



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



DAYANE DE ALMEIDA BRANDÃO

**MODULAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL POR CURCUMIN
MODIFICADO QUIMICAMENTE. ESTUDO DE DOSE-RESPOSTA
EM ROEDOR**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



DAYANE DE ALMEIDA BRANDÃO

**MODULAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL POR CURCUMIN
MODIFICADO QUIMICAMENTE. ESTUDO DE DOSE-RESPOSTA
EM ROEDOR**

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: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara

2016

Brandão, Dayane de Almeida

Modulação da doença periodontal por curcumin modificado quimicamente. Estudo de dose-resposta em roedor / Dayane de Almeida Brandão.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

68 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Co-orientador: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

1. Periodontia 2. Curcumina 3 Reabsorção óssea I. Título

DAYANE DE ALMEIDA BRANDÃO

**MODULAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL POR CURCUMIN
MODIFICADO QUIMICAMENTE. ESTUDO DE DOSE-RESPOSTA EM ROEDOR**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

2º Examinador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

3º Examinador: Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra

Araraquara, 18 de março de 2016.

DADOS CURRICULARES

Dayane de Almeida Brandão

Nascimento	17 de julho de 1990 – Anápolis, Goiás.
Filiação	Welton Luiz Brandão Weslene Rabelo de Almeida Brandão
2008 – 2013	Graduação em Odontologia Universidade Federal de Goiás
2014 – 2016	Pós-Graduação em Periodontia Nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista – UNESP

DEDICATÓRIA

A Deus,

Que me deu o dom da vida, que me deu saúde, inteligência para que hoje eu pudesse estar aqui, celebrando essa vitória. Se hoje estou concretizando esse sonho é porque Deus me amou e permitiu que coisas boas acontecessem na minha vida. Devo agradecer porque minhas preces foram ouvidas e nunca fique sem respostas.

*Aos meus pais, **Weslene e Welton***

Deus é tão bom que colocou na minha vida anjos. E à eles também que devo agradecer. Aos meus pais, que acreditaram em meus sonhos, que fizeram inúmeras orações para que eu fosse mais feliz, que me ensinaram a base da dedicação e persistência, que esculpiram meu caráter e lapidaram os meus valores. Fizeram-me crescer e hoje são responsáveis pela minha vitória, são responsáveis pelos passos certos que dei.

*Ao meu irmão, **Weber***

Por ter sido meu companheiro, meu chamego e minha maior relação de amor já sentida.

*Ao meu namorado, **Daniel***

Por sempre me dar forças e acreditar em mim. Por muitas vezes, ter sido meu conforto. E por sempre ficar feliz com as minhas vitórias.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Ao Prof. **Carlos Rossa Junior,***

Por me mostrar o caminho da ciência. Obrigada por ter me ensinado muito. Agradeço pelo conhecimento e pela paciência que teve. Por seu exemplo de ética e cidadania, por dedicação à sua profissão, tanto como pesquisador quanto professor. Obrigada por repartir sua experiência comigo, por ter me moldado.

*A co-orientadora **Morgana Rodrigues Guimarães,***

Obrigada por todos os ensinamentos! Por toda paciência do mundo para me ensinar experimentos tão desconhecidos no início. Pela orientação precisa, mesmo com a distância. Por muitas vezes, me aconselhar não apenas sobre pesquisa, mas também com conselhos para a vida.

*Aos amigos **Kahena Soldati, Jonleno Coutinho e Romerito Lins,***

Éramos desconhecidos e aos poucos nossos laços de amizade ficavam cada vez mais fortes e tivemos que aprender a repartir nossas ansiedades, nossas alegrias e a saudade da família. Impossível esquecer as fraquezas, em que um ombro amigo nos servia de apoio. Elos foram criados e fortalecidos com o tempo, a distância física e o tempo poderão nos afastar, mas não impedirão que a cada história narrada aos nossos filhos e netos, a cada fotografia recordada, estejam presentes boas e eternas lembranças do grande aprendizado e momento felizes que passamos juntos.

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 que percorreram comigo esse caminho, obrigada pelas experiências transmitidas e pelo convívio diário.

A todos os funcionários e amigos da Disciplina de Periodontia: **Maria José**, **Claudia**, **Leandro**, **Isabella** e **Suleima**, 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.

“É por isso que a gente deve amar o que faz. Porque quando a gente ama consegue fazer sempre mais e melhor”.

Clarissa Correa.

Brandão DA. Modulação da doença periodontal por curcumin modificado quimicamente. Estudo de dose-resposta em modelo de roedor. [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Curcumin é um polifenol amarelo extraído do rizoma de uma planta tropical, do tipo herbácea. Possui ações anti-inflamatória, antioxidante, antiangiogênica, imunomodulatória, citotóxica, antimicrobiana e antiapoptótica. A aplicação terapêutica do curcumin vem sendo avaliada em modelos pré-clínicos e estudos de várias doenças. As limitações da eficácia do curcumin in vivo são atribuídas à sua má solubilidade em veículos aquosos e baixa taxa de absorção no trato gastrointestinal. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dose-resposta do composto sintético análogo ao curcumin (CMC2.24) em diferentes doses (1 mg, 3 mg, 10 mg, 30 mg) sobre o processo inflamatório e osteoclastogênese em modelo de doença periodontal in vivo e in vitro, para analisar qual é a dose mínima necessária para que o composto tenha o efeito biológico. A doença periodontal foi induzida em ratos por meio de injeção de 30 µg de LPS de *Escherichia coli*, realizadas 3x/semana durante 4 semanas. Os controles receberam injeções do mesmo volume do veículo de diluição do LPS (PBS). A administração de CMC2.24 (1, 3, 10 e 30mg/kg) foi feita por via intragástrica (gavagem oral) diariamente, durante 29 dias (um dia antes da primeira injeção de LPS/PBS). A expressão de fosfatase ácido tartarato resistente (TRAP), indicativa de diferenciação osteoclástica, foi avaliada por meio de imunohistoquímica, a proporção de células inflamatórias, em cortes corados com H/E, por estereometria, a presença de citocinas através do PCR em tecido gengival e a reabsorção óssea por análise de coloração por azul de metileno e microtomografia computadorizada. Nos experimentos in vitro, macrófagos foram estimulados com microrganismos e tratados com CMC2.24 em concentração de 1, 3, 10 e 30 µM. A expressão gênica foi avaliada através de PCR e ELISA, enquanto fagocitose e quantificação de espécies reativas de oxigênio foram avaliadas por atividade fagocitária e produção de ROS, respectivamente. De acordo com os resultados, CMC2.24 reduziu significativamente o infiltrado inflamatório. Além disso, CMC diminuiu significativamente a quantidade de células TRAP positiva a partir de 3 mg/kg e a perda óssea alveolar, a partir de 1 mg/kg. In vitro, experimentos utilizando macrófagos demonstraram que o CMC inibe a produção de TNF e IL-10 após estímulos microbianos. Além disso, CMC2.24 também inibiu atividade fagocitária e estimulou a produção de ROS. CMC2.24 em diferentes doses demonstrou potencial terapêutico para aplicação em doença periodontal, devido à inibição da resposta inflamatória e também foi efetivo na redução da reabsorção óssea inflamatória.

Palavras-chave: Periodontia. Curcumina. Reabsorção óssea.

Brandão DA. Modulation of periodontal disease curcumin chemically modified. Dose-response studies in murine model. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Curcumin is a yellowish polyphenol extracted from the rhizome of a herbaceous tropical plant. It has multiple biological activities described, including anti-inflammatory, antioxidant, antiangiogenic, immunomodulatory, cytotoxic, antimicrobial and pro- and antiapoptotic activities. Its therapeutic application is actively evaluated in preclinical models and clinical studies of various diseases. In vivo use of curcumin is limited by its pharmacodynamic properties, such as poor solubility in aqueous vehicles, low absorption rate in the gastrointestinal tract and short half-life in the peripheral circulation. The aim of this study was to evaluate the dose-response effect of a synthetic compound that is structurally to natural curcumin (CMC2.24) in a model of experimental periodontal disease that mimics the host-microbial interaction and the resultant inflammation and bone resorption that are hallmarks of this conditions in humans. Periodontal disease was induced in mice by injection of 30 ug LPS of *Escherichia coli*, carried out 3x / week for 4 weeks. Controls received injections of the same volume of vehicle (PBS). Administration of CMC2.24 (1, 3, 10 and 30mg / kg) was performed daily (starting the day before the first LPS/PBS injection) by oral gavage (1, 3, 10 and 30 mg/Kg) during the whole experimental period. Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was used to identify osteoclasts in the area of interest; the inflammatory infiltrate was assessed by stereometric/morphological analysis in H/E-stained sections; expression of candidate inflammatory cytokines in the gingival tissue determined by RT-PCR and the extent of inflammatory bone resorption quantitated macroscopic analysis of the area of exposed root surface and also by computed microtomography. In in vitro experiments, murine macrophages were stimulated with periodontal disease-associated microorganisms in the presence and absence of CMC2.24 (1, 3, 10 and 30 uM). Gene expression was assessed by RT-PCR and ELISA; phagocytic activity was studied by immunocytofluorescence and production of reactive oxygen species was determined by a biochemical assay using a ROS-substrate that emit fluorescence upon cleavage. In vivo, administration of CMC2.24 significantly reduced the inflammatory infiltrate, and the number of osteoclasts starting at the 3 mg/Kg dosage; whereas inflammatory bone resorption was significantly inhibited already at the 1 mg/Kg dosage. In vitro, pre-treatment of macrophages with CMC2.24 markedly inhibited the production of TNF and IL-10 after microbial stimuli. CMC2.24 also inhibited phagocytic activity and stimulated production of ROS. We conclude that CMC2.24 at low doses (3 mg/Kg) has therapeutic potential for application in periodontal disease, due to inhibition of microbial-related inflammation.

Keywords: Periodontics. Curcumina. Bone resorption.

LISTA DE ABREVIATURAS

4NQO – óxido de nitroquinolina

AP-1 – proteína ativadora - 1

Bcl-2 – células B de linfoma-2

BSA – albumina sérica bovina

CMC – curcumin modificado quimicamente

DMSO – dimetilsufóxido

EMT – transição epitelial mesenquimal

IL- interleucina

LPS – lipopolissacarídeos

NF- β – fator de transcrição nuclear kappa B

NO – óxido nítrico

PBS - Tampão fosfato-salino

PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular

PG - *Porphyromonas gingivalis*

PMA – 13- acetato-12-myristate-forbol

RNS – espécies reativas de nitrogênio

ROS – produtos de oxigênio reativo

SOCS - supressor de sinalização de citocinas

SPF - Specified Pathogen Free

STAT - transdutores de sinais e ativadores de transcrição

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TRAP – fosfatase ácida tártaro-resistente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Curcumin: características e atividades biológicas	15
1.2 Curcumin e doença periodontal	17
1.3 CMC2.24: Composto sintético baseado no curcumin	19
2 PROPOSIÇÃO	21
3 MATERIAL E MÉTODO	22
3.1 Obtenção e manutenção dos animais	22
3.2 Administração dos compostos e indução da doença periodontal por injeção de LPS e PBS	22
3.3 Eutanásia dos animais, obtenção de amostras e delineamento experimental	24
3.4 Microtomografia computadorizada (μCT)	25
3.5 Azul de metileno	26
3.6 Imunohistoquímica - TRAP	27
3.7 Estereometria	29
3.8 PCR convencional - tecido gengival	30
3.9 Expressão gênica em macrófagos - PCR em tempo real	31
3.10 Atividade fagocitária	33
3.11 Produção de ROS	33
3.12 ELISA	34
3.13 Análise Estatística	35
4 RESULTADO	36
5 DISCUSSÃO	53

6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Curcumin: características e atividades biológicas

Curcumin é um polifenol amarelo extraído do rizoma (Figura 1b) de uma planta tropical do Sudeste da Ásia, (Bisht et al.¹⁰, 2011), do tipo herbácea pertencente à família das *Zingiberaceae*, a *Curcuma longa* (Figura 1a). Esse composto é largamente utilizado como condimento e agente colorante (Jacob et al.³², 2007).

Figura 1 - Curcumin. *Curcuma longa* (1a) e polifenol amarelo extraído do rizoma (1b).



Fonte: www.plantamundo.com

Com a massa molecular de 368,38 g/mol e ponto de fusão entre 179-183°C, o Curcumin apresenta-se como um pó praticamente insolúvel em água e éter, mas é dissolvido em metanol, etanol, acetona, dimetilformoldeído (DMF), dimetilsufóxido (DMSO), clorofórmio, acetonitrila (ACN), entre outros (Chignell et al.¹⁴, 1994). Sua estabilidade em meio aquoso melhora em pH alto (acima de 11.7), e embora alguns de seus componentes tenham se mostrado sensíveis à luz, os efeitos combinados de ar e luz não se mostraram deletérios (Goel et al.²¹, 2008).

Possui múltiplas ações biológicas, incluindo ações anti-inflamatória, antioxidante, anti-angiogênica, imunomodulatória, citotóxica, antimicrobiana e pró- ou anti-apoptótica. Sua aplicação terapêutica vem sendo intensamente avaliada em modelos pré-clínicos e estudos clínicos de várias doenças (Sharma et al.⁴³, 2005; Maheshwari et al.³⁶, 2006). Para aplicações terapêuticas, sua administração pode

ocorrer por via intraperitoneal (Swarnakar et al.⁴⁶, 2005), intravenosa (Zou et al.⁵⁴, 2013) ou oral (Guimarães et al.²⁷, 2011).

Estudos indicam que o curcumin tem valor terapêutico contra doenças crônicas, como: neoplasias, doenças neurológicas, cardiovasculares, pulmonares (Aggawal et al.¹, 2003; Aggarwal, Sung³, 2009; Ammon, Wahl⁵, 1991), devido à sua interferência nas vias de sinalização do ciclo celular (Anand et al.⁷, 2008).

A ação do curcumin foi avaliada em estudo prospectivo feito em 25 pacientes diagnosticados com diferentes tipos de câncer. Esses pacientes receberam doses gradativas de Curcuma entre 500 mg até 12 g ao dia durante 3 meses e não foi observada toxicidade até a dose de 8 g ao dia. Foi observada melhora histológica das lesões potencialmente malignas em 7 pacientes. Portanto, a cúrcuma apresentou um efeito biológico na quimioprevenção sem apresentar toxicidade (Cheng et al.¹³, 2001). Em modelo pré-clínico de câncer em ratos, a administração oral de curcumin suprimiu o crescimento tumoral, não apresentando toxicidade (Wilken et al.⁵¹, 2011). Um estudo do nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade quimiopreventiva do curcumin administrado sistematicamente na carcinogênese oral induzida por Óxido de nitroquinolina (4NQO). A administração de curcumin a 100mg//kg durante 12 semanas diminuiu a expressão de PCNA, Bcl-2, SOCS1 e STAT3 e diminuiu a expressão de genes associados com EMT (Gonçalves et al.²³, 2015)

Em avaliações in vivo, curcumin foi promissor na terapia do câncer, uma vez que provocou o aumento de células em apoptose através do aumento da atividade da caspase-3 (Dai et al.¹⁶, 2013). As caspases são um grupo de proteases baseadas em cisteínas que são essenciais para a apoptose celular, a caspase-3 cliva outros substratos protéicos da célula resultando no processo apoptótico, sendo conhecida como caspase efetora.

Com o objetivo de prevenir a resistência à insulina e diminuir obesidade e massa gorda em camundongos, suplementação de curcumin foi adicionado a uma dieta de alto teor lipídico, resultando em uma diminuição da lipogênese no fígado e na inflamação nos adipócitos (Shao et al.⁴², 2012). Além disso, outros estudos sobre diabetes e curcumin mostraram que ratos diabéticos tratados com curcumina incorporada ao iogurte, durante 31 dias na dose de 90 mg/kg, apresentavam melhores parâmetros fisiológicos e bioquímicos se comparados aos ratos diabéticos tratados com água ou iogurte (Gutierrez et al.²⁵, 2011).

