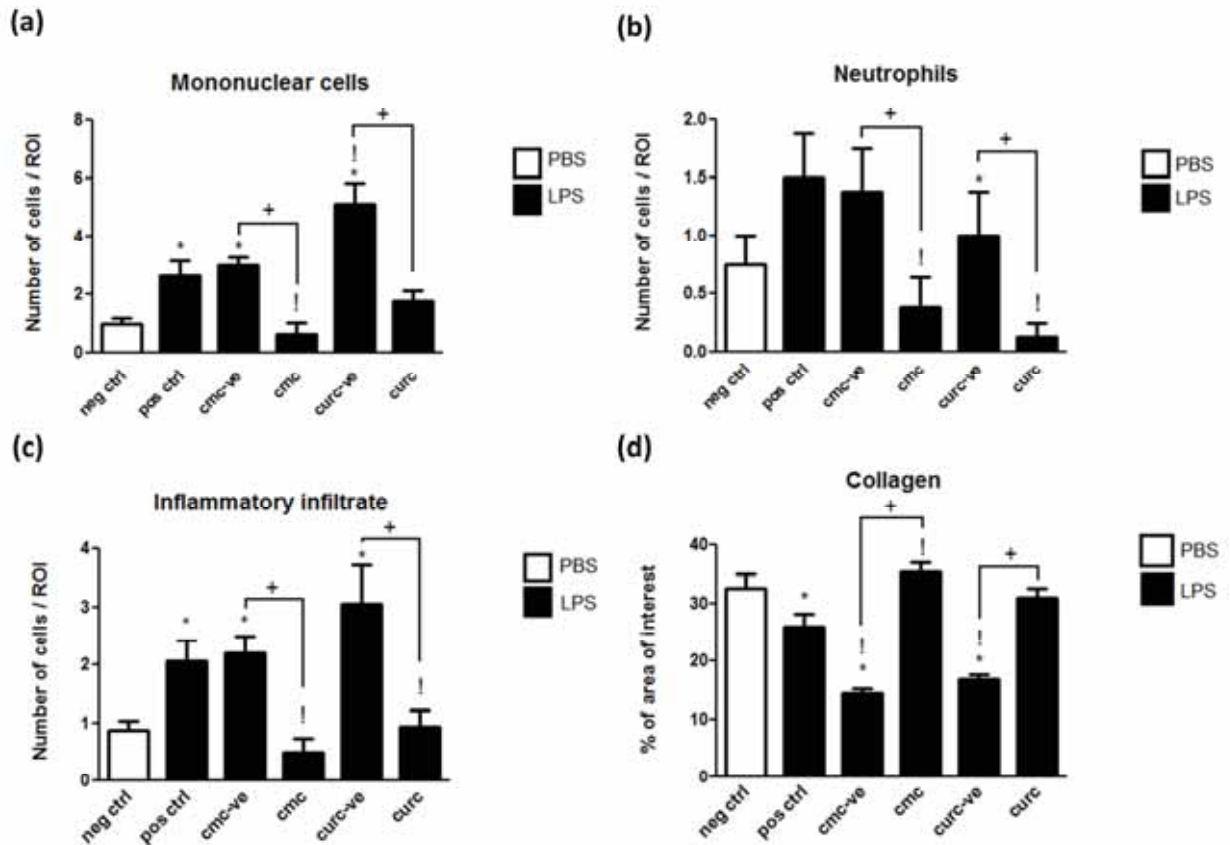


Figura 7 - Contagem diferencial de células inflamatórias segundo as características morfológicas. Foram avaliados 4 campos aleatórios de 2 cortes, com distância de 100 μm entre eles, de pelo menos 4 animais / grupo experimental em magnificação de 600x (representado pelas Figuras 6b e 6c). Os resultados demonstram que tanto CMC quanto curcumín reduziram o número de células mononucleares (a) e de neutrófilos (b) nos tecidos gengivais pela administração oral de CMC e curcumín. O número de células inflamatórias (células mononucleares e neutrófilos combinados) foi maior no grupo injetado com LPS em comparação ao grupo controle negativo (injeções de PBS e administração de veículo). CMC e curcumín reduziram significativamente o infiltrado inflamatório no grupo injetado com LPS (c). Uma grade de 1600 μm^2 foi colocada sobre o tecido conjuntivo palatino situado a 400 μm do dente e a proporção de fibras colágenas foi determinada. Houve um aumento na proporção de fibras colágenas nos sítios gengivais dos animais tratados com CMC, mas não com curcumín, em comparação ao grupo injetado com LPS e sem tratamento (controle positivo). (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo sadio (controle negativo). (!) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle positivo. (+) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle veículo (injeções de LPS e administração do veículo de diluição do curcumín). As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de no mínimo quatro animais por grupo.



4.2 Administração oral de CMC 2.24, mas não de curcumín, reduz significativamente a reabsorção óssea associada à doença periodontal induzida por LPS.

O número de células multinucleadas TRAP-positivas, identificadas por imunohistoquímica, foi contado nas proximidades do osso alveolar (Figura 8). Uma diminuição estatisticamente significativa foi observada apenas no grupo tratado com CMC em comparação ao grupo controle-positivo (Figuras 9a e 9b). Além disso, por análise de microtomografia computadorizada, observou-se que o grupo tratado com CMC apresentou redução significativa da perda óssea alveolar em comparação ao grupo injetado com LPS. A administração de curcumin não resultou em efeitos significativos sobre o número de osteoclastos ou sobre a extensão da reabsorção óssea inflamatória. Não houve diferenças significativas entre o grupo tratado com CMC e os controles sem doença (injetados com PBS) (Figura 10).

Figura 8 - Imunolocalização de células TRAP-positivas em corte frontal do primeiro molar superior contracorado com hematoxilina. Células TRAP-positivas, com três ou mais núcleos (setas), próximas à raiz mesial (R) e região de furca (F) foram identificadas em lacunas na proximidade do osso alveolar (AB). No inserto em maior aumento (magnificação de 400X), detalhe de osteoclasto identificado por imunohistoquímica pela morfologia, localização e positividade para expressão de TRAP. TO, dente; P, polpa dental; PL, ligamento periodontal. Imagem em magnificação de 50x.

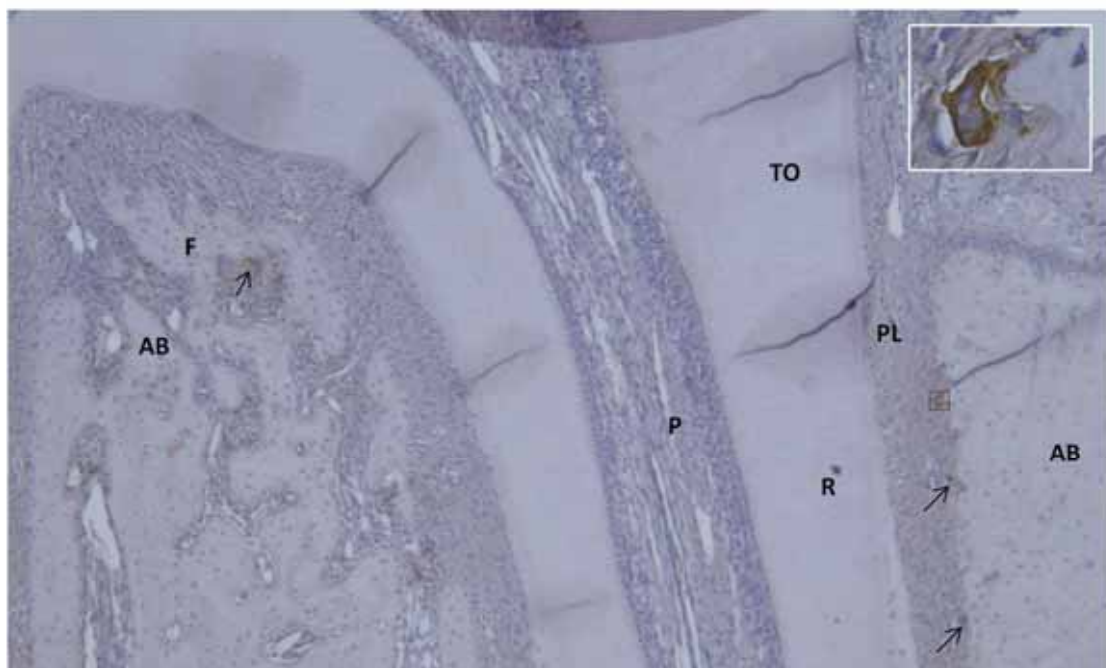


Figura 9 - (A) Fotomicrografias representativas (magnificação de 200x) dos grupos experimentais: grupo controle negativo (a), grupo controle positivo (b). A administração oral de CMC reduziu o número de células TRAP-positivas na presença das injeções de LPS (c), enquanto a administração de curcumin não reduziu o número de células TRAP-positivas próximas ao tecido ósseo (d). AB, osso alveolar; R, raiz mesial. (B) Contagem de osteoclastos (células TRAP-positivas com três ou mais núcleos próximas à superfície do tecido ósseo) à 400µm de distância entre do topo da crista óssea na direção palatina. Injeções de LPS aumentaram significativamente ($*p<0.01$) o número de osteoclastos em comparação ao grupo controle negativo. O tratamento com CMC reduziu significativamente ($+p<0.05$) o número de células TRAP-positivas enquanto curcumin não teve efeito na quantidade de osteoclastos em comparação ao grupo controle positivo. (!) indica diferença significativa ($p<0.05$) em comparação grupo controle positivo. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de no mínimo quatro animais por grupo.

