



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

MARIANA PAGLIUSI JUSTO

**Efeito da suplementação alimentar à base de curcumina na
reabsorção óssea de ratos Wistar com periodontite apical**

ARAÇATUBA-SP
2020

MARIANA PAGLIUSI JUSTO

**Efeito da suplementação alimentar à base de curcumina na
reabsorção óssea de ratos Wistar com periodontite apical**

Trabalho de Conclusão de Curso
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho".

Orientador: Prof. Dr. Luciano
Tavares Angelo Cintra

ARAÇATUBA-SP
2020

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Mônica Pagliusi Lopes Justo, meu anjo, a minha maior incentivadora, o meu espelho de pessoa, mãe e profissional. Você sempre será o motivo das minhas melhores escolhas e decisões. Uma pela outra até o fim. E ao meu pai e melhor amigo, Fábio Antônio Justo, que jamais negou esforços para me ver feliz. Obrigada por estar comigo e me apoiar, obrigada por todo o carinho que sempre demonstrou pela nossa família. Eterna gratidão por vocês, meu heróis. Isso é por vocês e para vocês.

À minha irmã, Thamara Pedro Rino, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e que mesmo longe ainda podemos confiar uma na outra. Que nunca nos falte companheirismo e união. Obrigada por existir.

Ao meu Professor e Orientador, Luciano Tavares Angelo Cintra, pela oportunidade de fazer parte dos seus orientados. Obrigada pelos ensinamentos e conhecimento compartilhados. O senhor é uma inspiração de profissional.

À querida doutoranda, Carolina de Barros Moraes Cardoso, pela paciência, boa vontade, incentivo e ensinamento. Eu jamais teria conseguido sem você! Nunca me esquecerei de tudo o que fez por mim. Você é um espelho para mim. Muito obrigada, Carol!

Às minhas amigas de graduação, Priscila Marchesini e Letícia Bizzi Candil, que guardam toda a minha graduação em suas mentes e corações. Meu porto seguro! Obrigada pela convivência ao longo desses anos, pelas risadas, conversas e todos os momentos que tivemos. Só chegamos até aqui porque uma ajudou a outra. Sentirei falta de tudo que envolve vocês. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À minha querida dupla de todas as clínicas, Michele Russo Luciano, que esteve ao meu lado a cada bronca levada, a cada material esquecido e a cada tratamento concluído. Você é uma pessoa de coração de ouro, merece tudo o que a vida tem de bom! Estarei sempre torcendo por você, onde quer que o destino nos leve. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos Cristiane Cantiga, Julia Pantaroto e Pedro Henrique Chaves, por toda ajuda e por fazerem parte dessa experiência comigo. Foi um prazer conhecer cada um de vocês. Os levarei com muito carinho em meu coração.

E, por fim, agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelas bolsas concedidas (Processos n^{os} 2015/03054-0 e 2016/08005-0).

JUSTO, M. P. **Efeito da suplementação alimentar à base de curcumina na reabsorção óssea de ratos Wistar com periodontite apical**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da suplementação alimentar à base de curcumina sobre o processo de reabsorção óssea em ratos com periodontite apical. Foram utilizados 40 ratos divididos em 4 grupos de 10 animais cada: C - ratos controle; CUR - ratos suplementados com curcumina; PA - ratos com periodontite apical; PA+CUR - ratos com periodontite apical e suplementados com curcumina. A suplementação com a curcumina foi realizada por meio de gavagem, e iniciada 15 dias antes da indução da infecção endodôntica e por mais 30 dias após a indução, totalizando 45 dias de suplementação. A periodontite apical foi induzida por meio de exposição pulpar dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito de cada animal. Após 30 dias, as maxilas foram coletadas e processadas para análise histológica e histométrica da região periapical. Os resultados das diferentes análises foram analisados por testes estatísticos específicos para cada caso ($p < 0,05$). O grupo PA+CUR apresentou infiltrado inflamatório menos intenso quando comparado ao grupo PA ($p < 0,05$), entretanto, não foi observado diferença estatística significativa com relação à reabsorção óssea empregando a análise histométrica ($p > 0,05$). A suplementação alimentar com a curcumina foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório na região periapical decorrente da infecção endodôntica.

Palavras-chave: Periodontite apical. Curcumina. Infecção endodôntica.