Estudos mostraram que o curcumin é capaz de inibir o fator nuclear Kappa B (NF- κ B) (Aggarwal, Shishodia⁴, 2004), que está envolvido na expressão de genes ligados com a promoção de tumores, angiogênese, metástase e resistência aos fármacos antitumorais (Garg, Aggarwal¹⁹, 2002). O NF- κ B é um dos principais fatores de transcrição encontrado em mamíferos (Hoffman et al.³⁰, 1999; Bremner, Heirich¹² 2002), e participa da regulação de mais de 200 genes envolvidos com diversas funções celulares e, notoriamente, com inflamação (Pereira, Oaskley et al.⁴⁰, 2008).

O efeito do curcumin na osteoclastogênese mostrou que osteoclastos induzidos por RANKL foram formados tanto na sua presença como na sua ausência. O número de osteoclastos, porém, diminuiu com o aumento na concentração de curcumin (Bharti et al.⁹, 2004).

Além disso, por reduzir as espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio (RNS e ROS), o curcumin diminui a gravidade da lesão celular (Aggarwal et al.², 2006).

As limitações da eficácia do curcumin in vivo são atribuídas à sua má solubilidade em veículos aquosos e baixa taxa de absorção no trato gastrointestinal (Anand et al.⁶, 2007). Sua insolubilidade em água dificulta sua aplicação em meios biológicos. Vários veículos para o aumento da biodisponibilidade estão sendo desenvolvidos e testados usando diferentes técnicas de encapsulação envolvendo nano e micropartículas de caseína, proteína de soja, lipossomo, óleo de milho e etc (Mohanty, Sahoo³⁷, 2010). Alguns estudos de farmacocinética em animais demonstraram que a biodisponibilidade oral de curcumina é de apenas 1% em ratos (Yang et al.⁵⁰, 2007). O curcumin tem sido administrado com adjuvantes, como a piperina, com o intuito de diminuir sua rápida metabolização intestinal e aumentar sua concentração plasmática.

1.2 Curcumin e doença periodontal

A doença periodontal é uma doença com etiologia microbiana, iniciada pela interação do biofilme bacteriano com a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro. Esta condição é influenciada por fatores ambientais e sistêmicos, como o tabagismo e o diabetes (Shlossman et al.⁴⁴, 1990; Page, Kornman³⁹, 1997; Haffajee et al.²⁸, 2001).

Histopatologicamente, trata-se de uma infecção crônica do periodonto que compromete os tecidos não-mineralizados e mineralizados circundando os dentes, caracterizada pela degradação das fibras colágenas e como reabsorção do osso alveolar. Citocinas inflamatórias, bem como os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, além das MAPKinases, todos fatores modulados pelo curcumin, tem importante papel na patogênese das doenças periodontais (Holt et al.³¹, 2005; Kirkwood et al.³⁵, 2007).

O efeito do curcumin sobre a modulação da doença periodontal experimentalmente induzida in vivo foi avaliada a primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa. A administração oral de curcumin foi capaz de inibir significativamente a degradação do tecido conjuntivo e da matriz de colágeno, reduzindo o número de células inflamatórias e a produção de mediadores inflamatórios a níveis semelhantes aos do grupo controle, efeitos associados à ação inibitória do curcumin sobre a ativação de NF- κ B. (Guimarães et al.²⁷, 2011).

Curcumin inibiu a osteoclastogênese induzida por RANKL in vitro, reduzindo também a atividade dos osteoclastos. In vivo, em modelo pré-clínico, a administração do curcumin reduziu o número de células mononucleadas em doença periodontal. Nosso estudo anterior com uma forma quimicamente modificada de curcumin (CMC2.24) reduziu a atividade de osteoclastos, indicada pela redução da expressão de MMP-9 nas culturas celulares (Curylofo¹⁵, 2014).

O curcumin, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias já mencionadas, também favorece o reparo do tecido conjuntivo não-mineralizado por meio do aumento na deposição de colágeno, angiogênese e densidade de fibroblastos (Jagetia et al.³³, 2005).

Em estudos mais recentes do nosso grupo de pesquisa, a administração oral de curcumin modulou a resposta do hospedeiro utilizando modelo de doença periodontal induzida por LPS em roedor, diminuindo a inflamação, com ação potente na redução da prevalência de células polimorfonucleares. Também se observou diminuição na apoptose de osteócitos e de células presentes nos tecidos gengivais, tanto na presença quanto na ausência de inflamação induzida por LPS; além de inibir efetivamente a osteoclastogênese induzida por RANKL in vitro (Curylofo¹⁵, 2014).

Não apenas a diferenciação e atividade, mas também a sobrevivência dos osteoclastos é reduzida por curcumin. Experimentos in vitro demonstram que o tratamento de osteoclastos com 10 μ M de curcumin por 12 horas produziu

alterações morfológicas indicativas de apoptose, como condensação da cromatina e fragmentação nuclear, o que foi relacionado à potente ação inibitória de NF- κ B (Ozaki et al.³⁸, 2000).

Coletivamente, estes efeitos do curcumin sobre a inflamação, processo de reparo e a diferenciação, atividade e sobrevivência de osteoclastos sugerem um bom potencial para sua aplicação terapêutica nas doenças periodontais.

1.3 CMC2.24: Composto sintético baseado no curcumin

A síntese de compostos quimicamente modificados à base de curcumin é uma estratégia para a superação das limitações farmacocinéticas do composto natural. Além da melhora das propriedades farmacocinéticas, os análogos sintéticos do curcumin podem também favorecer as propriedades farmacológicas, enquanto mantém o padrão de segurança e ausência de citotoxicidade do composto natural. A variabilidade de resultados nos estudos utilizando curcumin natural pode ser devido à mistura de ésteres do curcumin. Existem formas do curcumin que apresentam efeitos pró-inflamatórios e citotóxicos, e outras com efeitos predominantemente anti-inflamatórios. O CMC2.24 é constituído primariamente de bis-dimetoxi-curcumin, forma associada à efeitos anti-inflamatórios, mantendo um padrão de segurança e ausência de citotoxicidade similar ao composto natural (Curylofo¹⁵, 2014).

Como os aspectos positivos do curcumin, como sua potente ação antiinflamatória e virtual ausência de toxicidade e efeitos colaterais, suportam o interesse em suas ações terapêuticas, os laboratórios da State University of New York at Stony Brook desenvolveram versões sintéticas quimicamente modificadas do curcumin (CMCs, *chemically-modified curcumins*) com objetivo de melhorar suas propriedades farmacológicas e biológicas. Existem relatos de variações importantes nas propriedades biológicas dos CMCs, com alguns compostos mais potentes e outros menos efetivos em comparação ao composto natural (Anand et al.⁸, 2008).

CMC2.24 utilizado nesta proposta apresenta baixa toxicidade e potente ação inibitória de metaloproteases de matriz (matrix metalloproteinases, MMPs) que formam um grupo de enzimas com a habilidade comum de degradar vários componentes da matriz extracelular.

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.

Estudos anteriores do nosso grupo, mostraram que a dose de 30 mg/Kg foi capaz de reduzir significativamente a reabsorção óssea inflamatória e o número de osteoclastos presentes nas proximidades do osso alveolar (Elburki et al.¹⁷, 2014). O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dose-resposta do composto sintético análogo ao curcumin (CMC2.24) em diferentes doses (1mg, 3 mg, 10 mg, 30 mg) sobre o processo inflamatório e osteoclastogênese em modelo de doença in vivo e in vitro, para analisar qual é a dose mínima necessária para que o composto tenha o efeito biológico esperado. A verificação do efeito dose-resposta pode ter importantes implicações no aspecto farmacológico/biológico, uma vez que nem sempre o efeito é diretamente proporcional à dose; e também implicações no aspecto econômico/segurança, uma vez que é possível que doses menores tenham o mesmo efeito biológico desejável.

2 PROPOSIÇÃO

A hipótese principal desta pesquisa é que existe um efeito dose-resposta do CMC2.24 administrado sistemicamente sobre o turnover do tecido ósseo durante os processos de progressão e reparo da doença periodontal. Como hipótese secundária, a concentração do CMC2.24 também pode ter influência na modulação da resposta celular de macrófagos in vitro. Sendo assim, os objetivos específicos desse trabalho são:

- 1) Determinar, em modelo in vivo de doença periodontal experimental, a ação de CMC2.24 administrado em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 mg/Kg) na reabsorção óssea inflamatória, número de osteoclastos e número de células inflamatórias, além da expressão de genes inflamatórios no tecido gengival;
- 2) Avaliar os efeitos de diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 uM) de CMC2.24 in vitro sobre a expressão gênica, atividade fagocitária e produção de ROS por macrófagos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Obtenção e manutenção dos animais

Para realização dos experimentos foram utilizados 36 ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus Holtzman*) machos e adultos com peso entre 190 e 220 gramas. Esses animais foram alojados sob condições isentas de agentes patológicos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) dessa Instituição, que aprovou o protocolo deste experimento no dia 17 de agosto de 2014 – Proc CEUA nº 15/2014 (Anexo A). Os animais foram acomodados em grupos de 3 a 4 em gaiolas de prolipropileno, em estante isoladora em condições SPF com temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e umidade (65-70%) controladas, além de ciclo de iluminação (12 horas de luz/ 12 horas de escuro). Receberam alimentação granulada (Labina/Purina) e água *ad libitum*, sendo pesados semanalmente. A limpeza das caixas era feita 3 vezes na semana e o controle de ração/água era realizado diariamente.

3.2 Administração dos compostos e indução da doença periodontal por injeção de LPS/PBS

O composto testado, CMC2.24, foi preparado e fornecido por meio de acordo de transferência de material (MTA – Material Transfer Agreement) assinado com o grupo do Dr. Lorne M. Golub, Department of Oral Biology and Pathology, State University of New York at Stony Brook (NY USA). O CMC2.24 foi dissolvido em carboximetilcelulose 2,5% e administrado aos animais por via oral, diariamente, nas dosagens de 1, 3, 10 e 30mg/kg de peso corporal (dosagens ajustadas segundo a pesagem semanal dos animais), uma vez ao dia durante os 28 dias de experimento. O preparo (dissolução) do CMC2.24 foi realizado sempre imediatamente antes da administração aos animais. Nesse período, o grupo controle recebeu apenas o volume de veículo (carboximetilcelulose 2,5%) equivalente ao administrado na maior dose de CMC 2.24 (grupo controle-veículo).

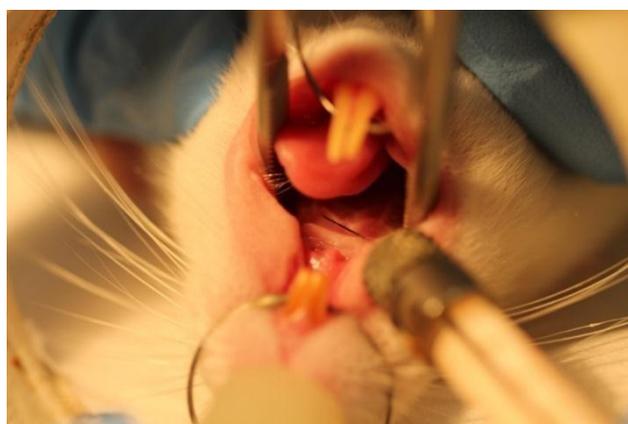
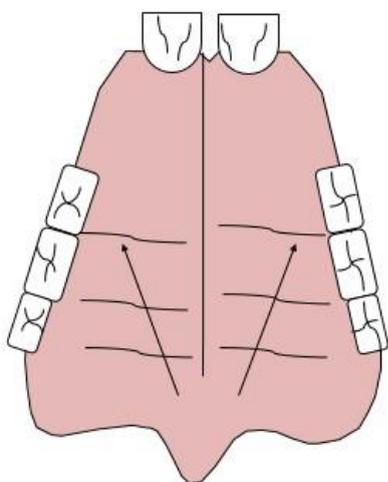
No dia seguinte ao início da administração do CMC2.24 (ou do mesmo volume de carboximetilcelulose no grupo controle-veículo), foi iniciada a indução da doença periodontal. Nesse estudo, foi utilizado modelo de indução de doença periodontal por injeção de lipolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS) na região palatina e como controle negativo foi usada a injeção do mesmo volume de tampão

fosfato (PBS) utilizado na diluição do LPS. A injeção de LPS nos tecidos gengivais é um modelo experimental amplamente utilizado, inclusive pelo nosso grupo de pesquisa (Graves et al.²⁴, 2012; Elburki et al.¹⁷, 2014; Guimarães et al.²⁷, 2011; Curylofo¹⁵, 2014), para a indução de inflamação associada à reabsorção do osso alveolar.

Para realizar as injeções, os ratos eram submetidos à anestesia geral pela inalação de uma mistura de isoflurano/oxigênio (4kgf/cm²).

Três vezes por semana foram realizadas injeções de 30 µg de LPS de *Escherichia coli* (strain 055:B55, Sigma Chem Co.) diluído em PBS (concentração de 10mg/mL). Em cada região foi utilizado um volume total de 3µL, injetados no tecido gengival palatino, próximo a margem gengival entre 1º e 2º molares superiores esquerdos e direitos (Figura 2) utilizando uma microseringa do tipo Hamilton com agulha customizada de gauge 30 e comprimento de 0,6 cm (Agilent).

Figura 2 - Diagrama representando o local das injeções bilaterais e foto ilustrativa do procedimento (à direita do esquema)



Fonte: Fonte própria

Em um período de 4 semanas (28 dias) foram realizadas 12 injeções, num total de 360 µg de LPS aplicados em cada sítio. O grupo controle recebeu injeção do mesmo volume (3 µL) do veículo de diluição do LPS (PBS). As injeções eram realizadas no lado esquerdo e também no lado direito do animal (Figura 3).

Figura 3 - Grupos experimentais segundo a injeção e o composto administrado.

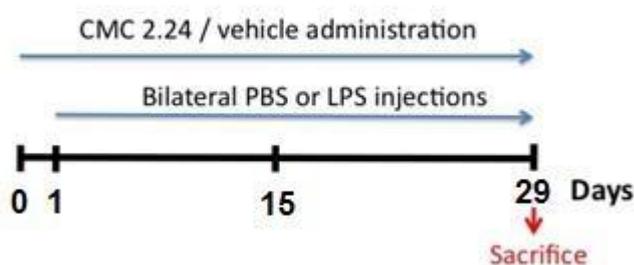
Experimental groups (total n = 36 rats - 6 rats/group)	
○	PBS/PBS + no treatment (negative control)
○	LPS/LPS + carboxymethylcellulose vehicle (positive control)
○	LPS/LPS + 1 mg/Kg/day CMC 2.24
○	LPS/LPS + 3 mg/Kg/day CMC 2.24
○	LPS/LPS + 10 mg/Kg/day CMC 2.24
○	LPS/LPS + 30 mg/Kg/day CMC 2.24 (treatment control)

Fonte: Fonte própria

3.3 Eutanásia dos animais, obtenção de amostras e delineamento experimental

Após 28 dias do início de doença periodontal e 29 dias após o início da administração oral do CMC2.24 ou veículo, os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico. A cronologia do experimento está representada na Figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática do desenho experimental in vivo.



Fonte: Fonte própria

Cada animal foi anestesiado com 0,5 mL de anestésico, sendo 0,3mL de ketamina e 0,2 mL de xilazina antes de ser sacrificado. Após certificarmos que o animal estava anestesiado, mais 0,2 mL de xilazina foi injetado no coração para que houvesse a eutanásia.