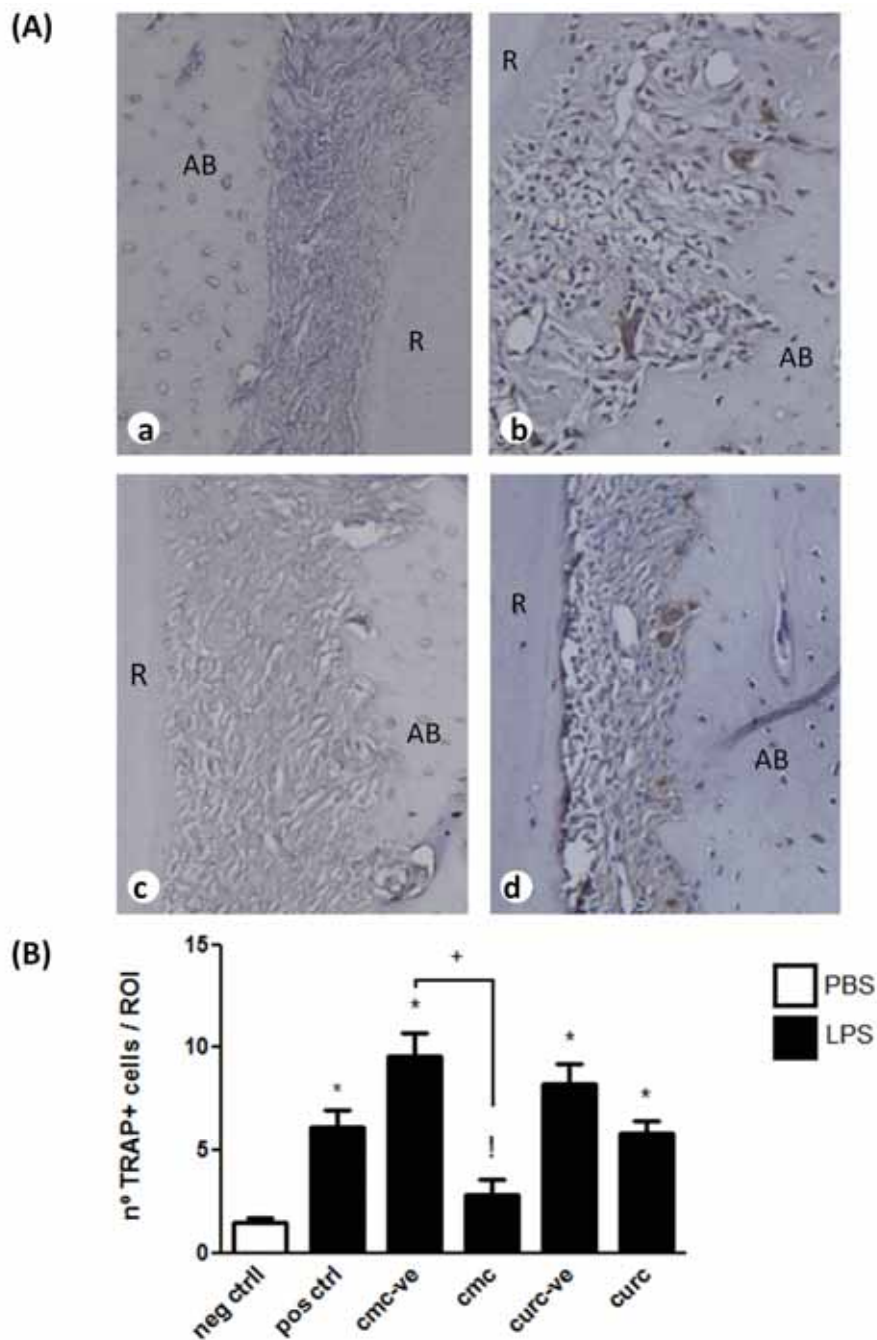
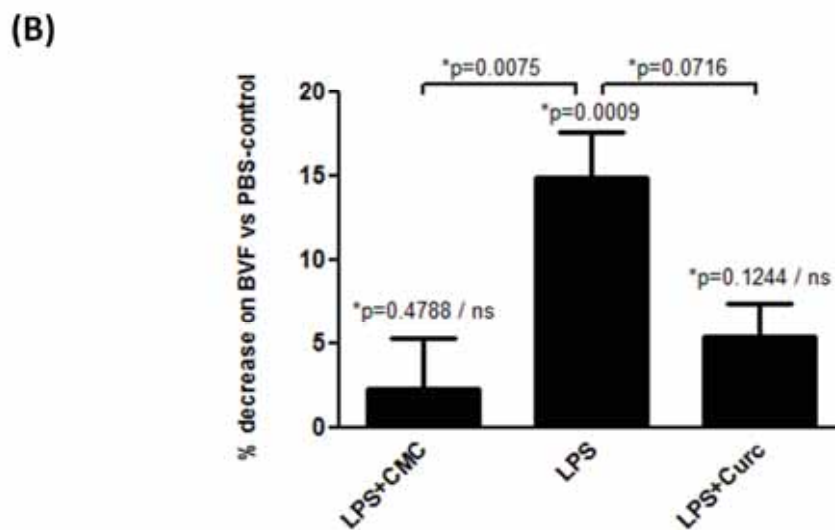
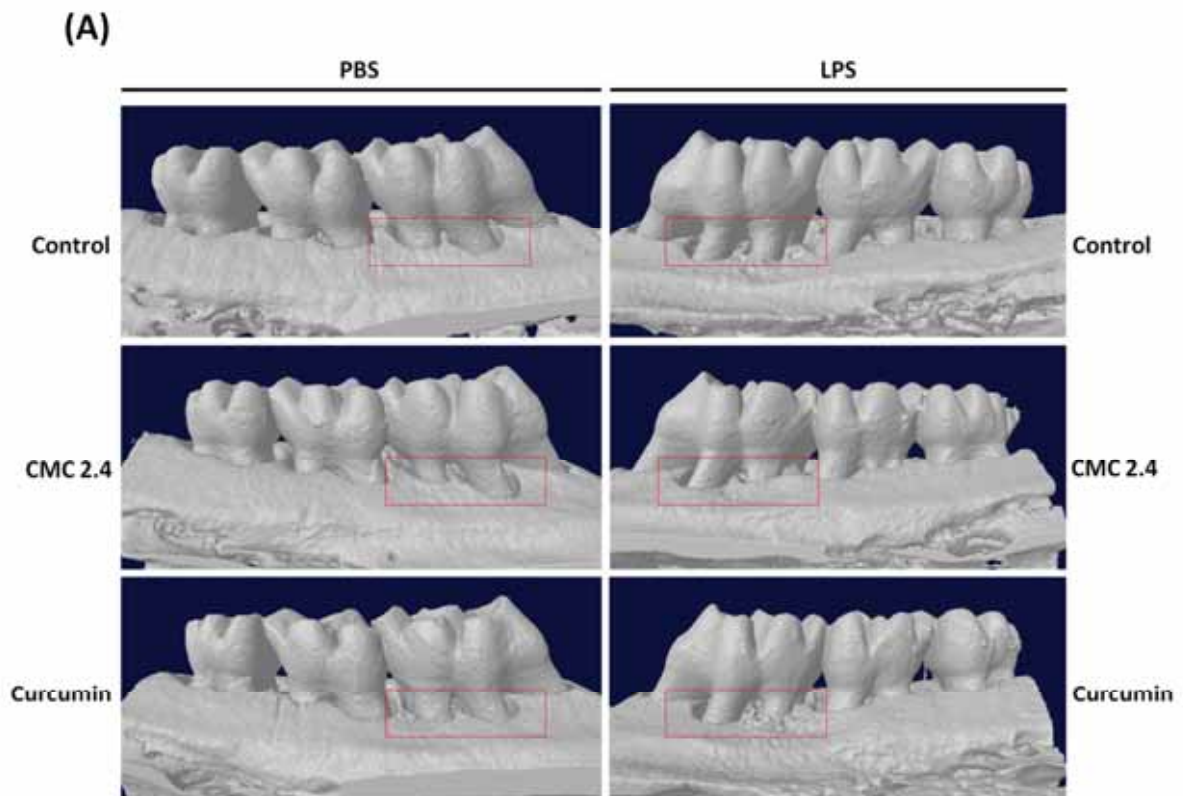