JUSTO, M. P. **Effect of curcumin-based dietary supplementation on bone resorption of Wistar rats with apical periodontitis**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the effect of curcumin-based dietary supplementation on the bone resorption process in rats with apical periodontitis. Forty rats were divided into four groups of 10 animals each: C - control rats; CUR - rats supplemented with curcumin; PA - mice with apical periodontitis; PA+CUR - mice with apical periodontitis and supplemented with curcumin. Curcumin supplementation was performed by gavage and started 15 days before induction of endodontic infection and for another 30 days after induction, totaling 45 days of supplementation. Apical periodontitis was induced by pulp exposure of the first and second upper and lower molars on the right side of each animal. After 30 days, the jaws were collected and processed for histological and histometric analysis of the periapical region. The results of the different analyzes were analyzed by case-specific statistical tests ($p < 0.05$). The PA+CUR group presented less intense inflammatory infiltrate when compared to the PA group ($p < 0.05$), however, there were no statistically significant differences regarding the periapical bone loss using the histometric analysis ($p > 0.05$). Dietary supplementation with curcumin was able to reduce the inflammatory infiltrate in the periapical area due to endodontic infection.

Keywords: Apical periodontitis. Curcumin. Endodontic infection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Imagens histológicas das lesões periapicais aos 30 dias após a exposição da polpa ao ambiente oral (coloração H&E).....	22
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Mediana dos scores atribuídos para análise histológica de todos os grupos.....	23
TABELA 2 - Valores médios de área ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$) e percentual de perda óssea para análise histométrica dos grupos PA e PA+CUR	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 PROPOSIÇÃO.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Materiais.....	15
3.2 Métodos.....	15
3.2.1 Suplementação alimentar.....	15
3.2.2 Indução das lesões periapicais	16
3.2.3 Divisão em grupos	16
3.3 Coleta de Material para Análise	16
3.3.1 Coleta da maxila.....	17
3.4 Processamento Histológico.....	17
3.5 Forma de Análise dos Resultados	17
3.5.1 Análise histológica e histométrica das lesões periapicais.....	17
3.5.2 Análise Estatística.....	18
4 RESULTADOS	20
5 DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXOS.....	31

1 INTRODUÇÃO

A consequência da infecção endodôntica é o desenvolvimento da periodontite apical (COLIC et al., 2010) caracterizada histologicamente por um tecido granulomatoso infiltrado por diferentes tipos de células inflamatórias (LUKIC; DANILOVIC; PETROVIC, 2008). Tais lesões são formadas devido à resposta do hospedeiro ao estímulo antigênico contínuo oriundo dos canais radiculares infectados (XIONG; WEI; PENG, 2009; ZHANG; PENG, 2005). A resposta do hospedeiro envolve o recrutamento de diferentes células inflamatórias e a participação de uma extensa rede de mecanismos imunológicos, incluindo a produção de citocinas (COLIC et al., 2010; XIONG; WEI; PENG, 2009). Sabe-se que estas citocinas são sintetizadas em resposta à presença de bactérias e seus produtos, os quais induzem e mantêm a resposta inflamatória (COLIC et al., 2010; FAN et al., 2011; XIONG; WEI; PENG, 2009), que se mostra associada à degradação da matriz extracelular e posteriormente à reabsorção óssea (GRAVES; OATES; GARLET, 2011; NAIR, 2004).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado de forma intensa a influência da infecção endodôntica sobre a saúde sistêmica (FAPESP 2012/02083-8; 2012/02565-2; 2013/26390-0; 2014/10324-0; 2015/03054-0; 2016/08005-0). Empregando modelo animal padronizado, verificamos que a infecção endodôntica, quando associada com a diabetes e com a doença periodontal, pode aumentar os níveis de triglicérides (CINTRA et al., 2013a), creatinina (CINTRA et al., 2013b), hemoglobina glicada (CINTRA et al., 2014c), mediadores próinflamatórios como a IL-17 (CINTRA et al., 2014a), além de alterar alguns parâmetros do hemograma, destacando-se a série branca (CINTRA et al., 2014b), bem como é capaz de alterar o sinal insulínico do sangue e do tecido muscular (ASTOLPHI et al., 2013, 2015). Além disso, a presença de quatro periodontites apicais foi capaz de aumentar os níveis de triglicérides (AZUMA et al., 2018a), células inflamatórias (AZUMA et al., 2017a), e mediadores pró- inflamatórios, como IL-17, IL-6, TNF- α , IL-23 e óxido nítrico (CINTRA et al., 2016) no tecido hematológico de ratos, o que sugere que a presença de múltiplos focos da infecção endodôntica exerce uma influência mais significativa e podem comprometer a homeostase de um indivíduo.