Imediatamente foram dissecadas as hemi-maxilas dos animais. O tecido gengival na área em que foram realizadas as injeções foi cuidadosamente dissecado de um lado da maxila de todos os animais. Esses tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo armazenados a -80°C até o momento da extração do RNA. Após a remoção do tecido gengival, a hemimaxila foi armazenada em álcool para posterior análise da extensão da reabsorção óssea inflamatória por

meio da coloração da superfície radicular com azul de metileno e também por microtomografia computadorizada (μ CT). O lado contralateral da maxila (em que não foi dissecado o tecido gengival) foi armazenado em paraformaldeído 4%, por 24 horas, lavado e transferido para solução de EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) 0.5 M, pH 8.0 para descalcificação durante 2 meses, sendo a solução de EDTA renovada a cada 3 dias. Após confirmada a descalcificação por avaliação da textura da peça com agulha hipodérmica em área não relevante da amostra, as peças foram submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina e posterior obtenção de cortes histológicos semi-seriados (4 μ m de espessura) no sentido vestibulo-lingual (plano frontal), utilizados nas análises histológica/estereométrica (corados com hematoxilina e eosina) e imunohistoquímica.

3.4 Microtomografia computadorizada (μ CT)

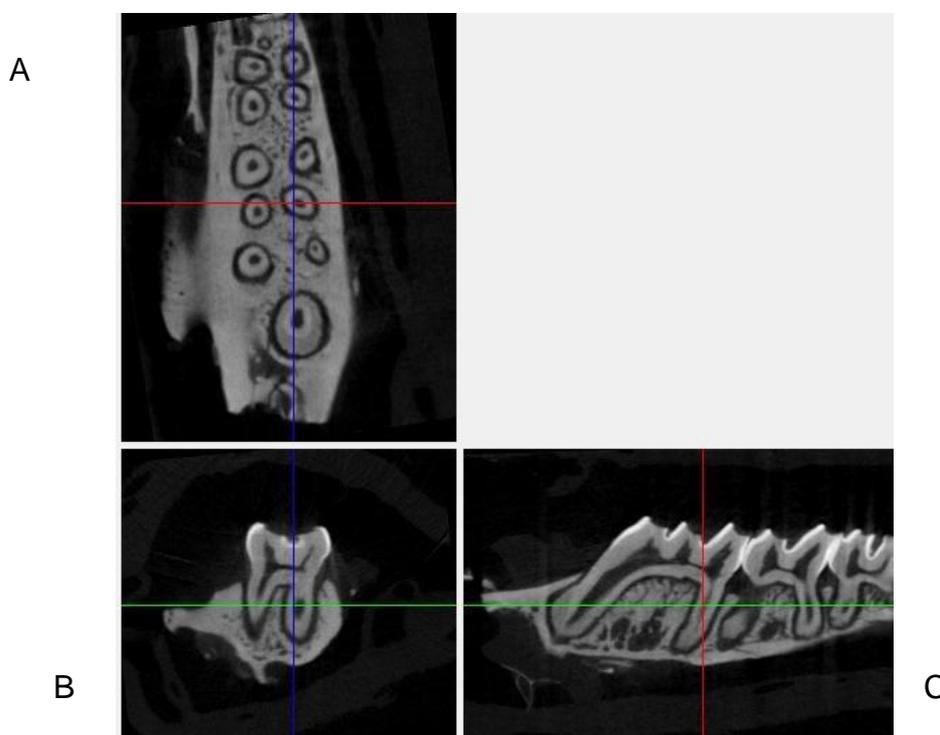
Para a microtomografia computadorizada as peças foram conservadas em estado não descalcificado em etanol a 70% até o momento da análise, que foi realizada pela varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia computadorizada (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003). As imagens tridimensionais foram geradas pelo microtomógrafo SkyScan utilizando cortes de 18 μ m (50Kv e 500mA, atenuação em filtro de alumínio de 0.5 mm). Após a binarização das imagens em tons de cinza, as imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram reconstruídas tridimensionalmente pelo software NRecon (SkyScan, versão 1.4.4 64-bit). Foram analisadas 6 hemi-maxilas (1 de cada animal) para cada grupo experimental.

Inicialmente as imagens foram reorientadas espacialmente nos três planos (Figura 5) de forma padronizada utilizando sempre os mesmos pontos de reparo anatômicos utilizando o software DataViewer (Skyscan). Com o software CT Analyser (Skyscan), foi estabelecido um limite de contraste (threshold 255-80 na escala de tons de cinza) para distinguir tecidos mineralizados de não-mineralizados. Para a determinação da região de interesse (ROI), duas medidas foram realizadas, assim maximizando a quantificação do osso, minimizando a inclusão de dentes e raízes e usando o mínimo de marcações possíveis, o ROI foi delimitado no sentido mesio-distal a partir da face distal da raiz mesial do 1^o. molar até a face mesial da raiz distal do segundo molar; no sentido cervico-apical do teto da furca do primeiro molar até o final das raízes. Assim, toda a área óssea da região interproximal e

região de furca do segundo molar foi envolvida na ROI. Esta região foi analisada por ser o local onde as injeções foram feitas.

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 - Planos de orientação para análise de microtomografia computadorizada. Visualização dos três eixos de orientação da peça anatômica. A: Plano coronal, B: Plano transaxial/frontal, C: Plano sagital/mesio-distal. No plano sagital pode-se visualizar, nitidamente, o primeiro e segundo molares. No plano transaxial observa-se as duas raízes distais do primeiro molar e no plano coronal, as raízes do primeiro e segundo molares.



Fonte: Fonte própria

3.5 Azul de metileno

As peças destinadas à quantificação da reabsorção inflamatória do osso alveolar por meio da técnica complementar de coloração com azul de metileno foram mantidas em solução de peróxido de hidrogênio por 24 horas e limpas por fricção vigorosa com compressas de gaze para remoção do tecido mole remanescente e então coradas com azul de metileno. A solução de azul de metileno foi preparada com a adição de 0,7g do corante dissolvidos em 50 ml de etanol a 95% com posterior diluição de 2,5 ml dessa solução em 47,5 ml de água (0.7 mg/mL de azul de metileno) e manutenção das peças no corante durante 5 minutos. Em seguida, a

face lingual das peças foi fotografada em estereomicroscópio (Leica HZ6 – magnificação de 4x) e as mesmas analisadas por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais (todos os animais dos grupos foram analisados). Assim, a região compreendida entre o início da raiz do primeiro molar superior e a segunda raiz do segundo molar superior foi considerada para a mensuração da área de perda óssea, compreendida entre a junção cimento esmalte e o osso alveolar. A área corada pelo azul de metileno corresponde à superfície radicular exposta (o esmalte dental não é corado pelo azul de metileno) e corresponde diretamente à extensão da reabsorção óssea que foi analisada histomorfometricamente utilizando o programa ImageJ (NIH Image).

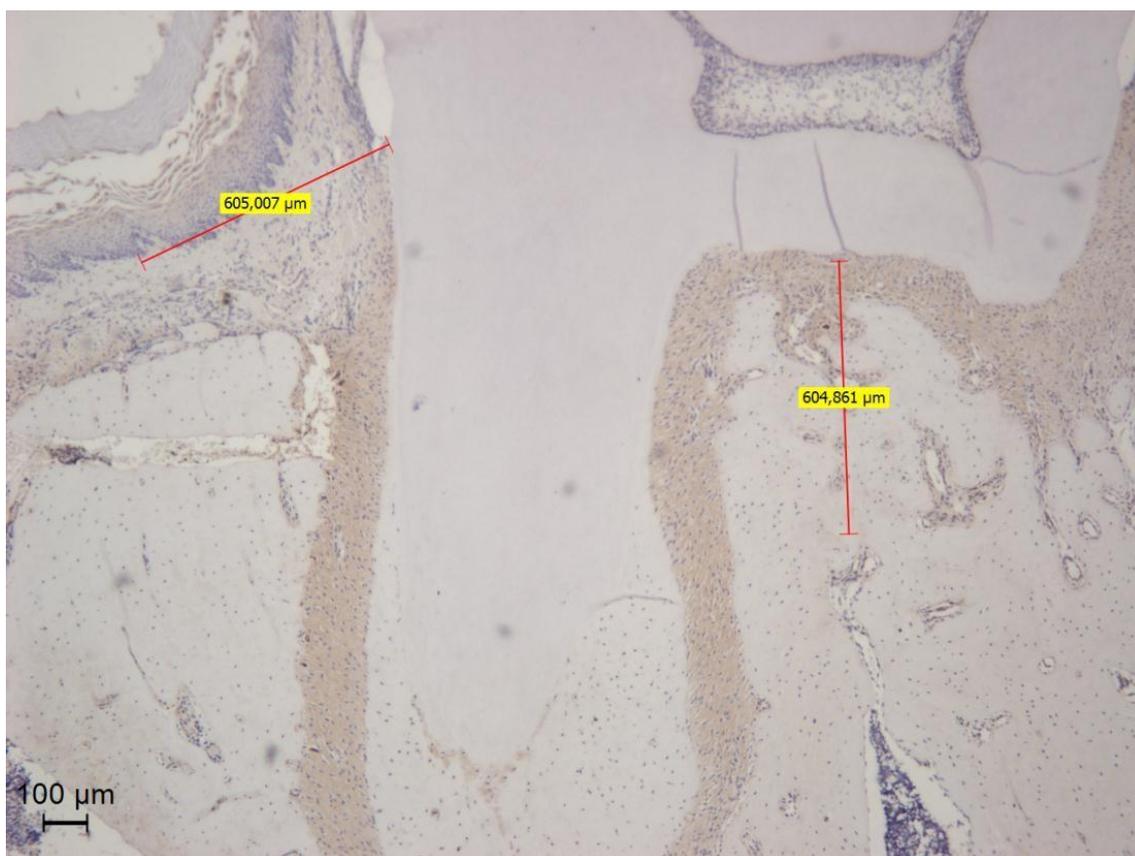
3.6 Imunohistoquímica – Fosfatase Ácida Tártaro-Resistente (TRAP)

Para identificar e quantificar os osteoclastos localizados nas proximidades do osso alveolar, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100/90/70%) até a água destilada e posteriormente incubados em peróxido de hidrogênio (2%) durante 30 minutos para inativação da atividade de peroxidase endógena nos tecidos. Os cortes foram lavados em água destilada e incubados por 2 horas com solução de BSA 3% (X0909, Dako) para bloquear interações não específicas do anticorpo primário via porção Fc da imunoglobulina. Após nova lavagem dos cortes em água destilada, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal de cabra específicos para a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (sc-30833, Santa Cruz Biotechnology). O anticorpo primário foi diluído 1:100 em PBS e deixado sobre os cortes por 18 horas “overnight” a 4°C em um compartimento umidificado. Após a reação do anticorpo primário este foi removido por aspiração, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário anti-cabra produzido em porcos e biotilado. Os anticorpos secundários foram (LSAB-2 Dako Cytomation). Após remoção por aspiração e nova lavagem em PBS, os cortes foram incubados com estreptavidina conjugada à HRP por 20 minutos e em seguida foi acrescentado o substrato DAB (3.3’ diamino-benzidina) por 1 minuto e 20 segundos. Ao final do protocolo de marcação, os cortes foram contra-corados com hematoxilina (Carrazzi, Sigma) por 2 minutos e deixados secar a temperatura ambiente por 2 horas e em seguida recobertos com as lamínulas montadas com permount. Após esse processo foram observados em microscópio de luz (Leica DM 2500, Wetzlar, Alemanha) na

magnificação de 200 X, mantendo-se constante os parâmetros de captura de imagem (brilho, contraste e tempo de exposição).

Para quantificação de osteoclastos, 4 animais por grupo foram analisados, sendo 18 cortes semi-seriados (3 diferentes regiões no sentido mesio-distal, com espaçamento de 180 μM entre a primeira e última região analisada) por animal. Foram contadas as células localizadas próximas ao osso alveolar, marcadas positivamente para TRAP e contendo 3 ou mais núcleos. A área determinada para contagem foi estabelecida através de uma reta de 600 μm traçada a partir da porção apical do epitélio juncional em direção ao centro do palato (Figura 6).

Figura 6 - Fotomicrografia mostrando corte de maxila submetido à reação de imunohistoquímica e contra-corada com hematoxilina para detecção de células TRAP positivas. As linhas em vermelho representam os limites considerados em cada contagem de células. A contagem foi feita seguindo todo o contorno do osso até a região de furca. As medidas foram determinadas por meio de um software (Leica Application Suite 3.8, Wetzlar, Alemanha).



Fonte: Fonte própria

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

3.7 Estereometria

A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada em cortes corados com hematoxilina e eosina com o auxílio de um microscópio de luz (Leica DM 2500, Wetzlar, Alemanha) na magnificação de 200 X. A técnica estereométrica de contagem foi empregada nos tecidos para avaliar a proporção de componentes teciduais em um plano bidimensional por microscopia. Este procedimento permite a avaliação quantitativa do processo inflamatório, de acordo com o protocolo descrito por Odze et al. (1996). Para esse procedimento, 4 animais de cada grupo foram analisados, usando um total de 9 lâminas, ou 27 cortes semi-seriados por animal.

A região de interesse para obtenção das imagens em magnificação de 200 X foi determinada inicialmente em imagens obtidas na magnificação de 40X, nas quais foi traçada uma reta de 600 um (Leica Application Suite 3.8, Wetzlar, Alemanha) a partir da região apical do epitélio juncional em direção ao centro do palato, sendo registrado um ponto de referência no tecido conjuntivo (vaso sanguíneo ou célula). Utilizando este ponto de referência determinado na imagem com magnificação de 40X, avaliou-se todo o campo microscópico visualizado em aumento de 200 X. (Figura 7).

Figura 7 - Limite para análise de estereometria. Imagem de corte corado com H/E no aumento de 40X com a reta traçada e uma representação da área avaliada (campo microscópico) no aumento de 200X.



Fonte: Fonte própria

As células presentes no campo microscópico no aumento de 200X foram classificadas segundo seu tamanho e morfologia nuclear em células mononucleares, polimorfonucleares e fibroblastos.

3.8 PCR convencional – tecido gengival

O tecido gengival dos animais removido durante a eutanásia dos animais foi armazenado em temperatura de -80°C até o momento da extração do RNA. Para esse experimento, foram usadas 4 amostras de cada grupo.

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), 100 ng de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA, utilizando random hexamers como primers e moloney leukemia virus reverse transcriptase, segundo as instruções do fornecedor do kit (High Capacity Reverse Transcription kit, Applied Biosystems). Foram utilizadas amostras de RNA provenientes do tecido gengival de 4 animais diferentes por grupo experimental.

A reação de PCR convencional inicialmente foi otimizada para cada par de primers, considerando a concentração de cloreto de magnésio, temperatura de anelamento e número de ciclos. Foram utilizados primers desenhados com o algoritmo Primer-BLAST para detecção do gene-alvo *Il 1b* e do gene constitutivo *Gapdh* de ratos (Tabela 1).

Tabela 1 - Informações sobre os primers pré-otimizados para PCR semiquantitativo (Promega Gotaq Flexi).

Gene Alvo	Sequência (5' – 3')	Ciclos	Ta (°C)	Concentração de Cloreto de Magnésio (mM)
<i>Gapdh</i>	GTCAGTGGTGGACCTGACCT AGGGGTCTACATGGCAACTG	30	52°	1,5
<i>Il 1b</i>	GACCTGTTCTTTGAGGCTGA CGTTGCTTGTCTCTCCTTGT	36	55°	1,5

Fonte: Fonte própria

As reações de PCR foram realizadas em termocicladora MyCycler (Bio-Rad) em um volume de 25 µL/amostra utilizando reagentes obtidos comercialmente (GoTaq Green, Promega Corp).

Os produtos da reação de PCR foram submetidos diretamente a eletroforese horizontal em gel de agarose (55 V constantes, por 60 min) em tampão TBE. Ao preparo do gel de agarose na concentração de 1,5%, acrescentou-se 0.5 µg/mL de brometo de etídeo para possibilitar a visualização do DNA dupla-fita (produtos da reação de PCR) sob transiluminação UV em sistema de documentação digital (Bio-Rad Gel Doc Xr, Bio-Rad Lab.).