Figura 10 - CMC reduziu significativamente a perda óssea alveolar em modelo de doença periodontal induzida por LPS. (A) Imagens de reconstruções tridimensionais de hemimaxilas representativas dos grupos experimentais. O retângulo vermelho é uma representação bidimensional da ROI cúbica utilizada para avaliação da fração de volume ocupada por tecido mineralizado. (B) Resultados quantitativos da análise por μ CT, demonstrando que a administração de CMC reduziu significativamente a reabsorção óssea numa área de interesse padronizada de 1100x3100um (retângulo em vermelho) incluindo o 1º. molar superior e a região interproximal da crista óssea entre 1º. e 2º. molares. Os veículos não resultaram em nenhum efeito sobre a fração de tecido mineralizado na ROI, tanto na presença quanto na ausência de LPS. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle negativo (sadio). As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de no mínimo três animais por grupo.



4.3 Curcumin, mas não CMC 2.24, reduz apoptose de células inflamatórias e osteócitos.

A contagem de células apresentando marcação TUNEL-positiva indicou que curcumin, mas não CMC, reduziu a apoptose de osteócitos e de células presentes nos tecidos gengivais, tanto na presença quanto na ausência de inflamação induzida por LPS (Figuras 11 e 12). Esta redução da apoptose, na região de interesse, pode indicar que os efeitos biológicos do curcumin estão primariamente relacionados à modulação do perfil fenotípico/biologia celular. Além disso, a redução de células em apoptose pode ter favorecido o processo de reparo, ao manter a viabilidade de células como fibroblastos e células endoteliais. Como não houve diferença entre os grupos tratados com CMC ou veículo em relação ao número de células TUNEL-positivas, podemos inferir que a modulação da apoptose não é um mecanismo importante associado ao CMC neste modelo, ao menos na dose utilizada neste estudo.

Figura 11 - Número de células TUNEL-positivas nos tecidos gengivais. Imagens representativas (magnificação de 600x) dos grupos experimentais: grupo controle negativo (a). Injeções de PBS e administração oral de CMC (b) e curcumin (c). Grupo controle positivo (d). Injeção de LPS e administração oral de CMC (e) e curcumin (f). # Representa a área de interesse no tecido situada aproximadamente a 400um do dente (TO) e adjacente ao osso alveolar (AB). Imagem obtida em aumento de 50x. Administração oral de curcumin, mas não de CMC, reduziu marcadamente o número de células em apoptose tanto na presença quanto na ausência de estímulo inflamatório. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle negativo (sadio) e (!) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle positivo (com doença periodontal). As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de no mínimo quatro animais por grupo.

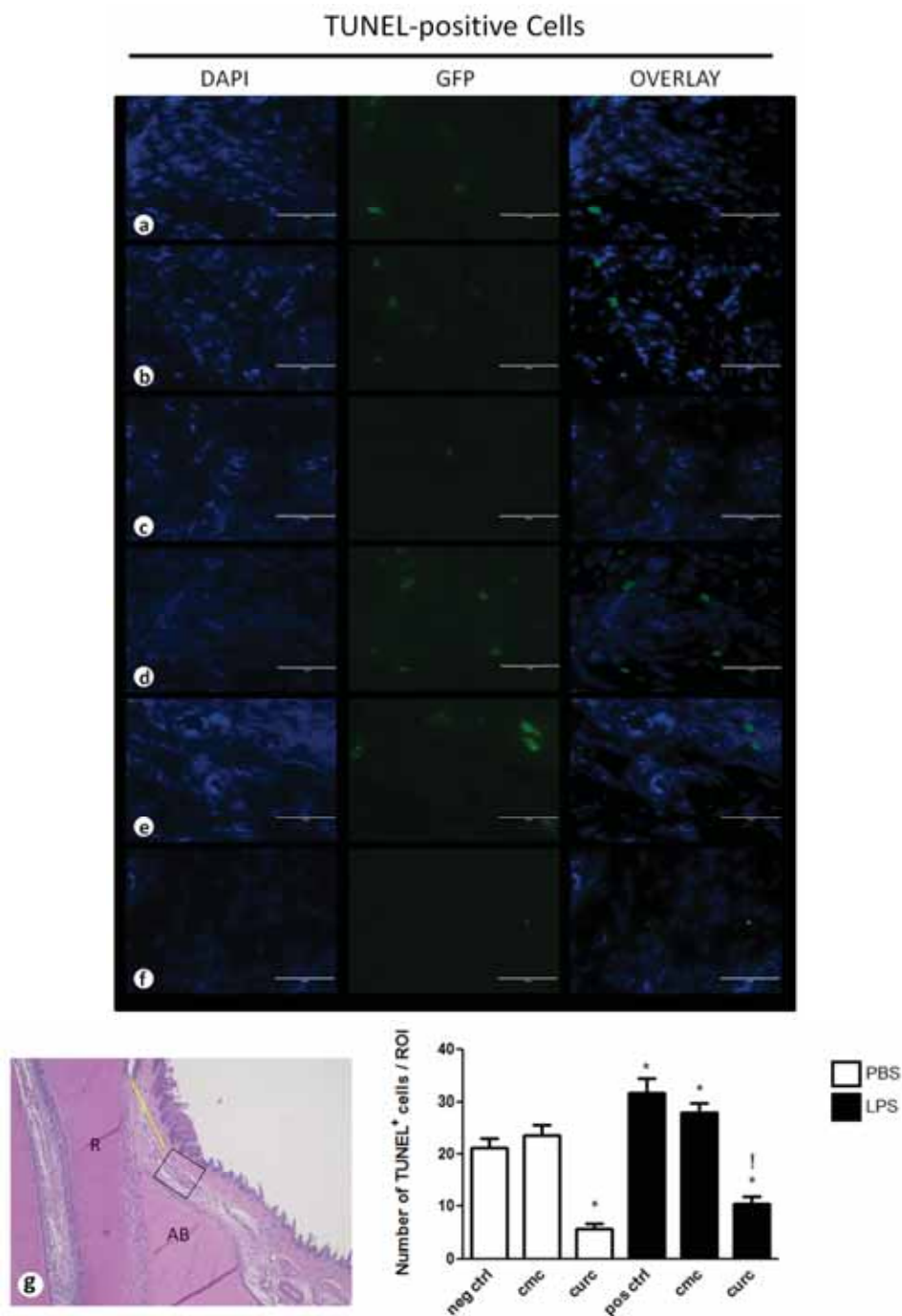
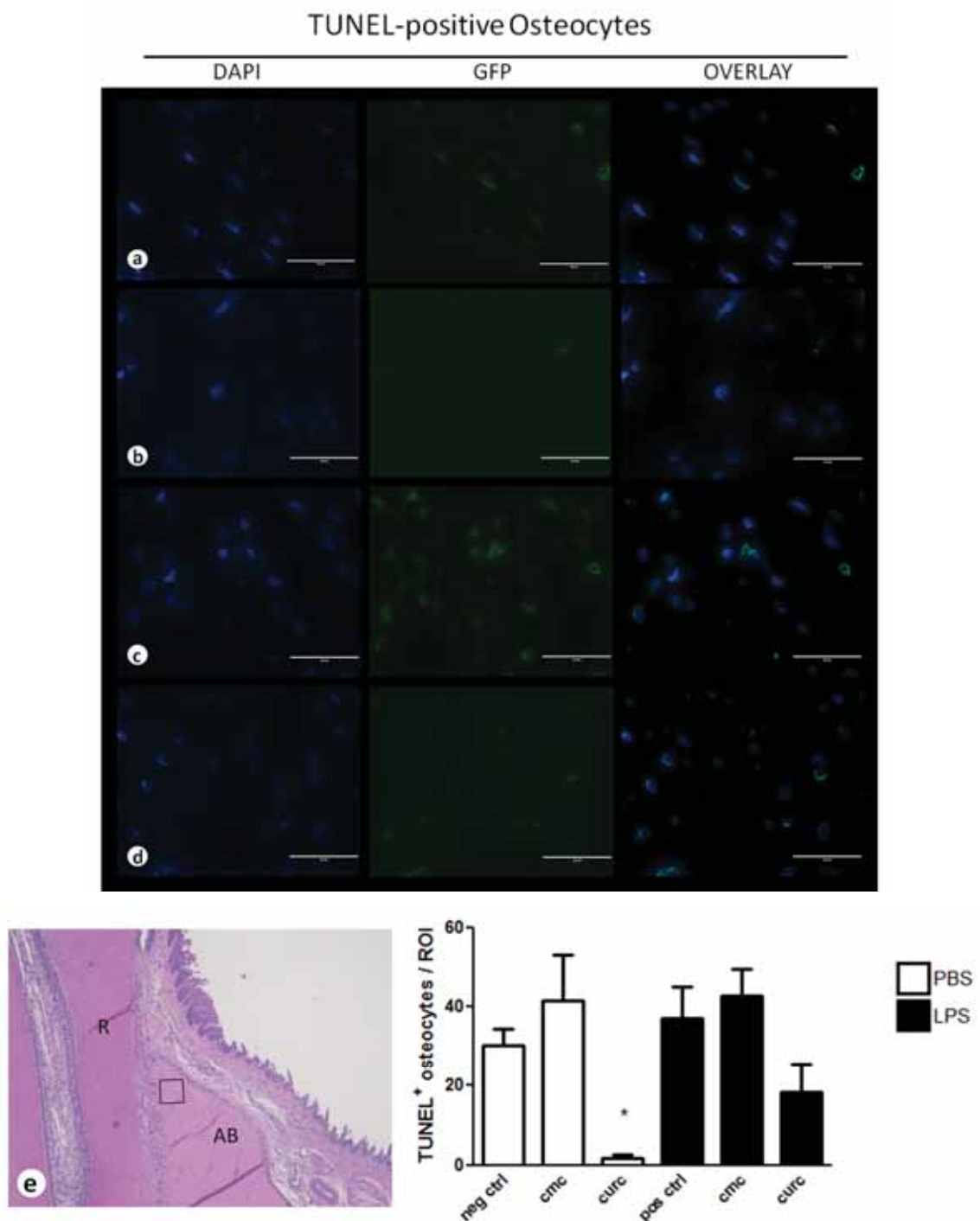