Outro objetivo do nosso grupo de pesquisa é o de buscar opções terapêuticas capazes de amenizar os efeitos causados pela presença da periodontite apical. Em estudos posteriores (Processos FAPESP 2013/26390-0 e 2015/03054-0), observamos que a suplementação alimentar com o ácido graxo ômega-3 não só inibiu a ação dos osteoclastos, levando a menor perda de estrutura óssea, como também promoveu o aumento de osteoblastos, levando à remodelação óssea (AZUMA et al., 2017b). Posteriormente, foram investigadas as citocinas pró-inflamatórias desses animais e observou-se que a suplementação foi capaz de diminuir a expressão de mediadores próinflamatórios como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, e aumentar a expressão de mediadores antiinflamatórios nos tecidos periapicais (AZUMA et al., 2018a). Os níveis séricos de triglicerídeos de ratos com periodontite apical também foram avaliados. Os resultados mostraram que o ômega-3 reduziu os níveis de triglicérides de ratos que foram previamente aumentados devido à presença de periodontite apical (AZUMA et al., 2018b), sendo assim, um possível coadjuvante no tratamento de lesões periapicais.

Produtos derivados de plantas também têm sido utilizados como alternativas de tratamento na terapia imunomoduladora e possuem efeitos benéficos em uma variedade de condições inflamatórias e doenças ósseas (CORRÊA et al., 2017, ZHOU et al., 2013). Neste sentido, um exemplo de produto derivado de plantas é a curcumina, que é um polifenol amarelo extraído do rizoma de uma planta tropical do Sudeste da Ásia (BISHT et al., 2011), a cúrcuma (curcuma longa), e possui múltiplas ações biológicas, incluindo ações anti-inflamatória, antioxidante, anti-angiogênica, imunomodulatória, citotóxica, antimicrobiana e pró ou antiapoptótica (ZHOU et al., 2013). Os efeitos antiinflamatórios da curcumina tanto no tratamento preventivo quanto no terapêutico têm sido observados em diversos estudos, como a gastrite causada por *Helicobacter pylori* em modelo animal (KUNDU et al., 2011), pneumonite alérgica sensibilizada por látex (KURUP et al., 2007), e até mesmo em estudo clínico da osteoartrite humana (BELCARO et al., 2010). Estudos envolvendo a administração sistêmica de curcumina mostraram os seus efeitos benéficos numa variedade de condições inflamatórias por várias moléculas sinalizadoras, incluindo TNF- α (CHAN, 1995), IL-6 (BERESWILL et al., 2010) e IL-1 β (CHO; LEE; KIM, 2007).

Embora uma gama biológica e farmacológica sobre as ações da curcumina tenham sido relatadas (CHO; LEE; KIM, 2007, EGAN et al., 2004), não existem ainda estudos que investiguem os efeitos da curcumina na periodontite apical. Com relação à doença periodontal, a curcumina demonstrou potente atividade anti-inflamatória em modelos animais com periodontite (GUIMARÃES et al., 2011, 2012). Além disso, a suplementação com a curcumina foi capaz de diminuir a perda óssea alveolar em ratos portadores de periodontite experimental, em que foram observadas reduções acentuadas no desenvolvimento do infiltrado inflamatório e um aumento no conteúdo de colágeno, assim como maior número de células fibroblásticas no periodonto (CORRÊA et al., 2017; ZHOU et al., 2013). Em estudo realizado em vitro, foi demonstrado a curcumina inibe as expressões gênicas e proteicas das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β em células RAW264.7 (linha celular de macrófagos de rato) tratada com lipopolissacárido (LPS) (CHEN et al., 2008). Estas vantagens observadas tanto in vitro quanto em modelos experimentais fazem com que a curcumina se torne um possível coadjuvante na terapia da doença periodontal.

A curcumina é capaz de inibir enzimas envolvidas na inflamação, a ciclooxigenase-2 e a lipoxigenase (GULCUBUK et al., 2006), assim como atua o ácido graxo ômega-3. Sua ação anti-inflamatória pode estar relacionada a supressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores como TNF- α , IL-1 β , e óxido nítrico sintase. Os mecanismos biológicos da curcumina parecem envolver, além da regulação de citocinas, proteínas quinases e outras enzimas, também a regulação de vários outros alvos moleculares, incluindo fatores de transcrição e fatores de crescimento (CORRÊA et al., 2017). O tratamento com a substância em questão durante a periodontite experimental poderia suprimir a expressão de RANKL/RANK/osteoprotegerina (OPG), bem como reduzir as concentrações de IL-6 e TNF- α em tecidos gengivais, ações que suprimiriam a formação de osteoclastos e consequente reabsorção óssea (CORRÊA et al., 2017). Além disso, em outro estudo realizado, a curcumina foi capaz de reduzir significativamente a inflamação gengival e modular a perda de fibra colágena e osso alveolar (XIAO et al., 2018).

Neste contexto, todos estes estudos demonstraram resultados positivos da curcumina na reabsorção óssea em modelo experimental da doença periodontal em ratos. De forma semelhante aos estudos realizados com o ômega-3 pelo nosso

grupo de pesquisa, a proposta deste trabalho é verificar o efeito da suplementação alimentar à base de curcumina frente à reabsorção óssea em modelo animal padronizado para a periodontite apical.