3.9 Expressão gênica em macrófagos – PCR convencional

Nos experimentos in vitro, utilizamos a linhagem de macrófagos murinos Raw 264.7 plaqueados em placas de 6 poços na concentração de 5×10^5 células por poço. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, de forma independente e utilizando passagens diferentes da linhagem celular (passagens 10 -17). O tratamento das culturas com CMC2.24 foi realizado um mínimo de 4 h após o plaqueamento para possibilitar a adesão das células ao substrato plástico. Foram utilizadas diferentes concentrações de CMC2.24: 1, 3, 10 e 30 µM. Como controle-veículo, foi utilizado

um volume de DMSO (veículo) correspondente ao maior volume utilizado de CMC2.24. Uma hora após o tratamento com CMC2.24 ou veículo, foram realizados os estímulos com 1 ug/mL LPS (*E. Coli*, sorotipo 055:B55), 50 ug/mL de PMA (forbol-miristil acetato) e *Porphyromonas gingivalis* inativadas por calor (Pg, ATCC #38277) na proporção 10:1 (bactérias : células).

Após 24 horas, procedeu-se à lise das células e extração do RNA total utilizando sistema de colunas de afinidade com tratamento para eliminação de DNA genômico segundo o protocolo do fornecedor dos reagentes (RNAqueous- 4PCR kit, Ambion). Em seguida, a quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro de microvolumes e a síntese do cDNA realizada utilizando 100 ng de RNA total, como descrito anteriormente. Foi determinada a modulação da expressão gênica de *Il-10* e *Tnfa* por meio de PCR convencional.

A reação de PCR convencional inicialmente foi otimizada para cada par de primers, considerando a concentração de cloreto de magnésio, temperatura de anelamento e número de ciclos (Tabela 2).

Tabela 2 - Informações sobre primers pré-otimizados para PCR semiquantitativo (Promega GoTaq Flexi).

Gene-alvo	Ciclos	Ta (°C)	Concentração de Cloreto de Magnésio (mM)
<i>Gapdh</i>	26	52	1,5
<i>Tnfa</i>	30	54	2,0
<i>Il10</i>	30	54	2,0

Fonte: Fonte própria

As reações de PCR foram realizadas em termocicladora MyCycler (Bio-Rad) em um volume de 25µL/amostra utilizando reagentes obtidos comercialmente (GoTaq Green, Promega Corp).

Os produtos da reação de PCR foram por eletroforese horizontal em gel de agarose (60 V contantes, por 60 min) em tampão TBE. Ao preparo do gel de agarose na concentração de 1,5%, acrescentou-se 0,5µg/mL de brometo de etídeo para possibilitar a visualização do DNA dupla-fita (produtos da

reação de PCR) sob transiluminação UV em sistema de documentação digital (BioRad Gel Doc Xr, Bio-Rad Lab.).

3.10 Atividade fagocitária

Para o experimento de atividade fagocitária, as células Raw 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços com a concentração de 1×10^5 células por poço, em duplicata. Foram realizados 3 experimentos independentes com passagens diferentes das linhagens celulares. Após 4 horas para possibilitar a adesão das células ao substrato plástico, estas foram tratadas com CMC2.24 nas concentrações de 1, 3, 10 e 30 μM (ou o volume do veículo DMSO correspondente ao maior volume utilizado de CMC2.24) por 1 hora. Ao final deste período, o meio de cultura foi removido por aspiração e 100 μL de partículas bacterianas marcadas com fluoróforo vermelho (*E.coli* Bioparticles® conjugate for phagocytosis, Life Technologies) suspensas em PBS na proporção 10:1 (bactérias:células) foram acrescentadas. Após 2 horas, as bactérias foram removidas por aspiração, as células lavadas gentilmente com 200 μL de PBS e fixadas com paraformaldeído 2.5% por 1 minuto à temperatura ambiente (Cytotfix, BD Biosciences).

A placa de 96 poços foi armazenada protegida da luz por 12 horas a 4°C , após ser lavada com PBS gentilmente, duas vezes. Para o período de armazenamento foi adicionado PBS em cada poço para que este não secasse. Após 12 horas, os poços foram permeabilizados em 2% de saponina (BD Perm/Wash) por 15 minutos em temperatura ambiente.

A marcação da actina do citoesqueleto foi feita com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Faloidina conjugada à AlexaFluor 488 (Molecular Probes, cat# A12379 – Life Technologies) por 40 minutos ao abrigo da luz, seguida da marcação do DNA genômico com 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DAPI para possibilitar a visualização do núcleo celular (Sigma-Aldrich Co, D9542) por 5 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As células foram novamente lavadas com PBS e visualizadas em microscópio invertido de fluorescência (Evos fl, AMG Micro). Um examinador treinado e cego para os grupos experimentais realizou a contagem de células com e sem partículas bacterianas em seu interior em 5 campos aleatórios na magnificação de 200X por poço.

3.11 Produção de ROS

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e para a adesão das células ao substrato plástico, 4 horas foram aguardadas.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada por meio de ensaio utilizando substrato solúvel absorvido passivamente por células vivas que sofre oxidação na presença de espécies de oxigênio reativas presentes no citoplasma e passa a emitir fluorescência quando excitado por luz no comprimento de onda de 488 nm (ROS - CellROX Green, Molecular Probes – Life Technologies). Brevemente, as células foram 'carregadas' com este reagente (40 μ M) por 1 h previamente ao tratamento com CMC2.24 (1, 3, 10 e 30 μ M) ou veículo (DMSO no volume correspondente ao maior volume de CMC2.24 utilizado). Após o carregamento, as células recuperadas do estresse com a manutenção em cultura em meio de crescimento por 30 minutos e então estimuladas com LPS (1 μ g/mL) ou peróxido de hidrogênio (4 mM) por 5 minutos, As células foram destacadas enzimaticamente do substrato plástico de cultura e analisadas em citômetro de fluxo (FACS Verse, BD Biosciences) para avaliação da proporção de células emitindo fluorescência (i.e., produzindo ROS). A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de ROS produzida na célula e foi detectada no canal FL2 (FITC) de citômetro de fluxo.

3.12 ELISA

Para esse experimento, 3×10^5 macrófagos foram plaqueados em duplicatas, sendo o experimento repetido de forma independente 3 vezes, cada um utilizando passagens distintas da linhagem celular. Após 4 horas para adesão celular ao substrato plástico, as células foram tratadas com CMC2.24 em diferentes concentrações (1, 3, 10 e 30 μ M) e após 1 hora estimuladas com LPS (1 μ g/mL) e Pg inativados por calor (10:1, bactérias: células).

Após 24 horas, o meio de cultura dos macrófagos foi coletado, centrifugado a 4°C, e o sobrenadante aliquoteado e armazenado à -80°C até a realização do ELISA sandwich para IL-10 e TNF-alfa, seguindo as instruções do fornecedor (DuoSet ELISA kit, R&D Systems). Brevemente, as placas foram sensibilizadas com o anticorpo de captura e 100 μ L de padrão/amostra foram adicionados a cada poço seguindo-se a incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens, foi acrescentado o anticorpo de detecção e após sua remoção por aspiração e novas lavagens, acrescentou-se streptavidina-HRP, seguido da solução substrato de HRP, sendo a reação encerrada após 20 minutos com a adição do reagente de parada (Stop Solution). A absorbância à 450 nm (com correção para a absorbância em 540 nm) foi determinada em leitor de placas UV-Vis (Spectramax-L, Molecular Probes). A

concentração relativa da citocina de interesse (IL-10 ou TNF-alfa) foi determinada com base na curva-padrão. A normalização dos resultados foi feita pela quantidade de proteína total existente em cada uma das amostras, determinada pelo método de micro-BCA (Pierce, ThermoFisher Scientific).

3.13 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). Os gráficos (em forma de coluna) foram feitos usando médias com desvio padrão e para as comparações entre grupos foi utilizado o teste One-way ANOVA com Post-hoc Test Tukey.

4 RESULTADO

Administração oral de CMC2.24 reduz a reabsorção óssea associada à doença periodontal induzida por LPS já a partir de 1 mg/Kg

Por análise de coloração por azul de metileno, observou-se que os grupos tratados com CMC2.24 apresentaram redução significativa da perda óssea alveolar em comparação com o grupo injetado com LPS e tratado com o veículo carboximetilcelulose (Figura 8).

Figura 8 - CMC2.24 reduziu a perda óssea alveolar em modelo de doença periodontal induzida por LPS. (A) Imagens representativas de cada grupo experimental obtidas em lupa estereoscópica (aumento de 4X). (B) Resultados quantitativos da análise da área de superfície radicular exposta, demonstrando que a administração de CMC2.24 reduziu significativamente a reabsorção óssea na área de interesse entre a raiz mesial do primeiro molar e a raiz distal do segundo molar superiores. Diferença estatística também foi notada entre os grupos 1 e 10 mg/kg. (*) indica $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (injeções do veículo PBS). As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM). (Continua)

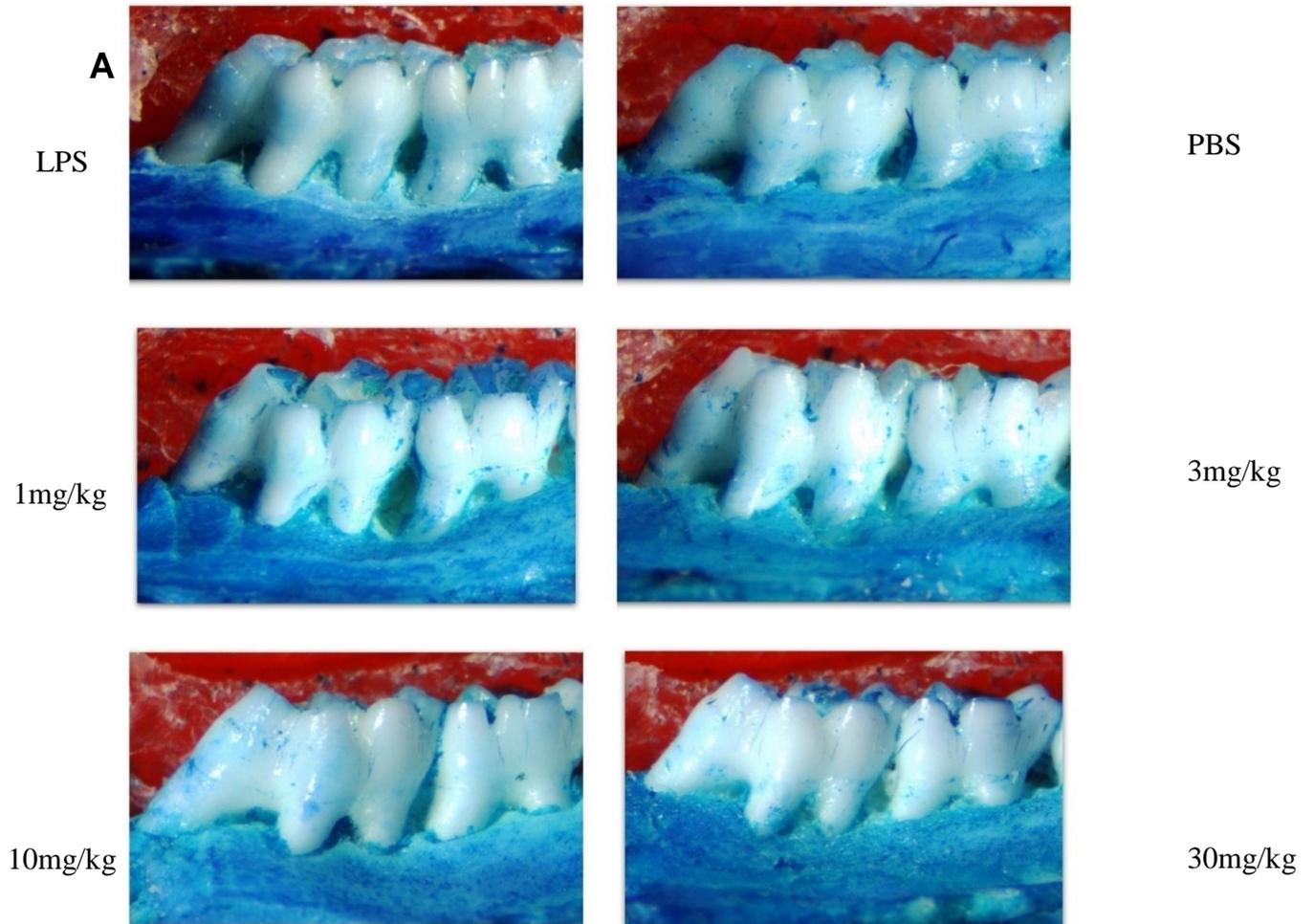
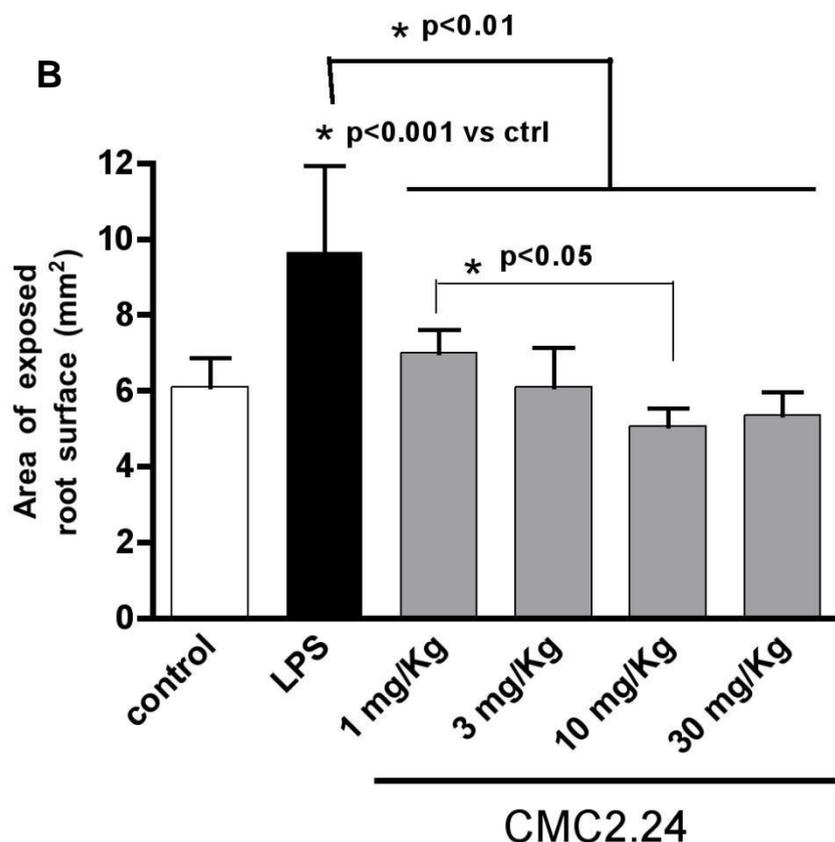


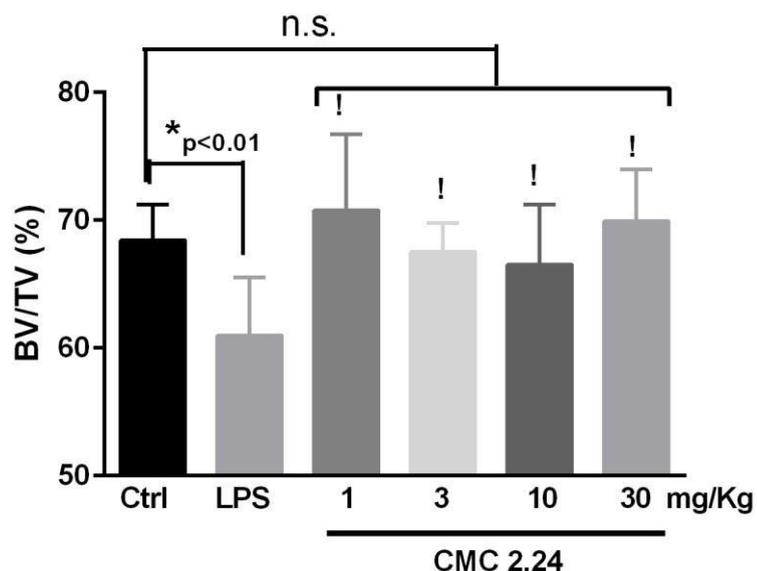
Figura 8 - CMC2.24 reduziu a perda óssea alveolar em modelo de doença periodontal induzida por LPS. (A) Imagens representativas de cada grupo experimental obtidas em lupa estereoscópica (aumento de 4X). (B) Resultados quantitativos da análise da área de superfície radicular exposta, demonstrando que a administração de CMC2.24 reduziu significativamente a reabsorção óssea na área de interesse entre a raiz mesial do primeiro molar e a raiz distal do segundo molar superiores. Diferença estatística também foi notada entre os grupos 1 e 10 mg/kg. (*) indica $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (injeções do veículo PBS). As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM). (Conclusão)



Fonte: Fonte própria

Além disso, a análise tridimensional por microtomografia computadorizada confirmou a redução significativa da perda óssea alveolar nos grupos tratados com CMC2.24 em comparação ao grupo injetado com LPS e tratado com o veículo carboximetilcelulose (Figura 9). Não houve diferença estatística entre o grupo tratado com CMC2.24 e o controle injetado com veículo PBS.