Figura 12 - Apoptose em osteócitos identificados por método TUNEL. Imagens representativas (em magnificação de 600x) dos grupos experimentais: grupo controle negativo (a). Injeção de PBS e administração oral de curcumin (b). Grupo controle positivo (c). Injeção de LPS e administração oral de curcumin (d). De forma similar ao observado no tecido gengival, curcumin, mas não CMC, inibiu significativamente a apoptose de osteócitos tanto na presença quanto na ausência de indução de doença periodontal. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os controles e administração oral de CMC (imagens destes grupos não apresentadas). # Representa a área de interesse no tecido ósseo (AB). Imagem obtida em magnificação de 50x. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle negativo e (!) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle positivo. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de no mínimo quatro animais por grupo.



4.4 Cmc 2.24 e curcumin inibem efetivamente a osteoclastogênese induzida por RANKL in vitro, mas apenas CMC 2.24 inibe significativamente a expressão de MMP-9 indicativa da ativação dos osteoclastos.

Inicialmente, avaliamos a citotoxicidade da concentração utilizada de CMC e curcumin, para evitar que a eventual alteração da viabilidade celular pudesse ser um viés na interpretação dos efeitos de CMC e curcumin na osteoclastogênese induzida por RANKL (Figura 13). Nas concentrações utilizadas, não encontramos influência significativa de nenhum dos compostos na proliferação ou viabilidade celular.

Células derivadas da medula óssea de camundongos, diferenciadas em osteoclastos, foram estimuladas com RANKL e tratadas com curcumin e CMC em concentração de 10 μ M em diferentes períodos. O número de osteoclastos, nos três períodos avaliados, foi reduzido em comparação ao controle positivo (RANKL), independentemente do momento em que CMC e curcumin foram adicionados às culturas (dia '0' simultaneamente ao início do estímulo com RANKL, 2 ou 4 dias após o início do estímulo com RANKL) (Figura 14A e B). Avaliamos a expressão gênica de MMP-9, indicativa da atividade osteoclástica por RT-qPCR, e os resultados demonstram que CMC, mas não curcumin, reduz significativamente a expressão de MMP-9 nestas culturas contendo osteoclastos induzidos por tratamento com M-CSF (30 ng/mL) e RANKL (100 ng/mL) por 6 dias (Figura 15).

Figura 13 - Avaliação dos efeitos de CMC e curcumin na proliferação e viabilidade celular de macrófagos (células precursoras de osteoclastos). Macrófagos foram tratados com CMC ou curcumin (10 μ M) e após 6 dias a proliferação e viabilidade celular foram determinados por contagem direta em hemocítômetro utilizando o ensaio de exclusão de azul de trypan. Número (A) e porcentagem de células viáveis (B) após tratamento com CMC e curcumin. Não houve diferença estatística entre os grupos. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de três experimentos independentes realizados.

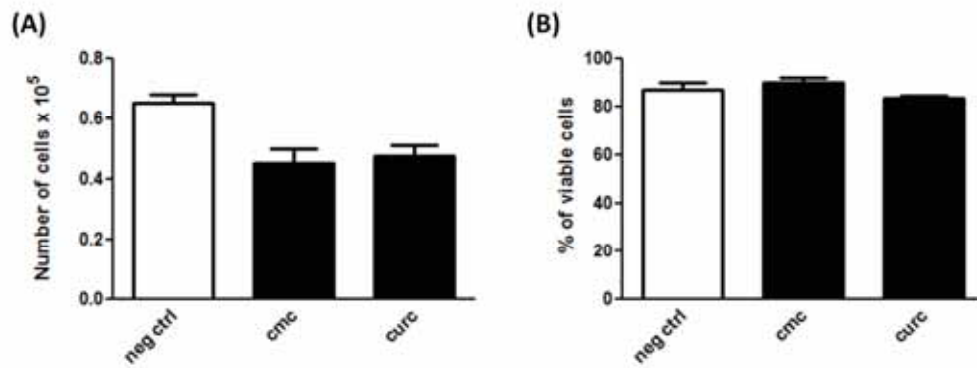


Figura 14 - Diferenciação dos macrófagos em osteoclastos induzida pelo estímulo com RANKL (100 ng/mL) e M-CSF (30 ng/mL), e o efeito de CMC e curcumin neste processo, segundo o momento em que as culturas começaram a ser tratadas com estes compostos (0 – simultaneamente ao início da adição de RANKL e M-CSF, 2 ou 4 dias após o início do tratamento com RANKL e M-CSF). (A) Osteoclastos foram identificados pela presença de um anel de actina contendo 3 ou mais núcleos, após incubação com DAPI e faloidina conjugada à FITC (imagens em aumento de 200x). (B) Quantificação do número de osteoclastos segundo os grupos e períodos experimentais. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle negativo (estimulado apenas com M-CSF). (!) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle positivo (estimulado com RANKL). (+) indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos tratados com CMC no dia 0 e 2. (#) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação os grupos tratados com curcumin no dia 0 e 4. O grupo controle negativo (neg ctrl) não foi estimulado com RANKL. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de três experimentos realizados em duplicata.