2 PROPOSIÇÃO

Verificar se a suplementação alimentar com a curcumina será capaz de diminuir a reabsorção óssea em ratos portadores de periodontite apical.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP. Os animais foram mantidos em mini-isoladores (Alesco- Monte Mor, São Paulo, Brasil) com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e grupo de quatro ratos por mini-isolador, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 24 horas após intervenção. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pelo comitê de conduta e ética no uso de animais em experimentação (CEUA 00905-2018 – FOA/Unesp).

Para anestesia dos animais foi utilizado, via intra-muscular, um sedativo a base de xilazina (Dopasere, Calier S.A - Barcelona, Espanha- 10mg/kg) e um anestésico à base de cloridrato de ketamina a 5% (Vetanarcol, Konig S.A.- Avellaneda, Argentina- 25mg/kg).

3.2 Métodos

3.2.1- Suplementação alimentar

Os ratos (grupos CUR e PA+CUR) receberam, por meio de gavagem, a Curcumina (Sigma-Aldrich Co. - St. Louis, MO), na proporção de 100mg/kg dissolvido em álcool a 9% (etanol), durante 15 dias antes da exposição pulpar e 30 dias depois, totalizando 45 dias de suplementação. A suplementação realizada 15 dias antes da exposição pulpar é chamada de suplementação profilática. Já a suplementação realizada após a exposição pulpar é chamada de suplementação terapêutica. Estudos sugerem que a suplementação profilática com a curcumina deva ser realizada por apenas um dia e a suplementação terapêutica por 30 dias (CORRÊA et al., 2017; ZHOU et al., 2013). Não foram encontrados estudos na literatura em que se realizou a suplementação profilática por 15 dias, assim,

preferimos seguir o protocolo adotado em nossos estudos anteriores realizados com o ômega-3, (Processos FAPESP 2013/26390-0 e 2015/03054-0), visto que o mecanismo de ação do ômega-3 e da curcumina são semelhantes.

3.2.2 Indução das lesões periapicais

Para a indução das lesões periapicais, 20 ratos (grupos IE e IE+CUR) foram anestesiados, via intra-muscular, com uma associação do sedativo Dopaser, à base de xilazina (relaxante muscular, analgésico e sedativo), na dosagem de 10mg/kg de peso corporal e o anestésico Vetanarcol, à base de cloridrato de ketamina a 5% na dosagem de 25mg/kg de peso corporal. As polpas dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito foram expostas, por meio de uma broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro. Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas com 0,1mm de diâmetro (Cintra et al., 2013a) e as polpas ficaram expostas na cavidade bucal por um período de 30 dias, momento do sacrifício.

3.2.3 Divisão em grupos

Os 40 ratos em estudo foram divididos em quatro grupos experimentais, contendo 10 animais cada grupo, assim compostos:

- Grupo C: ratos controle;
- Grupo CUR: ratos com suplementação alimentar com curcumina;
- Grupo PA: ratos portadores de periodontite apical;
- Grupo (PA+CUR): ratos portadores de periodontite apical com suplementação com curcumina.

3.3 Coleta de Material para Análise

3.3.1 Coleta da maxila

Após a eutanásia, toda a pele correspondente à face direita do animal foi removida e foram realizados dois cortes com tesoura, no ângulo da boca, para separar a maxila da mandíbula. Foi realizada uma incisão, com lâmina de bisturi intercambiável número 15, em profundidade no palato do animal, com localização no plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar, para separar a maxila esquerda da direita. Separadas as maxilas, com o auxílio de uma tesoura, foi realizado outro corte com localização tangente a face distal dos molares superiores direito e esquerdo, possibilitando a obtenção da hemi-maxila direita, contendo os dentes posteriores, objeto do estudo.

3.4 Processamento Histológico

As hemi-maxilas direitas foram colocadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução de formaldeído 4%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 18 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas para a remoção de toda a solução de fixação. Após a fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA a 10%. Posteriormente, as hemi-maxilas foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos primeiros molares inferiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal. Após a inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, realizados em micrômetro (Leica- RM 2045).

3.5 Forma de Análise dos Resultados

3.5.1 Análise histológica e histométrica das lesões periapicais

A análise histológica das hemimaxilas serviu para caracterização do perfil

inflamatório das lesões periapicais (CINTRA et al., 2014a). Os resultados foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra qualitativa. As lâminas contendo os cortes representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise descritiva consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais (CINTRA et al., 2014c).