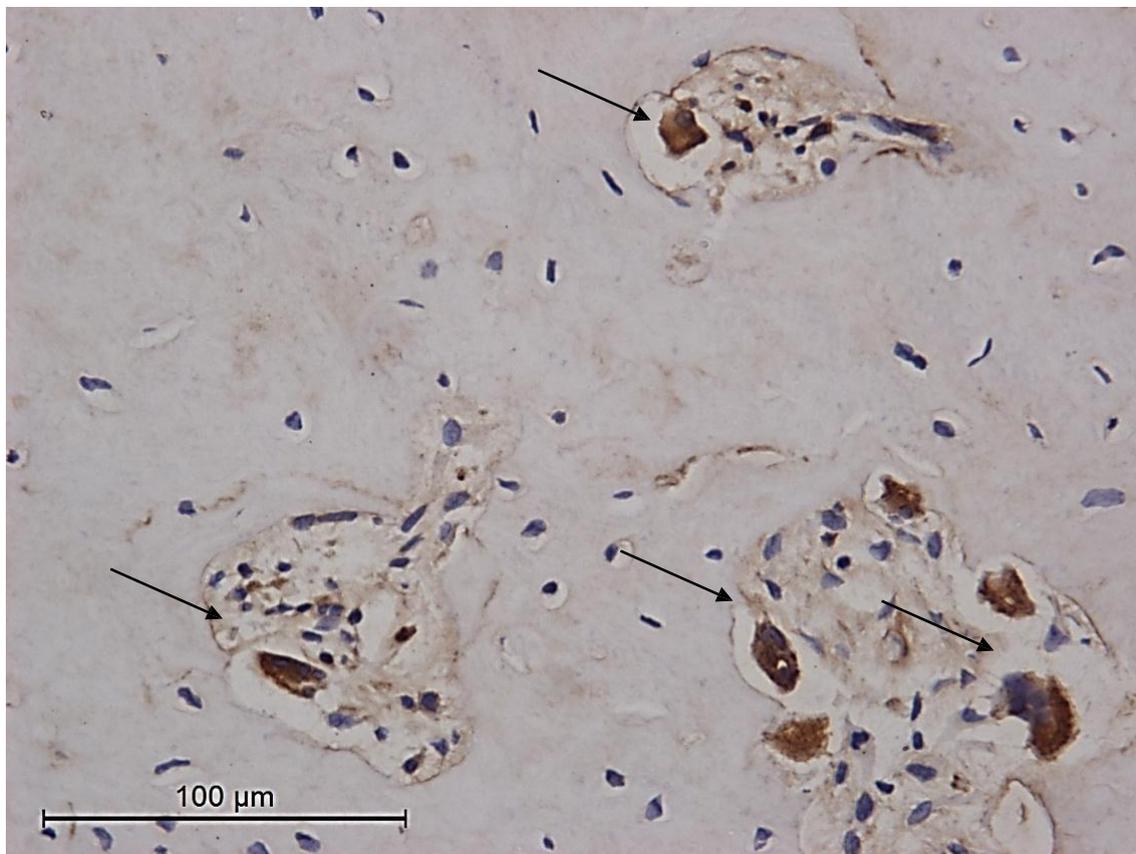
Figura 9 - CMC2.24 reduziu significativamente a perda óssea alveolar em modelo de doença periodontal induzida por LPS. Resultados quantitativos da análise por μ CT, demonstrando que a administração de CMC em diferentes concentrações reduziu a reabsorção óssea incluindo 1º e 2º molares superiores. As barras indicam os valores médios e as minhas verticais o erro padrão médio de no mínimo três animais por grupo. Os '!' no gráfico alternativo de barras indica diferença significativa ($p < 0.05$) em comparação ao grupo LPS.



Fonte: Fonte própria

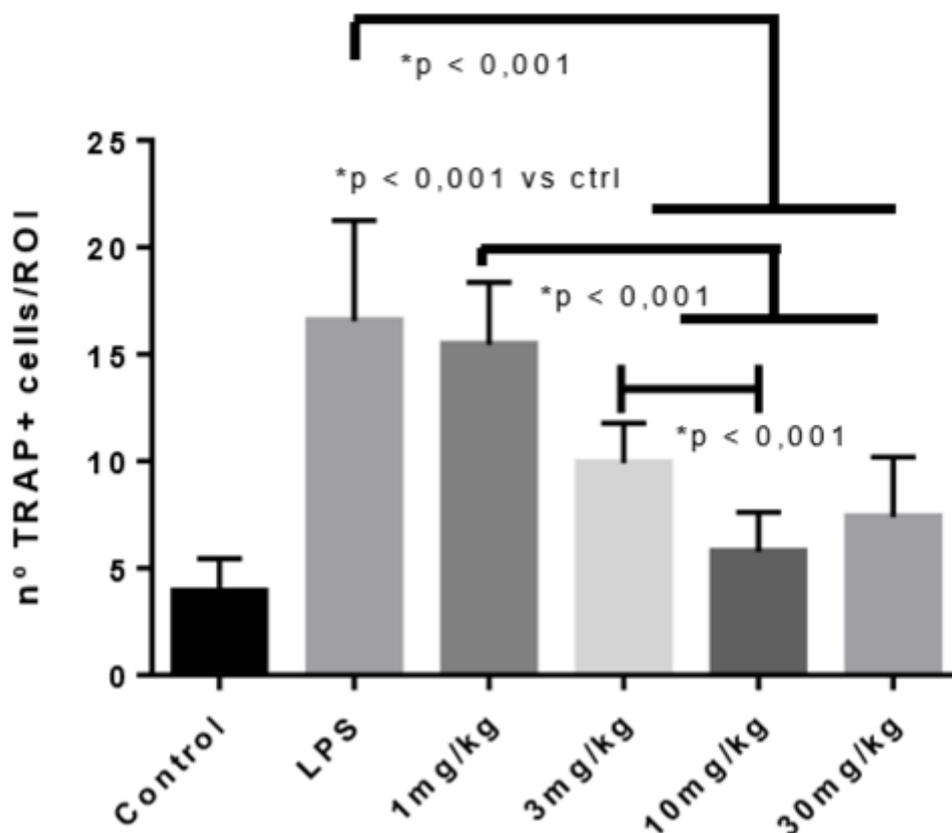
O número de células multinucleadas TRAP-positivas, identificadas por imunohistoquímica, foi contado nas proximidades do osso alveolar (Figura 10). Uma diminuição estatisticamente significativa foi observada nos grupos que receberam 3, 10 e 30 mg/kg de CMC2.24 com comparação ao grupo LPS (Figura 11).

Figura 10 - Imagem representativa da imunohistoquímica para detecção de células TRAP-positivas (c). Observa-se osteoclastos identificados por pela morfologia, tamanho, localização e positividade para expressão de TRAP (aumento de 400X). Osteoclastos assim identificados foram contados na superfície do osso alveolar da região correspondente ao teto da furca até uma distância de 400 μm da superfície dental em direção ao centro do palato.



Fonte: Fonte própria

Figura 11 - Redução significativa no número de osteoclastos a partir da dose de 3 mg/Kg de CMC2.24. Injeções de LPS aumentaram o número de osteoclastos em comparação ao grupo controle que recebeu injeções de PBS (* $p < 0,001$). O número de células TRAP-positivas nos grupos tratados com 3, 10, 30 mg/kg de CMC2.24 foi significativamente reduzido ($p < 0,001$). As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM).

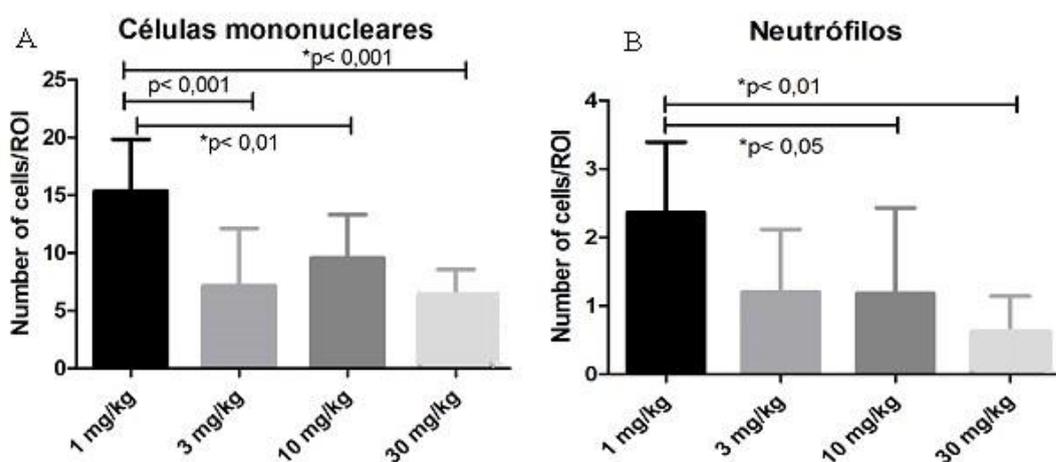


Fonte: Fonte própria

Efeito dose-dependente do CMC2.24 na redução do infiltrado inflamatório

De forma similar aos resultados de diminuição do número de osteoclastos, as análises do infiltrado inflamatório mostraram efeito significativo a partir da dose de 3 mg/Kg de CMC2.24. A análise estereométrica indica que o grupo tratado com 1 mg/Kg de CMC2.24 apresentou maior proporção de células mononucleares e de neutrófilos em comparação aos outros grupos experimentais (Figura 12).

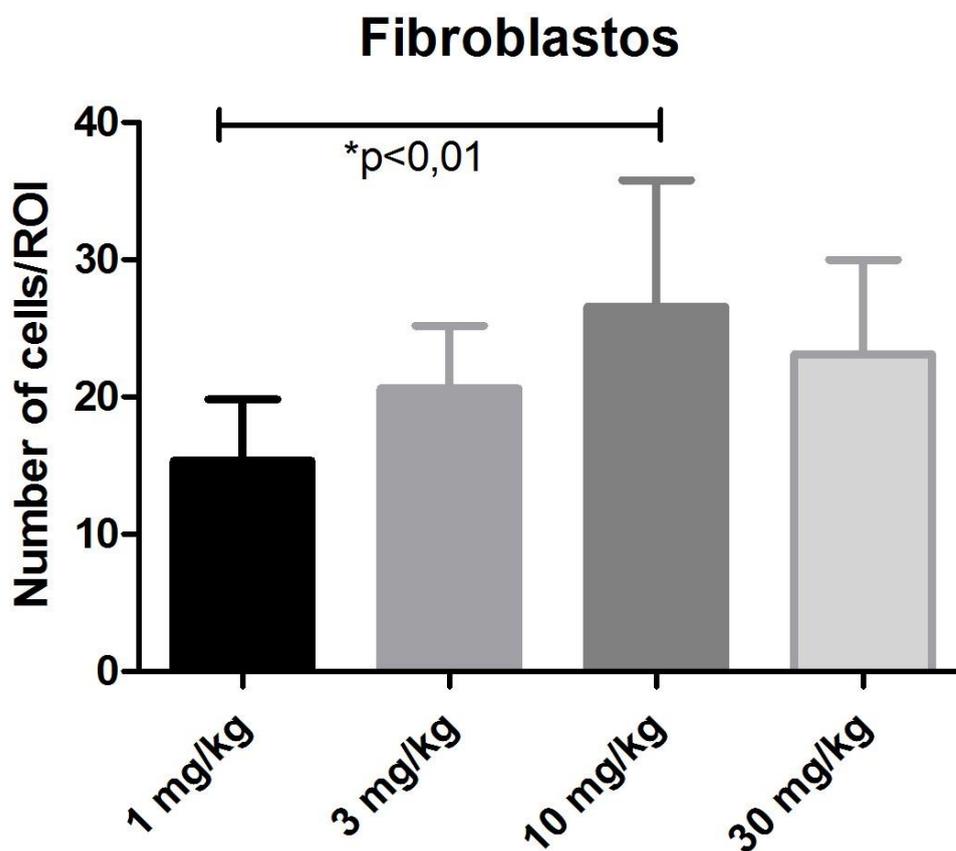
Figura 12 - Efeitos das diferentes doses de CMC2.24 na modulação da resposta inflamatória – Análise estereométrica. (A) Contagem diferencial de células mononucleares segundo as características morfológicas. Nota-se diferença estatística entre o grupo que recebeu 1mg/kg e os grupos de 3, 10 e 30mg/kg. (B) Contagem diferencial de neutrófilos segundo as características morfológicas. Nota-se diferença estatística entre o grupo que recebeu 1mg/kg e os grupos de 10 e 30mg/kg. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM).



Fonte: Fonte própria

Além disso, observou-se um aumento na proporção de células com morfologia de fibroblastos também de forma dose-dependente, até a concentração de 10 mg/Kg de CMC2.24, embora a diferença estatística só seja observada entre os grupos de 1 e 10 mg/Kg de CMC2.24, resultado que corrobora a atenuação da resposta inflamatória com a administração do CMC2.24 (Figura 13). Em resumo, estes dados não indicam um efeito dose-dependente na modulação da resposta inflamatória, mas apenas que o efeito do CMC2.24 significativamente mais potente a partir da dose de 3 mg/Kg.

Figura 13 - Uma grade de $1600\mu\text{m}^2$ foi colocada sobre o tecido conjuntivo palatino situado a $600\mu\text{m}$ do dente e a proporção de fibras colágenas foi determinada. Houve um aumento na proporção de fibras colágenas nos grupos de 10 mg/kg em comparação estatística com o grupo experimental de 1 mg/kg. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM).