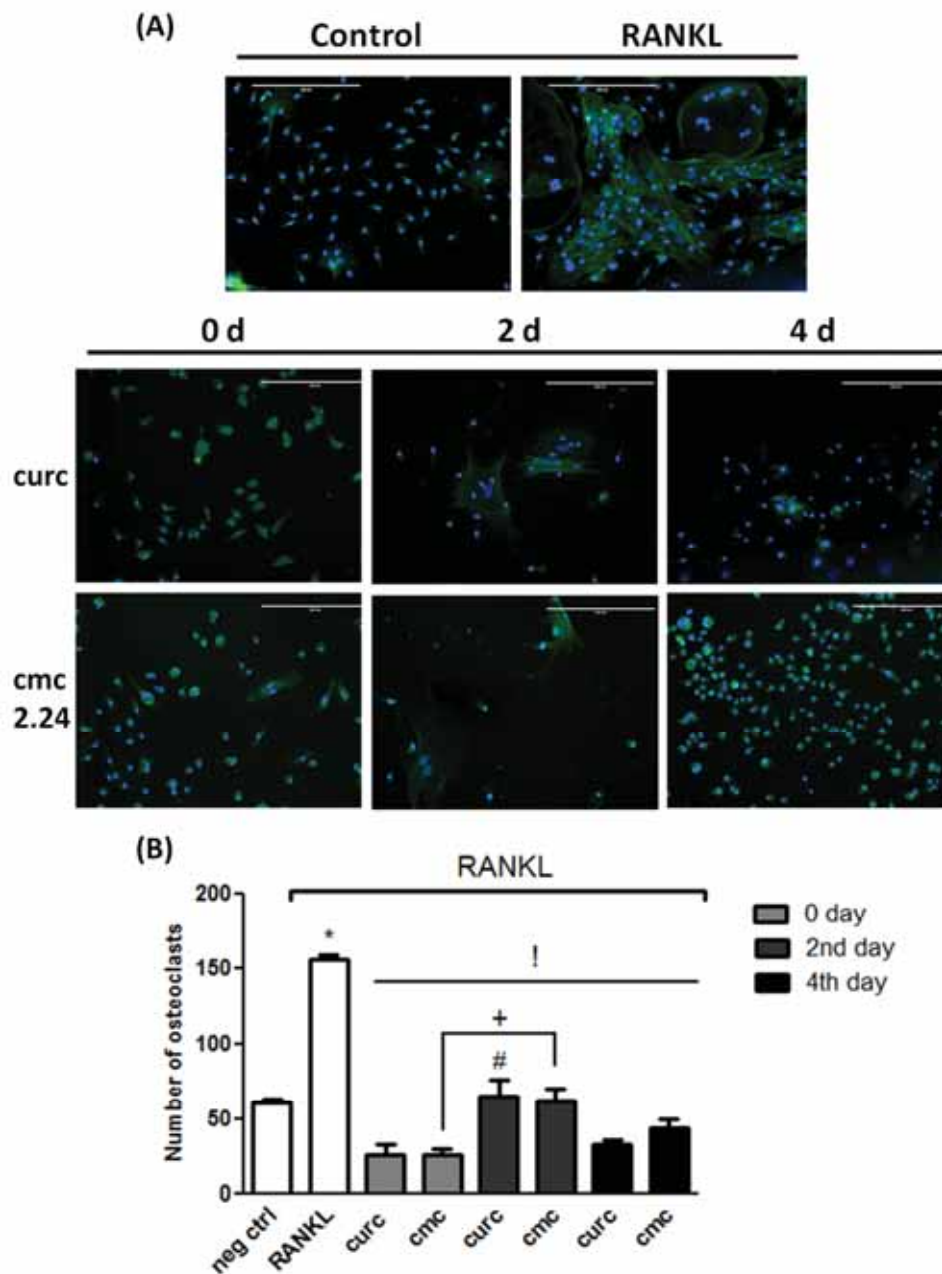
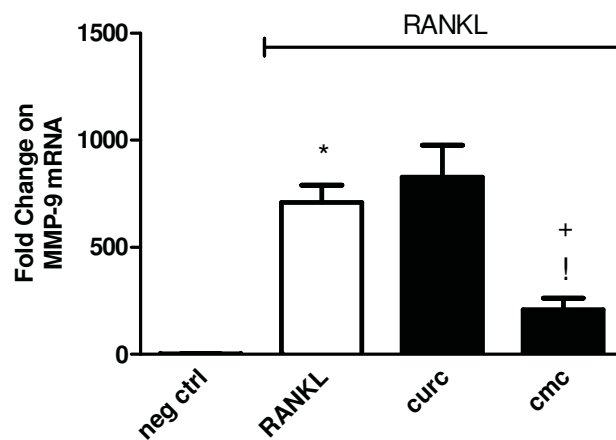


Figura 15 - Modulação da expressão gênica (RNAm) de MMP-9 por culturas celulares de macrófagos estimulados com RANKL (100 ng/mL) e M-CSF (30 ng/mL) e tratados com 10 μ M de CMC ou curcumin. Após 6 dias de cultura, o RNA total foi coletado e utilizado para síntese de cDNA, o qual foi utilizado em reação de qPCR utilizando conjuntos de primers e sondas pré-desenhados para o gene-alvo (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Os resultados foram avaliados pelo método $\Delta(\Delta Ct)$, e as barras indicam os resultados da expressão gênica relativa utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH para normalização dos resultados. Resultados representativos de amostras de RNA de três experimentos independentes. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle negativo (estimulado apenas com M-CSF). (!) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle positivo (estimulado com RANKL). (+) indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos tratados com curcumin e CMC. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de três experimentos realizados em duplicata.



DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Drogas com a capacidade de modular a resposta do hospedeiro e a reabsorção óssea são agentes terapêuticos potencialmente promissores para o tratamento das periodontites (Panquette et al.⁶⁷, 2000). CMC e curcumin inibiram de forma significativa a resposta inflamatória em modelo de doença periodontal induzida por lipopolissacarídeos bacterianos (*lipopolysaccharides*, LPS), porém apenas CMC apresentou efeito modulador na reabsorção óssea inflamatória, efeito que é suportado pela redução significativa no número de osteoclastos nos tecidos periodontais dos animais experimentais.

Curcumin apresenta potente efeito antiinflamatório em diversas doenças (Sharma et al.⁷⁶, 2001; Sharma et al.⁷⁴, 2004; Garcea et al.²⁸, 2004; Deodhar et al.¹⁷, 1980; Holt et al.⁴¹, 2005; Bundy et al.¹⁵, 2004; Hanai et al.³⁵, 2006; Heng et al.³⁸, 2000), incluindo as doenças periodontais (Guimaraes et al.³³, 2011; Guimaraes et al.³², 2012; Zhou et al.⁹⁴, 2013). Porém, seus efeitos sobre a reabsorção óssea inflamatória ainda não são bem estabelecidos, uma vez que a variabilidade na atividade deste composto é devida, em grande parte, às suas pobres propriedades farmacológicas, em especial sua insolubilidade em veículo aquoso e má absorção no trato gastrointestinal (Sharma et al.⁷⁵, 2005).

O curcumin modificado quimicamente é um composto mais solúvel e possui a capacidade de se ligar a zinco. Uma vez absorvido, o zinco é liberado pelas células intestinais e transportado pelo sangue. Após ser captado pelas células do fígado esta molécula é distribuída para os demais tecidos do organismo (Ferreira et al.²³, 2007). O CMC tem três regiões (zinc-binding moieties) capazes de se ligar a Zn, sendo, portanto, capaz de inibir as metaloproteases de matriz (*matrix metalloproteinases*, MMPs), as quais, por sua vez, são fundamentais na degradação do tecido conjuntivo, inclusive do tecido ósseo.

Embora curcumin e CMC sejam estruturalmente similares, estes compostos parecem agir por mecanismos de ação distintos, uma vez que a apoptose de células do tecido gengival e osteócitos, presentes no tecido ósseo, foram reduzidas apenas por curcumin.

A apoptose de células inflamatórias é um importante mecanismo na resolução do processo inflamatório, e sua modulação por agentes quimioterápicos pode ser uma estratégia importante para resolução de processos inflamatórios crônicos, que tem como característica marcante a exacerbação da resposta imune inata (Jancionová et al.⁴³, 2012). Vários estudos têm avaliado o potencial terapêutico do curcumin em modular a apoptose de neutrófilos (Jancionová et al.⁴⁵, 2009; Jancionová et al.⁴⁴, 2011; Prasad et al.⁷⁰, 2004). Srivastava et al.⁷⁹ (2011) demonstraram que curcumin foi capaz de diminuir a agregação dos neutrófilos, reduzindo a atividade quimiotática de IL-8 e a produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) por estas células, além de aumentar o número de células em apoptose.

Outro estudo em modelo *in vitro*, demonstrou que o tratamento com curcumin (10 e 100 μ M) foi capaz de diminuir a produção ROS por neutrófilos humanos estimulados com 13-acetato-12-myristate-forbol (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA). Os resultados foram comprovados *in vivo* em modelo de artrite reumatóide, no qual os animais foram tratados diariamente com curcumin (50mg/kg) durante 28 dias apresentaram o aumento da apoptose de neutrófilos, em nível semelhante ao obtido com o fármaco clinicamente utilizado para o tratamento da artrite (Jancionová et al.⁴⁴, 2011).