A análise qualitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando as magnitudes dos fenômenos histopatológicos de forma dissociada e da análise histométrica das estruturas do periodonto apical (CINTRA et al., 2014c). A variável estudada foi o infiltrado inflamatório, quanto à sua intensidade e extensão, e perda de estrutura óssea periapical. Foram atribuídos escores para os critérios intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e para a perda de estrutura óssea foi realizada a mensuração por área, empregando programa de imagens específico (Leica LAS X - Leica Microsystems, Nussloch – Germany).

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário. Foram considerados score 1, para células inflamatórias ausentes ou em número desprezível; score 2, para infiltrado inflamatório discreto (menos de 10 células por campo); score 3, para infiltrado inflamatório moderado (entre 10 e 25 células por campo); e score 4, para Infiltrado inflamatório severo (mais que 25 células por campo).

A análise histométrica foi realizada nos grupos PA e PA+CUR para a verificação da perda óssea de ratos em função da suplementação da curcumina. Foi empregado o software Leica LAS X (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) e os valores foram expressos em micrometro quadrado (μm^2) obtidos em medidas de área.

3.5.2 Análise Estatística

De posse dos dados obtidos na forma de escores, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (SIEGEL et al., 1956), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (DUNN, 1958).

Para os dados obtidos em medidas de área foram aplicados o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. Para todos os testes empregados foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

A análise histológica das lesões periapicais foi realizada por meio da análise descritiva dos fenômenos histopatológicos, pela atribuição de scores ao infiltrado inflamatório e pela análise histométrica, correspondente a área de reabsorção óssea junto ao periápice (em micrômetros quadrados) em todos os animais dos grupos PA e PA+CUR. As imagens correspondentes aos cortes histológicos podem ser observadas na Figura 1. Os scores atribuídos podem ser observados na Tabela 1 e a análise histométrica na Tabela 2.

Grupo Controle

No grupo C, observou-se tecido pulpar com aspectos de normalidade denotando homeostasia pulpar. A pré-dentina e a dentina apresentaram-se íntegras e dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também organizada. Poucas células inflamatórias estavam dispersas e, ao acaso, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentavam-se congestionados e a densidade do fibrosamento caracterizou polpa jovem. O cemento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e isentos de processo inflamatório ou reabsorção patológica. A inserção conjuntiva e o epitélio juncional demonstraram aspectos de normalidade e integridade tecidual. Este grupo serviu de parâmetro para a análise dos demais grupos onde o comprometimento das estruturas dentárias e de sustentação foram avaliados.

Grupo PA

Pôde-se observar em todos os espécimes deste grupo a presença de tecido necrosado em toda a cavidade pulpar com extensão ao periápice dentário. No período de 30 dias houve a predominância do infiltrado inflamatório do tipo severo em 7 dos 10 espécimes, sendo os outros 3, infiltrado inflamatório moderado. Neste período, a perda óssea média na região periapical foi de $62,02 \times 10^4 \mu\text{m}^2$. A região do

ligamento periodontal, junto ao vértice apical, apresentou-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação subjacente em todos os casos. Todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical com origem devido à necrose pulpar.