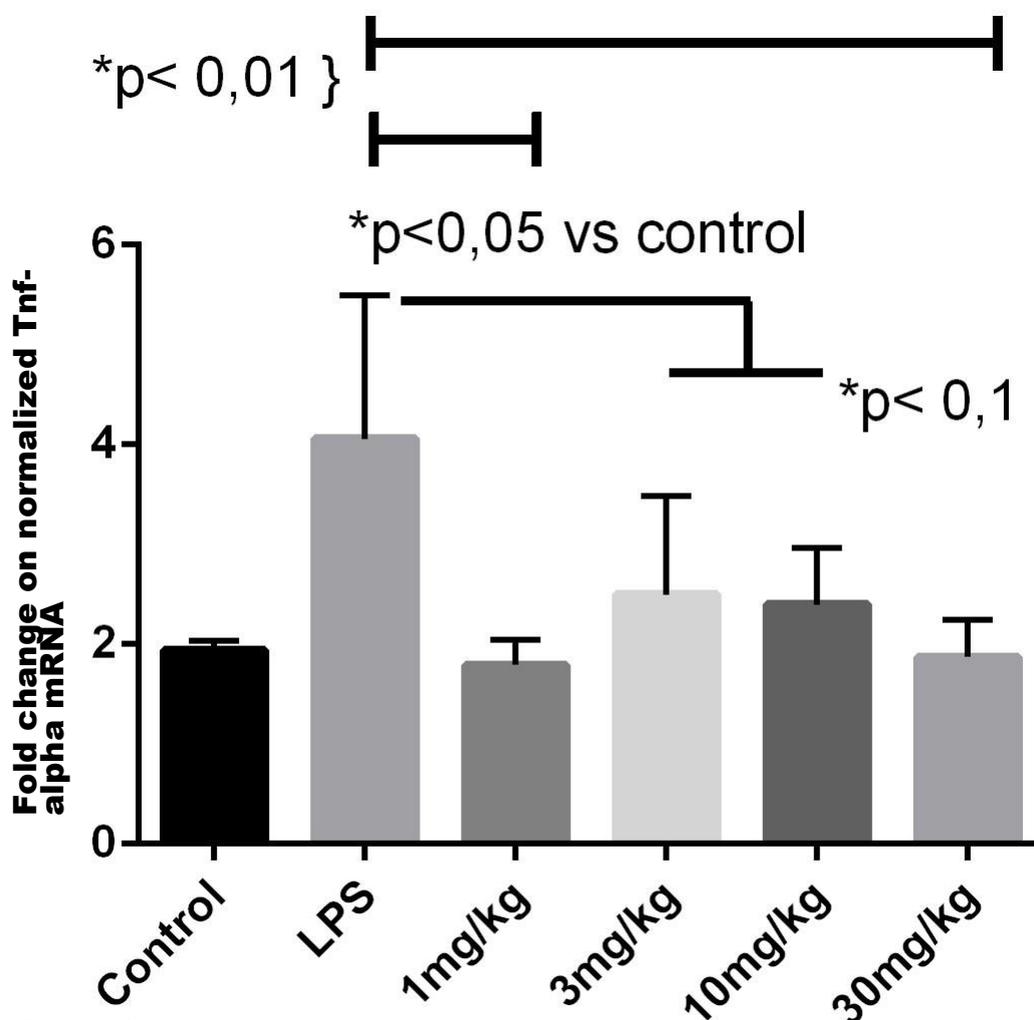


Fonte: Fonte própria

Modulação da expressão gênica de TNF por CMC2.24 não apresenta efeito dose-dependente e depende da natureza do estímulo externo

In vivo, observamos que o tratamento com CMC2.24 reduziu significativamente a expressão de TNF-alfa em comparação ao grupo injetado com LPS e tratado com veículo carboximetilcelulose, porém sem diferença entre as doses de CMC2.24 administradas (Figura 14).

Figura 14 - Administração de CMC2.24 inibe a expressão de TNF-alfa nos tecidos gengivais em modelo experimental de doença periodontal. Os tecidos gengivais do grupo tratado com veículo carboximetilcelulose apresentou os maiores níveis de expressão de TNF-alfa. O tratamento com CMC2.24 inibiu de forma significativa, mas não dose-dependente a expressão de TNF-alfa (A).

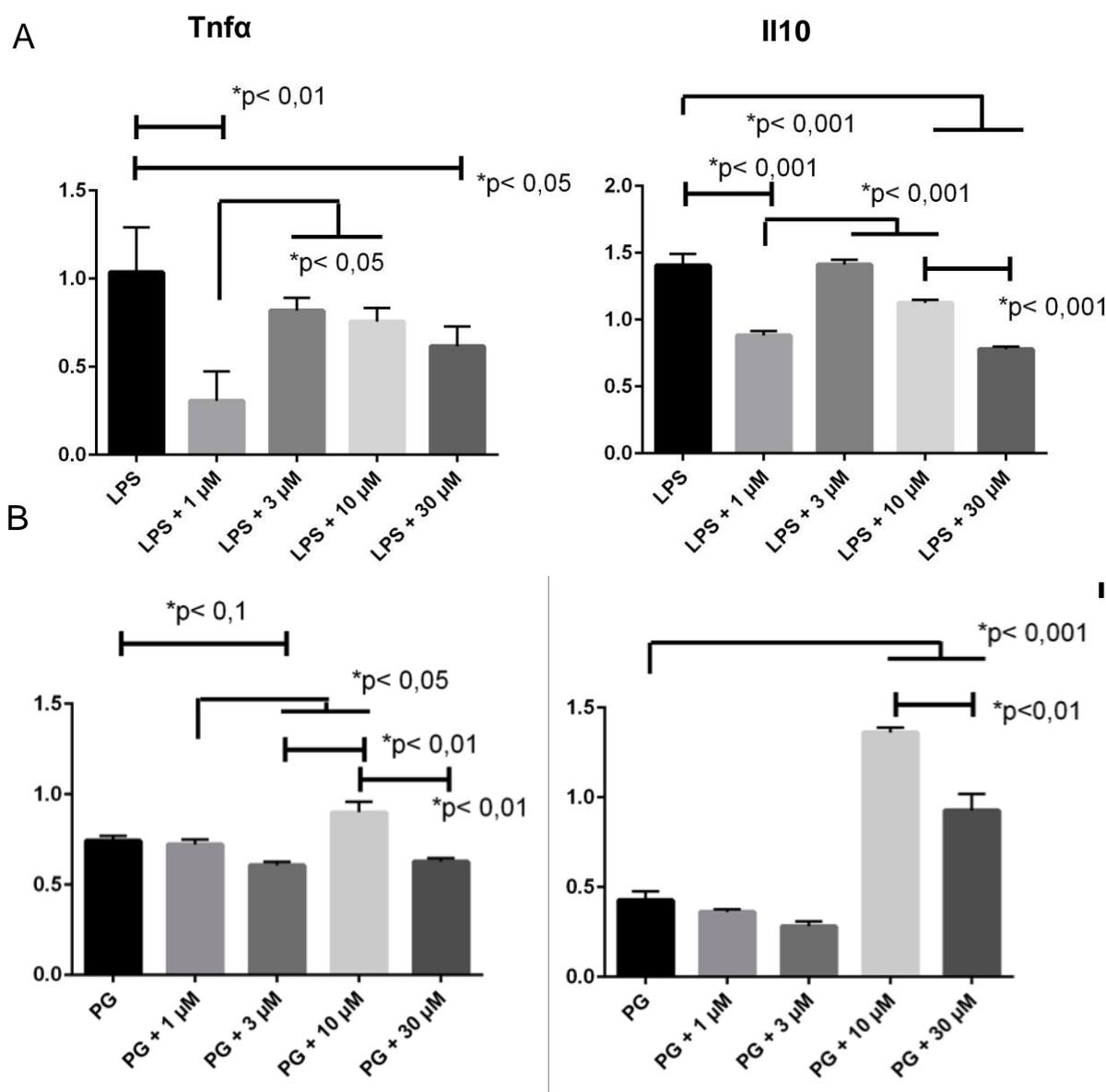


Fonte: Fonte própria

Modulação significativa de expressão de Tnf α em macrófagos

O tratamento de macrófagos *in vitro* também resultou em modulação significativa da expressão de Tnf α e Il10, demonstrando a bioatividade do composto. *In vitro*, observamos um discreto (e não significativo estatisticamente) efeito dose-dependente a partir da concentração de 3 μ M de CMC2.24; no entanto a expressão de IL-10 e de TNF-alfa induzidas por LPS, foi mais marcantemente inibida pelo tratamento com 1 μ M de CMC2.24.

Figura 15 - CMC2.24 inibe a expressão gênica de TNF-alfa e IL-10 após estímulo de TLRs. Modulação da expressão gênica (RNAm) de TNF-alfa e IL-10 por macrófagos estimulados com LPS (1ug/mL) ('A') ou *P. gingivalis* inativado por calor (MOI 10:1) ('B') na presença e ausência de pré- tratamento com 1, 3, 10 e 30 μ M de CMC2.24. Após 24h, o RNA total foi extraído e utilizado para síntese de cDNA, o qual foi utilizado em reação de PCR convencional. As barras indicam os resultados da expressão relativa utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH para normalização dos resultados. Resultados obtidos a partir de amostras de RNA de três experimentos independentes.



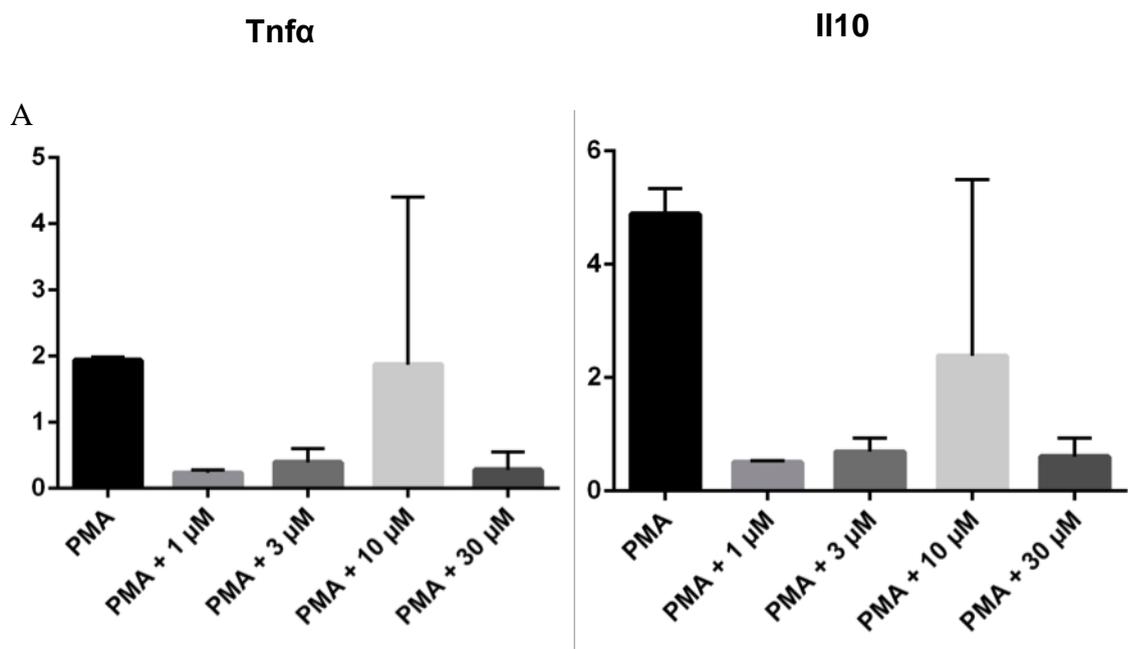
Fonte: Fonte própria

O estímulo dos macrófagos com *P.gingivalis* teve a intenção de avaliar o efeito do CMC2.24 na modulação da expressão de TNF-alfa e IL-10 após a ativação de TLR2/TLR4 (ativados pelo LPS de Pg) e de outros receptores envolvidos no reconhecimento de outras estruturas e componentes microbianos (por ex., flagelo, CpG DNA).

Em contraste ao observado com o estímulo com LPS (agonista de TLR4), não observamos inibição significativa da expressão gênica de TNF-alfa ou IL-10 com pré-tratamento com 1 ou 3 μM de CMC2.24. O tratamento com 10 μM de CMC2.24 resultou em aumento significativo da expressão de TNF-alfa e IL-10, enquanto o tratamento com 30 μM de CMC2.24 aumentou significativamente apenas a expressão de IL-10 (Figura 15).

Considerando os resultados distintos obtidos segundo o estímulo dos macrófagos com LPS ou Pg, avaliamos também os efeitos do CMC2.24 na modulação da expressão destes genes em resposta à um estímulo inflamatório não- microbiano. Após estímulo com PMA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), observamos marcante e significativa redução na expressão de TNF-alfa e IL-10 em todas as concentrações de CMC2.24, sem efeito dose-dependente. A única exceção ocorreu, à exemplo do observado após estímulo com Pg, na concentração de 10 μM , que não produziu redução significativa da expressão de TNF-alfa ou IL-10 (Figura 16).

Figura 16 - CMC2.24 na concentração de 10 μM não inibe a expressão gênica de TNF-alfa (A) e IL-10 (B) induzida por PMA em macrófagos. Células Raw 264.7 foram pré-tratadas com as concentrações indicadas de CMC2.24 (ou o maior volume de DMSO) por 40 minutos e então estimuladas com PMA (5 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h. O RNA total foi extraído e utilizado para síntese de cDNA, o qual foi utilizado em reação de PCR convencional. As barras indicam os resultados da expressão relativa utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH para normalização dos resultados. Resultados representativos de três experimentos independentes.



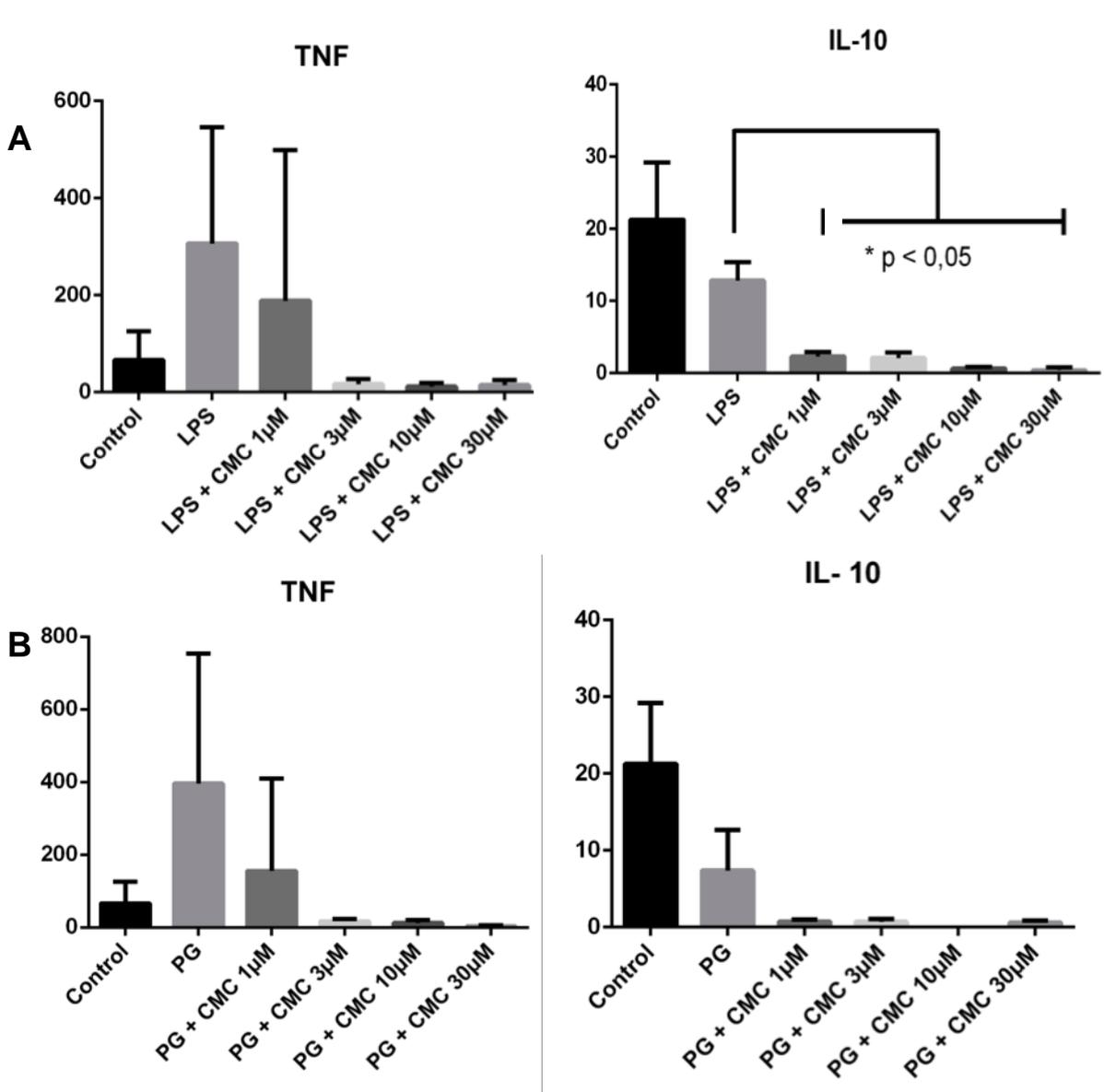
Fonte: Fonte própria

CMC2.24 inibe significativamente a produção de IL-10 e TNF-alfa induzida por estímulos microbianos em macrófagos a partir da concentração de 3 μM

Considerando os resultados dos experimentos avaliando a modulação da expressão gênica e o fato de que tanto TNF-alfa quanto IL-10 apresentam regulação pós-transcricional, indicando que pode não existir correspondência direta entre os níveis de RNAm e da proteína secretada, avaliamos os efeitos das diferentes concentrações de CMC2.24 nos níveis protéicos de IL-10 e TNF-alfa secretados pelo macrófagos após os estímulos com LPS e Pg. Os resultados demonstraram que CMC2.24 inibiu de forma consistente, significativa e sem efeito dose-dependente a produção de IL-10 tanto após estímulo com LPS quanto com Pg. Similarmente, não houve diferenças nos efeitos do CMC2.24 segundo a natureza do estímulo (LPS ou Pg) na produção de TNF-

alfa; porém a inibição só foi significativa a partir da concentração de 3 μM de CMC2.24 (Figura 17).