Estas evidências sugerem que a apoptose de células inflamatórias pode atenuar a resposta inflamatória, ao reduzir o número de células produtoras de mediadores inflamatórios. Por outro lado, a progressão das doenças periodontais também pode se tornar acelerada, dependendo do tipo celular envolvido, como discutiremos a seguir.

Kang et al.⁴⁶ (2013) verificaram que após a inoculação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em ratos diabéticos, um aumento significativo da apoptose de neutrófilos foi constatado nos tecidos epitelial e conjuntivo, e níveis aumentados do fator de necrose tumoral-alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) também foram evidenciados, especialmente nos animais diabéticos. Como o diabetes agrava a severidade da doença periodontal, este é um exemplo de como o aumento da apoptose de neutrófilos pode ter efeito agravante do processo inflamatório crônico.

De fato, o diabetes provoca o aumento da produção de ROS, acúmulo de produtos de glicação avançada e aumento da expressão de TNF- α , que é um potente indutor de apoptose em células residentes, como por exemplo, fibroblastos e osteoblastos (Graves et al.³¹, 2007). Nesta situação, a apoptose pode interferir negativamente com o processo de reparo, limitando o número de células capazes de produzir matriz extracelular. Esta hipótese foi verificada neste mesmo estudo, por meio da inibição de TNF- α , a qual resultou em um aumento significativo da densidade de fibroblastos e diminuição da apoptose celular nos tecidos (Graves et al.³¹ 2007).

A apoptose em células como osteócitos, também é especialmente crítica, tendo em vista condições como a osteoporose ou aumento da reabsorção óssea mediada por corticosteróides. Os corticosteróides induzem a apoptose de osteócitos maduros, presentes no tecido ósseo, tornando prejudicada a secreção de fatores de crescimento necessários para remodelação óssea fisiológica, o que gera o acúmulo de microlesões e aumento da fragilidade do tecido ósseo (Mitra et al.⁵⁹, 2011; O'Brien et al.⁶⁰, 2004 Weinstein et al.⁸⁹, 1998).

A presença de apoptose foi verificada em biópsias de humanos saudáveis e com periodontite crônica. Poucos neutrófilos TUNEL- e caspase-3 positivos foram identificados nos tecidos gengivais com doença. A presença de FAS e seu ligante, um indutor de apoptose, foi constatada apenas nos sítios com periodontite. Já a expressão de Bcl-2 (*B-cell lymphoma*

2, Bcl-2) foi identificada tanto nos sítios saudáveis quanto nos doentes, sendo esta expressão aumentada no infiltrado inflamatório dos pacientes com periodontite (Gamonal et al.²⁶, 2001). Em outro estudo, que avaliou biópsias de pacientes com periodontite agressiva por marcação com imunohistoquímica, um aumento na expressão de Bcl-2 também foi evidenciado (Bulut et al.¹⁴, 2006).

Gamonal et al.²⁷ (2003) observaram em biópsias gengivais de pacientes com periodontite um aumento do número de neutrófilos apoptóticos, constatado pela dupla marcação com TUNEL e com a enzima mieloperoxidase, característica de neutrófilos. Além disso, através de reação de imunohistoquímica foi possível constatar baixos níveis de BAX nas amostras dos pacientes com periodontite (Gamonal et al.²⁷, 2003). BAX é um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, e a redução da sua expressão pode retardar o processo de apoptose em neutrófilos, prolongando, desta forma, a resposta inflamatória local (Brenner et al.¹², 2009). Coletivamente, estas evidências sugerem que a modulação da apoptose é um alvo importante para o tratamento das doenças periodontais.

As propriedades antiinflamatórias do curcumin têm sido atribuídas a sua capacidade de prevenir a ativação do fator nuclear kappa B e conseqüentemente, a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, citocinas, moléculas de adesão, ciclooxigenase 2 (*cyclooxygenase-2*, COX-2), fosfolipase A2, mieloperoxidase, collagenase, bem como sua capacidade de modular a atividade de linfócitos T e macrófagos (Sharma et al.⁷⁵, 2005). Níveis aumentados de mediadores inflamatórios estão direta e/ou indiretamente relacionados com a degradação de tecidos mineralizados e não-mineralizados.

O tratamento com curcumin, na dose utilizada neste estudo, não inibiu a reabsorção óssea inflamatória no modelo utilizado, assim como também não reduziu o número de osteoclastos presentes nos tecidos. Por outro lado, o tratamento com CMC reduziu significativamente a reabsorção óssea alveolar e o número de osteoclastos.

Estudo anterior de nosso grupo de pesquisa (Guimaraes et al.³³, 2012), já havia demonstrado que o tratamento com curcumin (100mg/kg), diariamente, durante 15 dias não reduz a reabsorção óssea em modelo de indução de doença periodontal por ligadura. No entanto, curcumin reduziu significativamente o infiltrado inflamatório e inibiu de forma potente a expressão gênica dos mediadores inflamatórios IL-6, TNF- α e prostaglandina E2-sintase (hômologo murino de COX-2). Neste estudo estes achados foram confirmados no modelo de indução de doença periodontal por LPS, especificamente a ausência de efeito significativo do curcumin na reabsorção óssea inflamatória, embora reduza de forma significativa o infiltrado inflamatório nos tecidos gengivais.

Em estudo de outro grupo de pesquisa usando o mesmo modelo experimental e dose de curcumin (100mg/kg), por um período experimental maior (30 dias), foi verificada a significativa redução dos níveis de IL-6 e TNF- α e, em contraste aos nossos achados, houve redução da reabsorção óssea inflamatória (Zhou et al.⁹⁴, 2013). Estas diferenças podem ser atribuídas a variações no protocolo experimental, incluindo o período de avaliação (15 vs 30 dias), forma de avaliação (uCT vs avaliação morfométrica), o veículo utilizado para diluição do composto (óleo de milho vs etanol 9%), e a linhagem dos animais utilizados (Holtzman vs Wistar). No entanto, boa parte da variabilidade existente na literatura relacionada ao uso do curcumin natural pode estar relacionada ao fato que este composto não é absolutamente puro, mas sim uma mistura de diversas espécies químicas relacionadas (as três mais prevalentes são: curcumin, demethoxicurcumin e bis-demethoxicurcumin) que podem ter efeitos biológicos distintos e que podem estar presentes em proporções variadas nas preparações comerciais de ‘curcumin’.

As citocinas IL-8 e proteína quimiotática de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), sintetizadas por vários tipos celulares em resposta a estímulos endógenos e exógenos, são reguladas por citocinas pro-inflamatórias como IL-1 e TNF- α e por

lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Estas citocinas são responsáveis pelo recrutamento e ativação de fagócitos, como neutrófilos polimorfonucleares (*polymorphonuclear leukocytes*, PMNs) e monócitos (Tonetti et al.⁸⁴, 1994).

Em um estudo *in vitro*, após estímulo com LPS e 13-acetato-12-myristate-forbol (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA), a produção das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-8, proteína inflamatória macrofágica 1-alfa (*macrophage inflammatory proteins 1 alpha*, MIP-1 α), proteína quimiotática de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) e IL-1 β por monócitos e macrófagos alveolares humanos foram significativamente inibidas por curcumin de maneira dose-dependente (Abe et al.¹, 1999). O recrutamento de monócitos para o sítio inflamado é fundamental na resposta inflamatória, especialmente porque no tecido conjuntivo estas células amadurecem e adquirem características morfológicas de macrófagos, as quais além de serem células apresentadoras de antígeno ‘profissionais’, responsáveis pela ativação da resposta imune adaptativa; também são as células precursoras de osteoclastos (Kirkwood et al.⁵⁰, 2007).

Nossos resultados demonstraram que tanto a administração oral de curcumin quanto de CMC reduziu o número de células inflamatórias nos tecidos, porém um efeito potencialmente maior sobre a redução de células mononucleares foi observado nos animais tratados com CMC, enquanto os efeitos de curcumin foram mais potentes na redução da prevalência de PMNs, sugerindo que estes compostos podem modular diferencialmente a produção de mediadores biológicos relacionados à quimiotaxia destes tipos celulares nos tecidos gengivais.