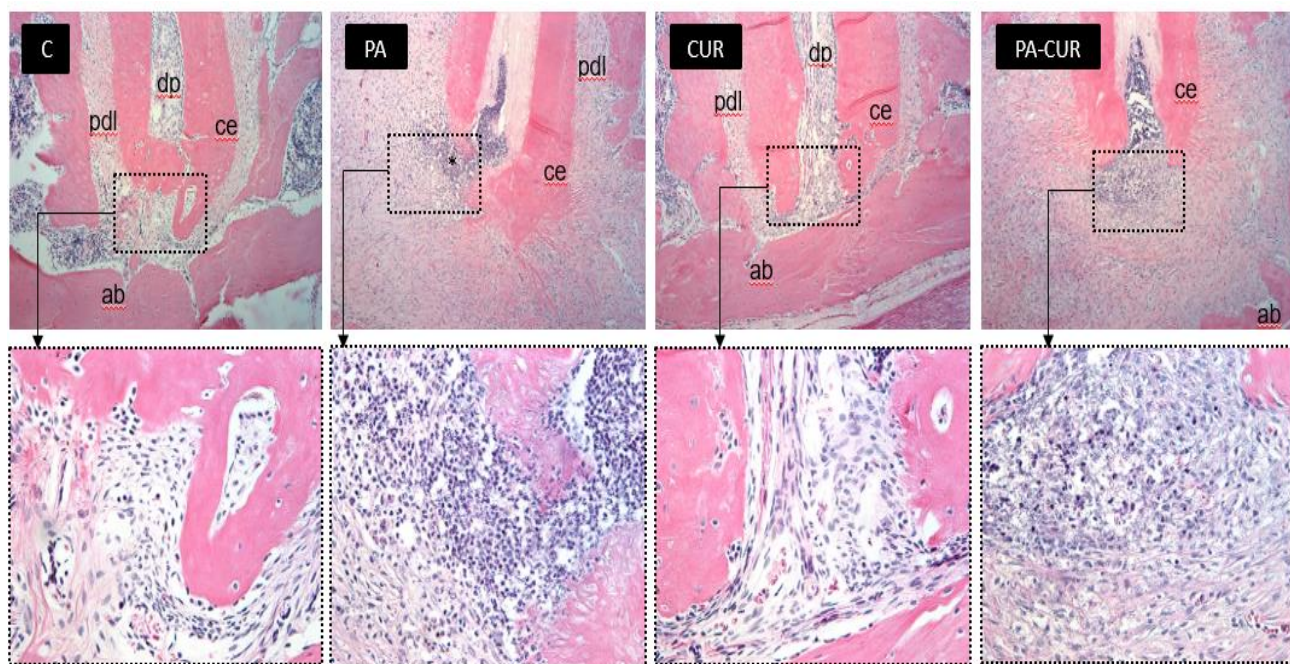
Grupo CUR

Assim como no grupo C, observou-se tecido pulpar com aspectos de normalidade denotando homeostasia pulpar. A pré-dentina e a dentina apresentaram-se íntegras e dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também organizada. Poucas células inflamatórias estavam dispersas e, ao acaso, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentavam-se congestionados e a densidade do fibrosamento caracterizou pulpa jovem. O cimento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e isentos de processo inflamatório ou reabsorção patológica. A inserção conjuntiva e o epitélio juncional demonstraram aspectos de normalidade e integridade tecidual.

Grupo CUR+PA

Pôde-se observar em todos os espécimes analisados presença de tecido necrosado em toda a cavidade pulpar com extensão ao periápice dentário. No período de 30 dias houve a predominância do infiltrado inflamatório do tipo discreto em 3 espécimes, 4 casos de infiltrado inflamatório moderado e 3 casos severo. Neste período, a perda óssea média na região periapical foi de $59,97 \times 10^4 \mu\text{m}^2$. A região do ligamento periodontal, junto ao vértice apical, apresentou-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação subjacente em todos os casos. Todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical com origem devido à necrose pulpar.

FIGURA 1 - Imagens histológicas das lesões periapicais aos 30 dias, em aumentos de 100x e 400x, após a exposição da polpa ao ambiente oral (coloração H&E). (C) Grupo C. As regiões apical e periapical estão livres de infiltrado inflamatório. (PA) Grupo PA. Pode-se observar um infiltrado inflamatório severo na área ao redor do ápice dentário e extensa área de reabsorção óssea. (CUR) Grupo CUR. Semelhante ao grupo C, a polpa e os tecidos periodontais são mostrados com aspecto de normalidade. (PA+CUR) Grupo PA+CUR. Pode-se observar um infiltrado inflamatório moderado na área ao redor do ápice dentário e área de reabsorção óssea



Fonte: Autor (2019)

TABELA 1 - Mediana dos scores atribuídos para análise histológica de todos os grupos

Parâmetro histológico	Escores	Grupos				P Value
		C	PA	CUR	PA-CUR	
Intensidade do infiltrado inflamatório	1	10/10	0/10	10/10	0/10	Teste de Kruskal Wallis p = <0.001
	2	0/10	0/10	0/10	3/10	
	3	0/10	3/10	0/10	4/10	
	4	0/10	7/10	0/10	3/10	
	Mediana*	1 ^a	4 ^b	1 ^a	3 ^c	

*Letras iguais nas colunas indicam a ausência de diferenças estatísticas entre grupos (p> 0,05).

Fonte: Autor (2019)

TABELA 2 - Valores médios de área ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$) e percentual de perda óssea para análise histométrica dos grupos PA e PA+CUR

Grupos	Área $\times 10^4 \mu\text{m}^2$ (Média $\pm$ DP)	%
C	-	-
PA	62,02 $\pm$ 6,13 ^b	68,91
CUR	-	-
CUR+PA	59,97 $\pm$ 6,81 ^b	66,68
Análise estatística	P= 0,49	

*Letras iguais nas colunas indicam a ausência de diferenças estatísticas entre grupos (p>0,05).