Figura 17 - A partir da concentração de 3 μM CMC2.24 inibiu com eficácia a produção de IL-10 e TNF-alfa induzida por estímulos microbianos em macrófagos. As células foram tratadas por 40 minutos com as concentrações indicadas de CMC2.24 ou com o volume de DMSO correspondente ao maior volume de CMC2.24 utilizado antes do estímulo com LPS "A" (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Pg "B" (10:1 MOI). Após 24 horas, o sobrenadante das culturas foi coletado e utilizado em ensaios ELISA para quantificar a expressão das citocinas TNF-alfa e IL-10. Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante e os resultados foram normalizados com a concentração total de proteínas em cada amostra. As barras indicam os resultados médios e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes avaliados em triplicata.



Fonte: Fonte própria

CMC2.24 e atividade fagocitária em macrófagos

Macrófagos tem um papel central na inflamação crônica de origem infecciosa associada às doenças periodontais, não apenas na produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, mas também na fagocitose e apresentação de antígenos microbianos. Assim, considerando o efeito 'imunossupressor' do CMC2.24, representado pela inibição da produção de mediadores inflamatórios pelos macrófagos, avaliamos os efeitos também sobre a atividade fagocitária. Experimento *in vitro* indicou que o pré-tratamento com CMC2.24 reduziu de forma significativa a atividade fagocitária já a partir da concentração de 1 μM , porém sem efeito dose-dependente (Figura 18).

Figura 18 - CMC2.24 inibe significativamente a atividade fagocitária de macrófagos. (A) Número de células Raw 264.7 com presença de bactérias fagocitadas no citoplasma (3 campos/poço, três experimentos independentes). (B) Imagens representativas obtidas no microscópio de fluorescência invertido de poços de cada grupo experimentais (azul: núcleo celular marcado com DAPI; verde: actina citoplasmática marcada com Faloidina conjugada com AlexaFluor488; vermelho: partículas bacterianas marcadas com pHRodo Red (pHRodo Red E.coli Bioparticles, Molecular Probes), aumento de 40X (linha horizontal indica escala de 100 μm). (Continua)

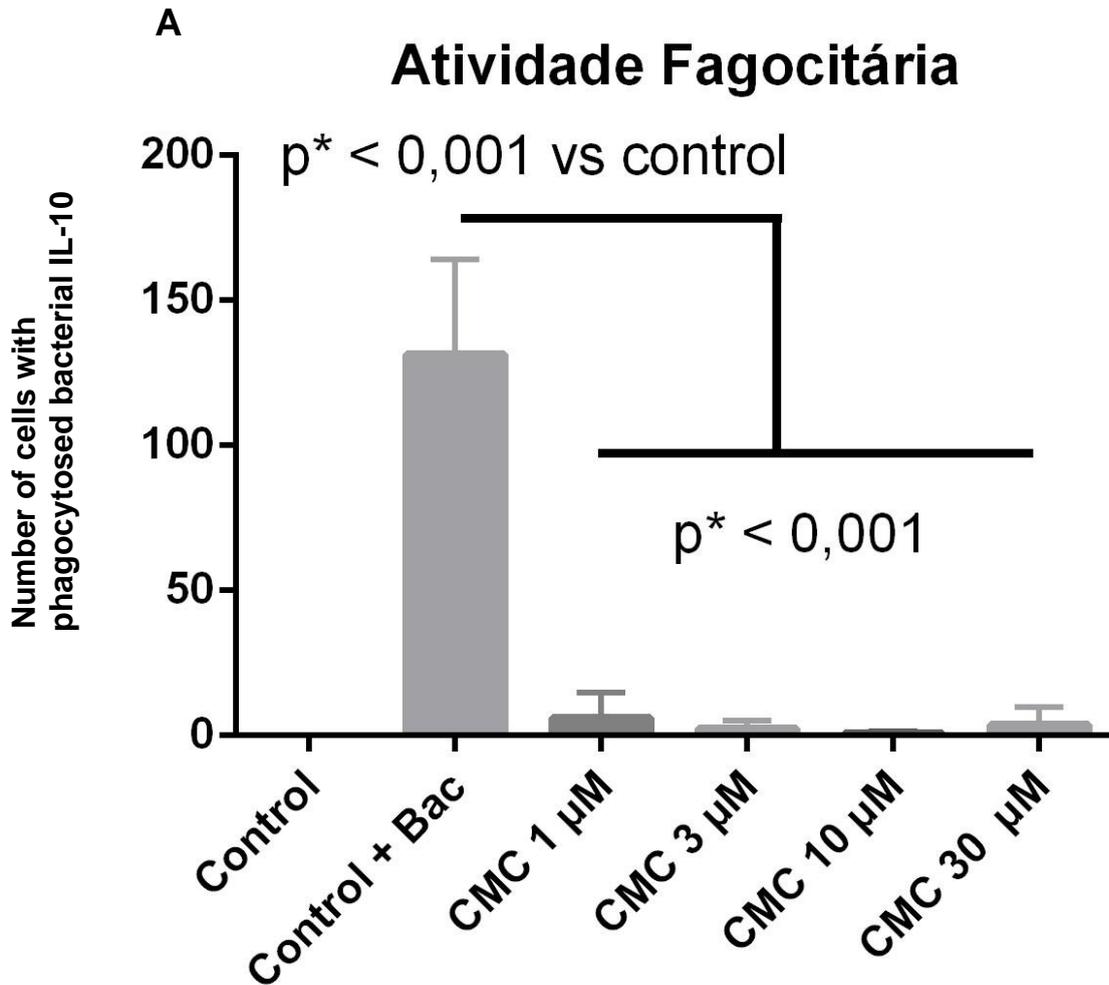
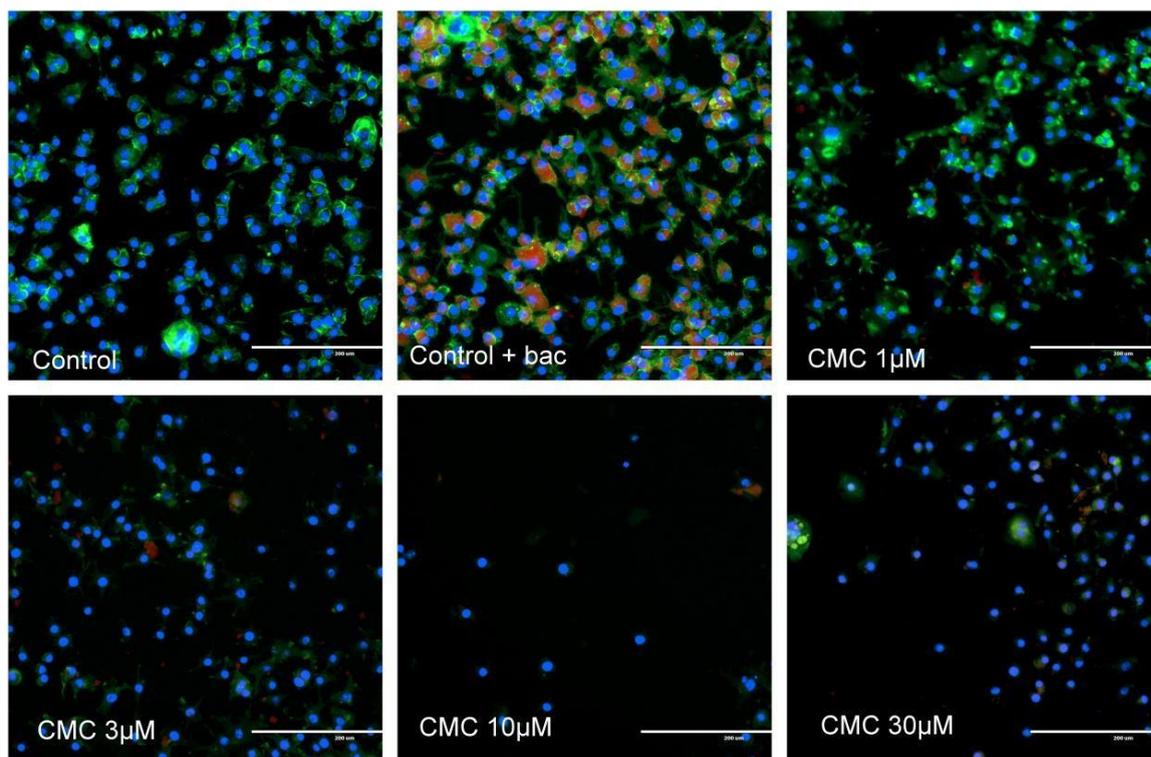


Figura 18 - CMC2.24 inibe significativamente a atividade fagocitária de macrófagos. (A) Número de células Raw 264.7 com presença de bactérias fagocitadas no citoplasma (3 campos/poço, três experimentos independentes). (B) Imagens representativas obtidas no microscópio de fluorescência invertido de poços de cada grupo experimentais (azul: núcleo celular marcado com DAPI; verde: actina citoplasmática marcada com Faloidina conjugada com AlexaFluor488; vermelho: partículas bacterianas marcadas com pHRodo Red (pHRodo Red E.coli Bioparticles, Molecular Probes), aumento de 40X (linha horizontal indica escala de 100 μ m). (Conclusão)

B

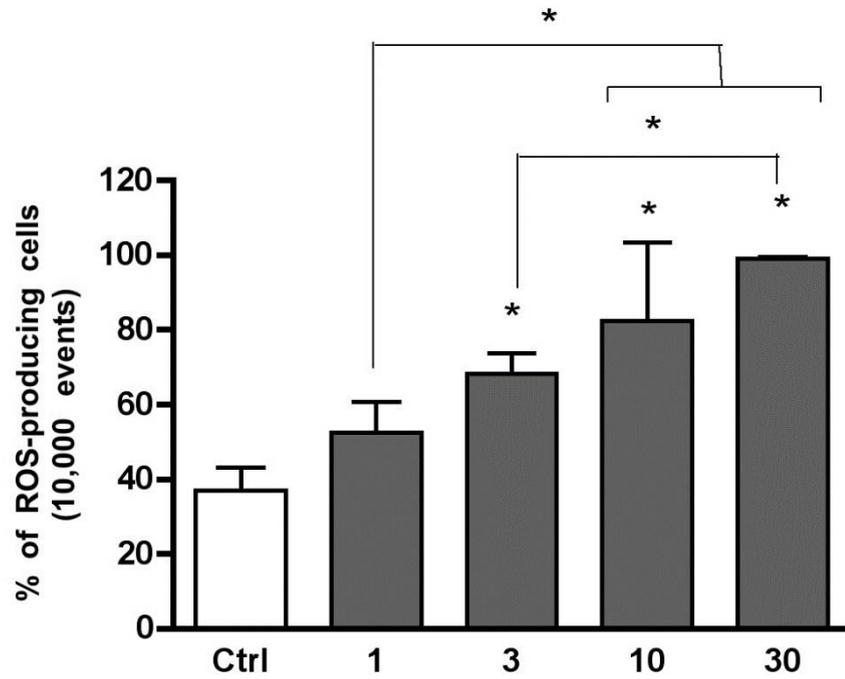


Fonte: Fonte própria

CMC2.24 estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos de forma dose-dependente

Com o surto oxidativo e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um indicador importante da resposta biológica de macrófagos à estressores externos e também um mecanismo envolvido na indução de morte de microrganismos fagocitados, avaliamos os efeitos do CMC2.24 na produção de ROS pelos macrófagos (Figura 19). Os resultados do experimento avaliando a produção de ROS por macrófagos indicam um efeito estimulatório dose-dependente do CMC2.24.

Figura 19 - CMC2.24 estimula de forma dose-dependente a produção de ROS por macrófagos. Barras indicam percentual médio % de macrófagos produzindo ROS, e linhas verticais o erro padrão da media (SEM). Resultados de três experimentos independentes avaliados em duplicata.



Fonte: Fonte própria

5 DISCUSSÃO

Os resultados mostram que a administração sistêmica de CMC 2.24 inibiu significativamente a perda óssea, a osteoclastogênese e a inflamação no modelo de doença periodontal induzida por injeções de LPS (lipolissacarídeos) já a partir da dose de 3 mg/Kg, porém sem efeito dose-dependente. In vitro, experimentos utilizando macrófagos demonstraram que o CMC2.24 (curcumin modificado quimicamente) inibe a produção de TNF e IL-10 após estímulos microbianos. Além disso, CMC2.24 também inibiu atividade fagocitária e estimulou a produção de ROS em macrófagos.

As principais características histopatológicas das doenças periodontais são a reabsorção do osso alveolar e a inflamação dos tecidos periodontais (Garlet et al.²⁰, 2010). A homeostase do tecido ósseo depende de um equilíbrio entre os processos de formação/aposição pelos osteoblastos e de reabsorção por osteoclastos (Goltzman²², 2002). Desequilíbrios neste processo combinado de aposição/reabsorção estão associados ao desenvolvimento de diversas doenças, como a osteoporose, a artrite reumatóide e as doenças periodontais. O composto natural curcumin foi capaz de inibir a formação de osteoclastos a partir de inibição dos precursores de osteoclastos através do bloqueio de ativação de NF- κ B, porém em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa, observamos que a administração sistêmica de curcumin resultou em marcante inibição da resposta inflamatória, porém sem efeito significativo na reabsorção óssea em modelo de doença periodontal (Guimarães et al.²⁷, 2011).

Existem evidências indicando que curcumin possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-amiloidogênicas (Zhao et al.⁵³, 1989); porém, suas pobres propriedades farmacodinâmicas podem representar uma limitação à sua aplicabilidade, especialmente na administração sistêmica, incluindo a baixa taxa de absorção gastrointestinal, rápida eliminação/curta meia-vida sérica e baixa solubilidade em meio aquoso (Epstein et al.¹⁸, 2010). Outra complicação associada ao uso do curcumin natural obtido como extrato fitoterápico é a complexidade de sua composição química, que inclui diferentes formas estéricas do curcumin, as quais apresentam diferentes propriedades biológicas e podem estar presentes em diferentes proporções no extrato, dependendo da metodologia de

extração / preparo do fitoterápico e também da origem geográfica (composição do solo) onde foi cultivada a planta herbácea *Curcuma longa*.