Vários estudos *in vitro* também têm avaliado o potencial do curcumin em modular a osteoclastogênese. O tratamento com curcumin (10 μ M) em osteoclastos derivados do fêmur de coelhos inibiu a proteína ativadora-1 (*activator protein 1*, AP-1) e o fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF- κ B), fatores de transcrição diretamente relacionados à

sobrevivência de osteoclastos (Ozaki et al.⁶⁴, 2000). O processo osteoclastogênese é acelerado pela expressão de mediadores como o ligante do receptor-ativador do fator nuclear kappa B (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*, RANKL). Embasado nesta suposição, Bharti et al.⁹ (2004), demonstraram que curcumin suprimiu a ativação de NF- κ B por inibir a degradação de IKK induzida por RANKL, prevenindo assim, a formação de osteoclastos.

Estes resultados estão de acordo com nossas observações *in vitro*. Tanto curcumin quanto CMC inibiram a osteoclastogênese induzida por RANKL, suportando a possibilidade de um papel relevante para a modulação do número de células precursoras de osteoclastos nos tecidos por CMC. É interessante destacar que o CMC inibiu tanto a diferenciação quanto a atividade de osteoclastos, indicada pela diminuição da expressão de MMP-9, o que sugere que este poderia ser um dos mecanismos pelo qual CMC foi capaz de prevenir a perda óssea alveolar, em modelo *in vivo* (i.e., não apenas a inibição do processo de diferenciação, mas também da atividade dos osteoclastos eventualmente diferenciados). O fato de tanto curcumin quanto CMC serem igualmente efetivos na inibição da diferenciação osteoclástica induzida por RANKL *in vitro* sugere que, *in vivo*, a redução do número de células precursoras de osteoclastos e/ou a modulação da produção de mediadores biológicos importantes para o processo de osteoclastogênese estejam relacionados aos efeitos do CMC, além de uma possível interferência direta no processo de diferenciação osteoclástica.

Embora os questionamentos propostos neste trabalho tenham sido esclarecidos, é importante destacar que as limitações deste estudo devem ser consideradas. Para indução de doença periodontal, utilizamos LPS purificado de *Escherichia coli* e não bactérias vivas, limitando desta forma os MAMPs e, conseqüentemente, os PRRs envolvidos. Os compostos foram administrados concomitantemente às injeções de LPS, devido à necessidade constante do estímulo para manutenção da condição de doença. Apesar de terem sido observados efeitos significativos em relação à modulação da reabsorção óssea, apenas uma dose de cada

composto foi avaliada, tornando-se necessário a avaliação de outras doses e vias de administração com o objetivo de potencializar o efeito dos compostos. Por outro lado, a administração de curcumin ou CMC não alterou o peso dos animais em relação aos animais do grupo controle. Mudanças em relação à aparência (pelagem) e ao comportamento dos animais também não foram observadas, indicando a ausência de efeitos adversos destes compostos, o que reforça o potencial interesse em sua aplicação terapêutica.

Enfim, tanto a administração oral de CMC quanto de curcumin demonstraram potencial terapêutico para aplicação em doenças periodontais, devido à inibição da resposta inflamatória, porém apenas CMC foi efetivo na redução da reabsorção óssea inflamatória. Outros estudos que avaliem novas dosagens e vias de administração são necessários e estão sendo iniciados por nosso grupo de pesquisa.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A administração oral de CMC 2.24, mas não de curcumin, reduziu a reabsorção óssea inflamatória e o número de osteoclastos presentes nas proximidades do osso alveolar. Por outro lado, de forma similar ao observado no tecido gengival, curcumin, mas não CMC, inibiu significativamente a apoptose de osteócitos tanto na presença quanto na ausência de indução de doença periodontal.

A osteoclastogênese induzida por RANKL *in vitro* foi inibida pelo tratamento com os dois compostos, porém, apenas CMC 2.24 reduziu a atividade de osteoclastos, indicada pela redução da expressão de MMP-9 nas culturas celulares.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS*

1. Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res.* 1999; 39(1): 41-7.
2. Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol.* 2006; 69(1): 195-206.
3. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2009; 30(2): 85-94.
4. Ambili R, Santhi WS, Janam P, Nandakumar K, Pillai MR. Expression of activated transcription factor nuclear factor- κ B in periodontally diseased tissues. *J Periodontol.* 2005; 76(7): 1148-53.
5. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007; 4(6): 807-18.
6. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76(11): 1590-611.
7. Ardite E, Panes J, Miranda M, Salas A, Elizalde JI, Sans M, et al. Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappaB in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol.* 1998; 124(3): 431-3.
8. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997; 336(15): 1066-71.
9. Bharti AC, Takada Y, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF-kappa B ligand-induced NF-kappa B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *J Immunol.* 2004; 172(10): 5940-7.
10. Bisht S, Mizuma M, Feldmann G, Ottenhof N, Hong SM, Pramanik D, et al. Systemic administration of polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (NanoCurc) blocks tumor growth and metastases in preclinical models of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2011; 9(8): 2255-64.

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

11. Bremner P, Heinrich M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol*. 2002; 54(4): 453-72.
12. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21(6): 871-7.
13. Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 206(2): 533-40.
14. Bulut S, Uslu H, Ozdemir BH, Bulut OE. Expression of caspase-3, p53 and Bcl-2 in generalized aggressive periodontitis. *Head Face Med*. 2006; 20(2): 17.
15. Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Booth J. Turmeric extract may improve irritable bowel syndrome symptomology in otherwise healthy adults: a pilot study. *J Altern Complement Med*. 2004; 10(6): 1015-8.
16. Dai XZ, Yin HT, Sun LF, Hu X, Zhou C, Zhou Y, Zhang W, et al. Potential therapeutic efficacy of curcumin in liver cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(6): 3855-9.
17. Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res*. 1980; (71): 632-4.
18. Dickinson BC, Moffatt CE, Hagerty D, Whitmore SE, Brown TA, Graves DT, Lamont RJ. Interaction of oral bacteria with gingival epithelial cell multilayers. *Mol Oral Microbiol*. 2011; 26(3): 210-20.
19. Elavarasu S, Sekar S, Murugan T J. Host modulation by therapeutic agents. *Pharm Bioallied Sci*. 2012; 4 Suppl 2: S256-9.
20. Elburki M, Lee HM, Gupta N, Balacky P, Zhang Y, Johnson F, et al. Chemically-modified Curcumins inhibit alveolar bone loss in diabetic ratis with periodontitis. In: AADR Annual Meeting & Exhibitions, 2012 March 21-24; Tampa, Florida. Tampa: AADR; 2012. [abstract 1528]
21. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(40): 495-516.
22. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as therapeutic agent : the evidence from in vitro , animal and human studies [Review Article]. *Br J Nutr*. 2010; 103(11): 1545-57.
23. Ferreira ECS. Osteopenia diabética e pós-menopausa: efeito metabólico do zinco na recuperação do volume ósseo trabecular [dissertação de mestrado]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.

24. Filep JG, El Kebir D. Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem.* 2009; 108(5): 1039-46.
25. French DL, Muir JM, Webber CE. The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: an assessment of the bone sparing effects of curcumin. *Phytomedicine.* 2008; 15(12): 1069-78.
26. Gamonal J, Bascones A, Acevedo A, Blanco E, Silva A. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. *J Periodontol.* 2001; 72(4): 517-25.
27. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, et al. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(7): 616-23.
28. Garcea G, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer.* 2004; 90(5): 1011-5.
29. Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C, Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci.* 2009; 84(21-22): 745-54.
30. Ghosh, S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and REL proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 225-60.
31. Graves DT, Liu R, Oates TW. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontol 2000.* 2007; 45(1): 128-37.
32. Guimaraes MR, de Aquino SG, Coimbra LS, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. *Innate Immun.* 2012; 18(1): 155-63.
33. Guimaraes MR, Coimbra LS, de Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res.* 2011; 46(2): 269-79.
34. Golub LM, Suomalainen K, Sorsa T. Host modulation with tetracyclines and their chemically modified analogues. *Curr Opin Dent.* 1992; 2: 80-90.
35. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, et al. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4(12): 1502-6.
36. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 2004; 18(18): 2195-224.
37. Heeba GH, Mahmoud ME, El Hanafy AA. Anti-inflammatory potential of curcumin and quercetin in rats: role of oxidative stress, heme oxygenase-1 and TNF- α . *Toxicol Ind Health.* 2012 Sep 28. Epub ahead of print. doi: 10.1177/0748233712462444.