Fonte: Autor (2019)

Comparação entre os grupos

Pôde-se observar infiltrado inflamatório de característica severa no grupo PA, enquanto no grupo suplementado com curcumina (PA+CUR) apresentou-se moderado com diferença estatisticamente significativa (p<0,05). Empregando-se a análise histométrica dos corte teciduais, não foi possível detectar diferença entre os grupos PA e PA+CUR quanto à perda de estrutura óssea periapical (p>0,05).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo empregamos o modelo da periodontite apical induzida por meio da exposição pulpar de molares de ratos, permitindo o desenvolvimento da infecção bacteriana a partir do ambiente oral no período de 30 dias (CINTRA et al., 2013b, 2014c). Na análise histológica, todos os espécimes submetidos à indução da infecção endodôntica (grupos PA e PA+CUR), demonstraram a presença de lesão periapical, comprovando o modelo experimental.

A inflamação nos tecidos periapicais é uma resposta imune contra as bactérias que estão alojadas no tecido pulpar necrótico. Para mediar tal resposta, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-17) são produzidas localmente e podem estimular a osteoclastogênese e a reabsorção óssea, desenvolvendo a periodontite apical (AZUMA et al., 2018b).

Os resultados da análise do infiltrado inflamatório demonstraram que o grupo PA apresentou um infiltrado inflamatório mais intenso quando comparado ao grupo que recebeu a suplementação alimentar com a curcumina (PA+CUR). Entretanto, quando realizada a análise histométrica das lesões periapical, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre ambos os grupos.

A curcumina, o componente mais ativo do rizoma da cúrcuma longa, é estudada há muitos anos devido às suas propriedades biofuncionais, especialmente atividades antioxidantes, eliminadoras de radicais livres, antimicrobianas e anti-inflamatórias (TEJADA et al., 2016). Na medicina, tem sido amplamente estudada em doenças crônicas como patologias metabólicas, cardiovasculares e neurodegenerativas (TEJADA et al., 2016). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível notar que a curcumina obteve melhores resultados como agente anti-inflamatório, não atuando de forma tão precisa no processo de reabsorção óssea. A atividade anti-inflamatória da curcumina já é alvo de inúmeros estudos realizados em animais portadores de doença periodontal (GUIMARÃES et al., 2011, 2012), onde mostraram que a curcumina reduziu efetivamente a inflamação e o desarranjo de tecido conjuntivo no modelo experimental de periodontite, além de fornecer evidências de que esse efeito possa ser explicado pela inibição da expressão de IL-6, PGE2 e TNF- α , como resultado da modulação

da ativação de NF-kB.

Estudos futuros empregando a análise de citocinas inflamatórias se fazem necessários para entender o mecanismo de ação da curcumina na modulação do processo inflamatório em infecções de origem endodôntica, assim como já evidenciado em artigos que empregaram a suplementação com ômega-3 (AZUMA et al., 2017b, 2018b).

O metabolismo, absorção, biodistribuição e excreção da curcumina em roedores foram relatados em vários estudos e os resultados gerais sugeriram que a curcumina tem baixa absorção e rápida depuração após o uso oral, o que já foi apontada como uma possível razão para limitar o desempenho completo de todos os benefícios da substância (MIRZAEI et al., 2017).

Nossos resultados não puderam identificar diferenças no grau de reabsorção óssea periapical em função da curcumina, o que pode estar relacionado com a forma de análise empregada. Entretanto, Xiao e colaboradores (2018), utilizando a análise por micro-CT, demonstraram que a curcumina reduziu significativamente a perda óssea, analisando a altura da crista alveolar, em modelo animal para doença periodontal, além da redução no infiltrado inflamatório, também por nós verificada no modelo da periodontite apical.

Diante dos resultados expostos, tornam-se necessários mais estudos a fim de se verificar, de forma mais específica, o infiltrado inflamatório; assim como, a capacidade da curcumina em interferir na reabsorção óssea de lesões periapicais de origem endodôntica, por meio de exames de imagem mais detalhados.

6 CONCLUSÃO

A suplementação alimentar com curcumina foi capaz de reduzir o perfil inflamatório em ratos portadores de periodontite apical.

REFERÊNCIAS

Astolphi RD, Curbete MM, Chiba FY, Cintra LT, Ervolino E, Mota MS, et al. Periapical lesions decrease insulin signaling in rat skeletal muscle. *J Endod.* 2015;41(8):1305-10.

Astolphi RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AK, et al. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *J Endod.* 2013;39(5):648-52.

Azuma MM, Gomes-Filho JE, Prieto AKC, Samuel RO, Lima VMF, Sumida DH, et al. Diabetes increases interleukin-17 levels in periapical, hepatic, and renal tissues in rats. *Arc Oral Biol.* 2017a;83:230-235.

Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Pipa CB, Cardoso CBM, Andrada AC. Omega 3 fatty acids reduce bone resorption while promoting bone generation in rat apical periodontitis. *J Endodod.* 2017b;43(6):970–6.

Azuma MM, Gomes-Filho JE, Cardoso CBM, Pipa CB, Narciso LG, Bomfim SRM, et al. Omega 3 fatty acids reduce the triglyceride levels in rats with apical periodontitis. *Braz Dental J.* 2018a;29(2):173-8.

Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Cardoso CBM, Pipa CB, Kawai T. Omega-3 fatty acids reduce inflammation in rat apical periodontitis. *J Endod.* 2018b;44(4):604-8.

Belcaro G, Cesarone MR, Dugall M, Pellegrini L, Ledda A, Grossi MG, et al. Efficacy and safety of Meriva(R), a curcumin-hosphatidylcholine complex, during extended administration in osteoarthritis patients. *Altern Med Rev.* 2010;15:337–44.

Bereswill S, Muñoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kühl AA, Loddenkemper C, Göbel UB, Heimesaat MM. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One.* 2010 Dec 3;5(12):e15099.

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.

Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol.* 1995;49:1551–6.

Chen D, Nie M, Fan MW, Bian Z. Anti-inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*. *Pharmacology.* 2008;82:264–9.

Cho JW, Lee KS, Kim CW. Curcumin attenuates the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α as well as cyclin E in TNF- α -treated HaCaT cells; NF- κ B and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med.* 2007;19:469–74.

Cintra LT, Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolphi RD, Bomfim SR, et al. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clin Oral Investig.* 2013a;17:1595-9.

Cintra LT, Facundo ACS, Valentim D, Prieto AKC, Silva CO, Sumida DH, et al. Effect of oral infections on serum creatinine levels in diabetic rats. *Int J Diabet Vasc Dis Res.* 2013b;1(3):1-6.

Cintra LT, Facundo ACS, Prieto AKC, Sumida DH, Narciso LG, Bomfim SRM, et al. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *J Endod.* 2014a;40:1139-44.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, Lima VM, et al. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig.* 2014b;18:2123-8.

Cintra LT, Samuel RO, Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Bomfim SR, et al. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J.* 2014c;47:228-37.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, et al. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *J Endod.* 2016;42(5):747-51.

Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesion. *Mol Immunol.* 2010;47:101-13.

Corrêa MG, Pires PR, Ribeiro FV, Pimentel SP, Casarin RCV, Cirano FR, et al. Systemic treatment with resveratrol and/or curcumin reduces the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res.* 2017;52:201–9.

Dunn, OJ. Estimation of the Means of Dependent Variables. *The Annals of Mathematical Statistics.* 1958; Volume 29, Number 4, 1095-1111.

Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glockner-Pagel J, et al. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science.* 2004;304:600–2.

Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J.* 2011;124:2162-6.

Graves D T, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011;17:3.

Guimarães MR, Coimbra LS, 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;46:269–79.

Guimarães MR, 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;18:155–63.

Gulcubuk A, Altunatmaz K, Sonmez K, Haktanir-Yatkin D, Uzun H, Gurel A, et al. Effects of curcumin on tumour necrosis factor- α and Interleukin-6 in the late

phase of experimental acute pancreatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2006;53(1):49-54.

Kundu P, De R, Pal I, Mukhopadhyay AK, Saha DR, Swarnakar S. Curcumin alleviates matrix metalloproteinase-3- and -9 activities during eradication of *Helicobacter pylori* infection in cultured cells and mice. *PLoS One.* 2011;6:16306.

Kurup VP, Barrios CS, Raju R, Johnson BD, Levy MB, Fink JN. Immune response modulation by curcumin in a latex allergy model. *Clin Mol Allergy.* 2007;5:1.

Lukic A, Danilovic V, Petrovic R. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions. *Vojnosanit Preg.* 2008;65:435–40.

Mirzaei H, Shakeri A, Rashidi B, Jalili A, Banikazemi Z, Sahebkar A. Phytosomal curcumin: a review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. *Biomed Pharmacother.* 2017;85:102-12.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:348-81.

Siegel, S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. *The Journal of Nervous and Mental Disease.* 1956; 125(3), 497

Tejada S, Manayi A, Daglia M, Nabavi SF, Sureda A, Hajheydari Z, et al. Wound healing effects of curcumin: a short review. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(11):1002-7.

Xiao CJ, Yu XJ, Xie JL, Liu S, Li S. Protective effect and related mechanisms of curcumin in rat experimental periodontitis. *Head Face Med.* 2018;14(1):12.

Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *J Endod.* 2009;35:216-20.

Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand

in rat periapical lesions. J Endod. 2005;31:574–7.

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;71:349-56.

ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito da suplementação alimentar à base de curcumina na reabsorção óssea de ratos Wistar com periodontite apical"**, Processo FOA nº 00905-2018, sob responsabilidade de Luciano Tavares Angelo Cintra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 13 de Dezembro de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 13 de Dezembro de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 13 de Janeiro de 2020.