38. Heng MC, Song MK, Harker J, Heng MK. Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. *Br J Dermatol.* 2000; 143(5): 937-49.
39. Hie M, Yamazaki M, Tsukamoto I. Curcumin suppresses increased bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2009; 621(1-3): 1-9.
40. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway, CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999; 284(5418): 1313-8.
41. Holt PR, Katz S, Kirshoff R. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. *Dig Dis Sci.* 2005; 50(11): 2191-3.
42. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(4): 277-88.
43. Jancinová V, Perecko T, Harmatha J, Nosal R, Drabiková K. Decreased activity and accelerated apoptosis of neutrophils in the presence of natural polyphenols. *Interdiscip Toxicol.* 2012; 5(2): 59-64.
44. Jancinová V, Perecko T, Nosál R, Mihalová D, Bauerová K, Drábiková K. Pharmacological regulation of neutrophil activity and apoptosis: contribution to new strategy for modulation of inflammatory processes. *Interdiscip Toxicol.* 2011; 4(1): 11-4.
45. Jancinova V, Perecko T, Nosal' R, Kos'alova D, Bauerova K, Drabikova 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.
46. Kang J, de Brito Bezerra B, Pacios S, Andriankaja O, Li Y, Tsiagbe V, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection enhances apoptosis in vivo through a caspase-3-dependent mechanism in experimental periodontitis. *Infect Immun.* 2012; 80(6): 2247-56.
47. Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gum bug, leave my heart alone!"--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res.* 2010; 89(9): 879-902.
48. Kim SJ. Curcumin suppresses the production of interleukin-6 in *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *J Periodontal Implant Sci.* 2011; 41(3): 157-63.
49. Kim JH, Gupta SC, Park B, Vivek R, Yadav VR, Aggarwal BB. Turmeric (*Curcuma longa*) inhibits inflammatory nuclear factor (NF)-kB and NF-kB-regulated gene products and induces death receptors leading to suppressed proliferation, induced chemosensitization, and suppressed osteoclastogenesis. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56(3): 454-65.

50. Kirkwood KL, Taba Jr M, Rossa jr C, Preshaw PM, Giannobile WV. Carranza periodontia clínica. 10th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. 259 p.
51. Lantz RC, Chen GJ, Solyom AM, Jolad SD, Timmermann BN The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*. 2005; 12(6-7): 445-52.
52. Lao CD, Ruffin MT, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*. 2006; 6: 10.
53. Liu TY, Tan ZJ, Jiang L, Gu JF, Wu XS, Cao Y, et al. Curcumin induces apoptosis in gallbladder carcinoma cell line GBC-SD cells. *Cancer Cell Int*. 2013; 26(1): 64.
54. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci*. 2006; 78(18): 2081-7.
55. Marim FM, Silveira TN, Lima DS Jr, Zamboni DS. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One*. 2010; 17(12): 5.
56. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5(4): 3-28.
57. Min SY, Yan M, Du Y, Wu T, Khobahy E, Kwon SR, et al. Intra-articular nuclear factor- κ B blockade ameliorates collagen-induced arthritis in mice by eliciting regulatory T cells and macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2013; 172(2): 217-27.
58. Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Pandya P, Ralhan R. Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. *J Breast Cancer*. 2013; 16(1): 23-31.
59. Mitra R. Adverse effects of corticosteroids on bone metabolism: a review. *PM&R*. 2011; 3(5): 466-71.
60. O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, et al. Glucocorticoids act directly on osteoclasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology*. 2004; 145(4):1835-41.
61. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 1996; 27(9): 896-903.
62. Oh S, Kyung TW, Choi HS. Curcumin inhibits osteoclastogenesis by decreasing receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in bone marrow stromal cells. *Mol Cells*. 2008; 26(5): 486-89.
63. Olivera A, Mooreb TW, Hua F, Brown AP, Sunb A, Liottab DC, et al. Inhibition of the NF- κ B signaling pathway by the curcumin analog, 3,5-Bis(2-

- pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31): anti-inflammatory and anti-cancer properties. *Int Immunopharmacol.* 2012; 12(2): 368-77.
64. Ozaki K, Kawata Y, Amano S, Hanazawa S. Stimulatory effect of curcumin on osteoclast apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59(12): 1577-81.
65. Ozaki K, Takeda H, Iwahashi H, Kitano S, Hanazawa S. NF-kappaB inhibitors stimulate apoptosis of rabbit mature osteoclasts and inhibit bone resorption by these cells. *FEBS Lett.* 1997; 410(2-3): 297-300.
66. Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, Jin Q, Chang J, Kreider JM, et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol.* 2007; 78(2): 273-81.
67. Panquette DW, Williams RC. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2000; 24(1): 239-52.
68. Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-B1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(8): 1425-30.
69. Perkins ND. Integrating cell-signaling pathways with NF-kB and IKK function. *Nat Rev.* 2006; 8(1): 49-62.
70. Prasad NS, Raghavendra R, Lokesh BR, Naidu KA. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004; 70(6): 521-8.
71. Santoro A, Majorana A, Bardellini E. NF-κB expression in oral and cutaneous lichen planus. *J Pathol.* 2003; 201(3): 466-72.
72. Saja K, Babu MS, Karunagaran D, Sudhakaran PR. Anti-inflammatory effect of curcumin involves downregulation of MMP-9 in blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(13): 1659-67.
73. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, Neill LA, JO, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. Resolution of inflammation : state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 2007; 21(2): 325-32.
74. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(20): 6847-54.
75. Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(7): 1894-900.
76. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 2005; 41(13): 1955-68.

77. Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasheri A. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(9): 1434-45.
78. Shezad A, Rehman G, Lee YS. Curcumin in inflammatory diseases. *Biofactors.* 2013; 39(1): 69-77.
79. Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(3): 331-41.
80. Souza JAC, De Rossa C, Garlet GP, Nogueira AVB, Cirelli JÁ. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(2): 128-38.
81. Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40(8): 1091-7.
82. Swarnakar S, Ganguly K, Kundu P, Banerjee A, Maity P, Sharma AV. Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer. *J Biol Chem.* 2005; 280(10): 9409-15.
83. Liu TY, Tan ZJ, Jiang L, Gu JF, Wu XS, Cao Y, et al. Curcumin induces apoptosis in gallbladder carcinoma cell line GBC-SD cells. *Cancer Cell int.* 2013; 13(1): 64-72.
84. Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun.* 1994; 62(9): 4005-14.
85. Vernillo AT, Ramamurthy NS, Golub LM, Rifkin BR. The nonantimicrobial properties of tetracycline for the treatment of periodontal disease. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 111-8.
86. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kB and Ikb proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30(1): 44-51.
87. Von Metzler I, Krebbel H, Kuckelkorn U, Heider U, Jakob C, Kaiser M, Fleissner C, Terpos E, Sezer O. Curcumin diminishes human osteoclastogenesis by inhibition of the signalosome-associated I kappaB kinase. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009; 135(2): 173-9.
88. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1978; 43(2): 86-92.

89. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt MA, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest.* 1998; 102(2): 274-82.
90. Zappa U, Reinking-Zappa M, Graf H, Case D. Cell populations associated with active probing attachment loss. *J Periodontol.* 1992; 63(9): 748-52.
91. Zhang Y, Golub LM, Johnson F, Wishnia A. pKa, zinc- and serum albumin-binding of curcumin and two novel biologically-active chemically-modified curcumins. *Curr Med Chem.* 2012; 19(25): 4367-75.
92. Zhang Y, Gu Y, Lee HM, Hambardjieva E, Vranková K, Golub LM, Johnson F. Design, synthesis and biological activity of new polyenolic inhibitors of matrix metalloproteinases: a focus on chemically-modified curcumins. *Curr Med Chem.* 2012; 19(25): 4348-58.
93. Zhou DH, Wang X, Yang M, Shi X, Huang W, Feng Q. Combination of low concentration of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and curcumin strongly suppresses the growth of non-small cell lung cancer in vitro and in vivo through causing cell cycle arrest. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(6): 12023-36.
94. Zhou T, Chen D, Li Q, Sun X, Song Y, Wang C. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand.* 2013; 71(2): 349-56.

ANEXO

ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 12/2011

Araraquara, 08 de Agosto de 2011

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 05/08/2011, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Modulação da resposta imune por um curcumin modificado quimicamente. Um estudo in vitro e in vivo em modelo de doença periodontal." (Proc. CEUA nº 12/2011) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para SETEMBRO/2014.

Atenciosamente,


Profª Drª ELENY ZANELLA BALDUCCI
Coordenadora da CEUA

Ao
Prof. Dr. CARLOS ROSSA JUNIOR
DD. Pesquisador Responsável
a/c Morgana Rodrigues Guimarães
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 19 de março de 2014.

FABIANA DE ALMEIDA CURYLOFO