Análogos sintéticos do curcumin vêm sendo desenvolvidos e testados com o objetivo de proporcionar maior consistência nos efeitos biológicos e melhorar as propriedades farmacodinâmicas. O curcumin modificado quimicamente (CMC) utilizado neste trabalho foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Dr. Lorne M. Golub (Department of Oral Biology, State University of New York at Stony Brook, New York, NY) que nos forneceu o composto CMC2.24 para estudos em colaboração, por meio de acordo de transferência de material (MTA, Material Transfer Agreement). O CMC2.24 é um composto mais solúvel em meio aquoso e possui capacidade de se ligar ao zinco, inibindo a atividade de diversas metaloproteinases (MMPs). Como este composto é único e não disponível comercialmente, não temos outros trabalhos utilizando este composto para comparação; assim vamos nos referir a trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa (Curylofo¹⁵, 2014) e à estudos descrevendo as propriedades do curcumin natural nesta discussão dos achados deste trabalho.

A apoptose é considerada importante na resolução de processos inflamatórios, sendo responsável pela eliminação das células inflamatórias quando o processo diminui a atividade (Wylee⁵¹, 1991; Searle et al.⁴¹, 1982), bem como pode ser importante na mediação dos efeitos anti-neoplásicos do curcumin (Vallianou et al.⁴⁹, 2015). Estudos mostraram que o curcumin foi capaz de provocar apoptose de forma dose-dependente, sendo este efeito relacionado ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) decorrente de um rápido esgotamento de glutathiona oxidada (GSH), que aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio e eleva a eliminação de peróxido no citosol, bem como na mitocôndria. Por possuir essa característica, o curcumin libera fatores indutores de apoptose (caspases, citocromo c), bem como de endonucleases, causando fragmentação do DNA. A administração sistêmica de CMC2.24 (na dose de 10 mg/Kg) no modelo de doença periodontal induzida por LPS, no entanto, não resultou em notável aumento de apoptose nos tecidos gengivais (Curylofo¹⁵, 2014). Os autores observaram que as maiores concentrações / doses de CMC2.24 utilizadas nos experimentos in vitro e in vivo não levam à apoptose, consideramos que os efeitos biológicos observados não são influenciados por aumento da morte celular.

Além de sua relevância na apoptose, o estresse oxidativo com a geração de ROS são implicados na fisiopatologia de muitas desordens degenerativas e inflamatórias, por exemplo, a aterosclerose. Por outro lado, a geração de ROS, particularmente ânions superóxido e radicais hidroxil também é um importante mecanismo de indução de morte de microrganismos por células fagocitárias da resposta imune, exercendo, assim, um papel importante na defesa do hospedeiro em condições infecciosas. Observamos que CMC2.24 *in vitro* aumentou significativamente e de forma dose-dependente produção de ROS por linhagem celular de macrófagos murinos. Por outro lado, a atividade fagocitária dos macrófagos foi significativamente inibida pelo CMC2.24.

Em macrófagos murinos primários (isolados a partir do peritônio de ratos), 10 μM de curcumin inibiu a geração ROS (Joe, Lokesh³⁴, 1994). Efeito semelhante é relatado *in vivo*, com redução de ROS no sangue periférico após a administração de curcumin (Tonnesen, Greenhill⁴⁸, 1992). Também existem relatos de que o curcumin tem papel importante na eliminação de radicais de ânion superóxido e de radicais hidroxil (Sreejayan, Rao⁴⁵ 1996). Concentração reduzida (0.5 μM) do curcumin natural aumentaram a atividade fagocítica de células gliais do sistema olfatório (Tello et al.⁴⁷, 2014), enquanto concentrações maiores de curcumin inibiram a fagocitose de peptídeos beta-amiloide por células gliais (He et al.²⁹, 2016). Interessante observar que estudo empregando a mesma linhagem celular de macrófagos murinos relata que o curcumin natural aumentou significativamente a atividade fagocitária não-inflamatória (autofagia), porém inibindo significativamente a atividade fagocitária inflamatória (na presença de LPS bacteriano) (Bisht et al.¹¹, 2009).

Estas discrepâncias podem estar relacionadas à diversos fatores, em especial as diferenças de ação biológica entre CMC2.24 e o curcumin natural devido à composição química menos variável e diferenças nas propriedades farmacodinâmicas, em especial a solubilidade. Além disso, diferenças na abordagem experimental, incluindo tipo celular, metodologia de avaliação da produção de ROS e da atividade fagocitária podem estar envolvidas nas diferenças entre nossos resultados e os relatos da literatura.

As propriedades anti-inflamatórias do curcumin têm sido atribuídas a sua capacidade de prevenir a ativação do fator nuclear kappa β e conseqüentemente, a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, citocinas, moléculas de adesão, ciclooxigenase 2, fosfolipase A2, mieloperoxidase, colagenase, bem

como sua capacidade de modular a atividade de linfócito T e macrófagos (Sharma et al.⁴³, 2005). Nas doenças periodontais, níveis aumentados de mediadores inflamatórios estão direta e/ou indiretamente relacionados com a degradação de tecidos mineralizados e não mineralizados. Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (Curylofo¹⁵, 2014) demonstrou que a administração sistêmica diária de CMC2.24 na dose de 30 mg/Kg, durante 15 dias reduziu significativamente a perda óssea alveolar e o infiltrado inflamatório em modelo de doença periodontal induzida por LPS. Neste estudo, a intenção foi verificar se doses inferiores de CMC2.24 apresentavam os mesmos efeitos biológicos neste modelo, pelos seguintes motivos: 1) possibilidade que os efeitos biológicos sejam inversamente relacionados à dose/concentração do composto; 2) doses menores estão associadas à menor risco de efeitos adversos / interferência com outros processos fisiológicos e interações com outros medicamentos, além de apresentarem melhor custo-benefício. Assim, utilizamos a mesma dose do estudo anterior (30 mg/Kg), como controle positivo e verificamos a efetividade anti-inflamatória do CMC2.24 em concentrações de 1, 3, e 10 mg/Kg, que reduziram significativamente a perda óssea alveolar e o infiltrado inflamatório em modelo de doença periodontal induzida por LPS. Os resultados do experimento in vivo foram, em geral, menos marcantes para a dose de 1mg/Kg de CMC 2.24, porém a partir da dose de 3 mg/Kg observamos um plateau nos efeitos biológicos do CMC 2.24, indicando que esta é a dose mínima associada aos efeitos biológico significativos neste modelo experimental. Estes resultados são relevantes, na medida em que a dose mínima efetiva de 3 mg/Kg é 10 vezes menor que a dose utilizada no experimento anterior (30 mg/Kg). Não podemos descartar a possibilidade que doses inferiores a 3 mg/Kg e maiores que 1 mg/Kg também tenham os mesmos efeitos biológicos; porém as doses utilizadas neste projeto foram determinadas arbitrariamente e limitadas pela quantidade de CMC 2.24 disponível, além dos custos envolvidos na realização de experimentos com grande número de animais,

Estudo anterior de nosso grupo (Guimarães et al.²⁶, 2012) demonstrou que o curcumin natural reduziu significativamente o infiltrado inflamatório e inibiu de forma potente a expressão gênica dos mediadores inflamatórios IL-6, TNF e prostaglandina E2- síntase. Nesse estudo, observamos que CMC 2.24 inibiu significativamente a expressão gênica de citocina inflamatória (TNF) e anti-inflamatória (IL-10) nos tecidos gengivais a partir da dose de 1mg/Kg. In vitro, os

resultados de modulação da expressão gênica não corresponderam exatamente aos resultados de produção e secreção das proteínas, possivelmente devido ao fato das duas citocinas-alvo avaliadas (TNF e IL-10) apresentarem regulação pós-transcricional. Assim, uma vez que as proteínas apresentam a função biológica considerando os dados de secreção/produção de IL-10, observamos marcante inibição com todas as concentrações testadas do CMC2.24, enquanto a produção de TNF-alfa foi significativamente inibida a partir da concentração de 3 μ M in vitro, indicando seu potente efeito anti-inflamatório e sugerindo a indução de um estágio de anergia nos macrófagos. Embora seja tentador relacionar estes resultados com os dados do experimento in vivo, em que a redução de osteoclastos foi significativa apenas a partir da dose de 3 mg/Kg, é preciso destacar que não há correspondência direta entre as doses utilizadas no experimento in vivo e as concentrações empregadas nos experimentos in vitro.

A proposta principal deste trabalho foi respondida: 3 mg/Kg de CMC 2.24 administrado sistemicamente é a dose mínima eficaz na redução da perda óssea e inflamação associados ao modelo de doença periodontal utilizado, indicando a potência do composto. Para fins comparativos, estudo anterior de nosso grupo no mesmo modelo experimental de doença periodontal induzida por LPS (dados não apresentados, estudo em fase de preparo para submissão), a administração sistêmica do composto natural curcumin só foi eficaz na inibição da reabsorção óssea inflamatória na dose de 400 mg/Kg (mais de 100X maior que a dose mínima eficaz de CMC2.24). Os experimentos in vitro demonstraram supressão da função de macrófagos, com redução da atividade fagocitária e da produção de TNF-alfa e IL-10. Por outro lado, observamos significativo aumento da produção de ROS por macrófagos após o tratamento com CMC2.24, resultado que não conseguimos interpretar em conjunto com os demais dados obtidos in vitro e com os dados de estudos anteriores, indicando a ausência de citotoxicidade do CMC2.24.

Os experimentos in vitro são limitados por avaliarem apenas um único tipo celular, bem como pelo fato de se tratar de uma linhagem celular de camundongo e não de macrófagos primários de ratos. Existe, ainda, a impossibilidade de comparação com as doses de CMC2.24 utilizadas no experimento in vivo com as concentrações de CMC2.24 empregadas nos experimentos in vitro, já mencionada anteriormente. Os resultados de produção de ROS sugerem que o CMC2.24 resulta em marcante estresse nos macrófagos, o qual pode estar relacionado à indução de

anergia ou de apoptose inicial. Isso é sugerido pelas alterações morfológicas celulares observadas no experimento de atividade fagocitária, em que pesem os dados do estudo anterior indicando a ausência de citotoxicidade do CMC2.24 avaliada por ensaio de exclusão de azul e, conseqüentemente inibição da produção de IL-10 e TNF, bem como inibição da atividade fagocitária.

Finalmente, é preciso considerar que a administração de CMC2.24 in vivo 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 deste composto e reforçando o potencial interesse em sua aplicação terapêutica na modulação da inflamação e reabsorção óssea associada à esta inflamação. Estudos subsequentes deverão avaliar o potencial do CMC2.24 em humanos, em particular com aplicação local do composto nos sítios afetados pela doença periodontal.

6 CONCLUSÃO

A administração oral de CMC 2.24 reduziu de forma significativa a partir da dose de 3 mg/Kg a reabsorção óssea inflamatória e o número de osteoclastos presentes nas proximidades do osso alveolar, bem como a inflamação associada ao modelo de doença periodontal induzida por LPS.

Em macrófagos murinos, CMC 2.24 inibiu significativamente a produção de TNF e IL10 e a atividade fagocitária de forma não dependente da concentração, mas significativa a partir da concentração de 3 μ M. A produção de ROS por macrófagos foi aumentada pelo CMC 2.24 de forma dependente da concentração, sendo significativa já a partir da concentração de 1 μ M.

REFERÊNCIAS*

1. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003; 23(1A): 363- 98
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 I κ B 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. Aggarwal BB, Shishodia S. Suppression of the nuclear factor-kappa B activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Ann N Y Acad Sci.* 2004, 1030: 434-41.
5. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 1991;57(1):1e7
6. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007; 4(6): 807-18.
7. 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.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>

8. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Lett.* 2008; 267(1): 133- 64
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 câncer. *Mol Cancer Ther.* 2011; 9(8): 2255–64.
11. Bisht K, Choi WH, Park SY, Chung MK, Koh WS. Curcumin enhances non-inflammatory phagocytic activity of RAW264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 379(2):632-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.135.
12. Bremner P, Heinrich M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54(4): 453–72.
13. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patient with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 2001; 21 (4B): 2895-900.
14. Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol.* 1994; 59(3):295-302.
15. Curylofo FA. Modulação da reabsorção óssea inflamatória por curcumin modificado quimicamente: efeito na osteoclastogênese. [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2014.

16. Dai XZ, Yin HT, Sun LF, Hu X, Zhou C, Zhou Y, et al. Potential therapeutic efficacy of curcumin in liver cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(6): 3855-9.
17. Elburki MS, Rossa C, Guimaraes MR, Goodenough M, Lee HM, Curylofo FA, et al. A novel chemically modified curcumin reduces severity of experimental periodontal disease in rats: initial observations. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:959471. doi: 10.1155/2014/959471.
18. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Review Article Curcumin as therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 2010; 103(11): 1545-57.
19. Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappa B as a target for cancer drug development. *Leukemia.* 2002; 16 (6): 1053-68.
20. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 2010;89 (12):1349–63.
21. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75 (4): 787-809.
22. Goltzman D. Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(10):784-96.
23. Gonçalves V, Ortega AAC, Guimarães MR, Curylofo FA, Junior CR, Ribeiro D A, et al. Chemopreventive activity of systemically administered Curcumin on oral cancer in the 4-Nitroquinoline 1-Oxide model. *J Cell Biochem.* 2015; 116: 787–96.
24. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol.* 2012;15:117-32. doi: 10.1159/000329675.

25. Gutierrez VO, Pinheiro CM, Assis RP, Vendramini RC, Pepato MT, Brunetti IL. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. *Br J Nutr.* 2011. 108(3):440-8.
26. 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.
27. 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.
28. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol.* 2001. 28(4): 283-95
29. He GL, Luo Z, Yang J, Shen TT, Chen Y, Yang XS. Curcumin Ameliorates the reduction effect of PGE2 on fibrillar β -Amyloid Peptide (1-42)-Induced Microglial Phagocytosis through the Inhibition of EP2-PKA signaling in N9 microglial cells. *PLoS One.* 2016. 29;11(1):e0147721. doi: 10.1371/journal.pone.0147721.
30. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway, CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999; 284(5418): 1313-8.
31. Holt PR, Katz S, Kirshoff R. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. *Dig Dis Sci.* 2005; 50(11): 2191-3.
32. Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P. Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR- gamma activation. *PPAR Res.* 2007, 2007:89369
33. Jagetia GC, Rajanikant GK. Curcumin treatment enhances the repair and regeneration of wounds in mice exposed to hemibody gamma-irradiation. *Plast Reconstr Surg* 2005;115 (2):515–28.

34. Joe B, Lokesh BR. Role of capscarcin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophags. *Biochim Brophys Acta*. 1994; 1224(2): 255-63.
35. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, Otremba J, Coatney DD, Kreider JM, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 ;320 (1) :56-63.
36. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci*. 2006; 78(18): 2081-7.
37. Mohanty C, Sahoo SK. The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. *Biomaterials*. 2010. 31(25):6597-611. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.062.
38. Ozaki K, Kawata Y, Amano S, Hanazawa S. Stimulatory effect of curcumin on osteoclast apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59(12): 1577-81.
39. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9-11.
40. Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-B1: regulation and function *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(8): 1425-30.
41. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*. 1982; 17: 229- 59.
42. Shao W, Yu Z, Chiang Y, Yang Y, Chai T, Foltz W, et al. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. *PLoS One* 2012; 7(1): e28784. doi:10.1371/journal.pone.0028784

43. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*. 2005; 41(13): 1955-68.
44. Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc*. 1990. 121(4): 532-6
45. Sreejayan N, Rao MNA. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung*. 1996; 46(2): 169-71.
46. Swarnakar S, Ganguly K, Kundu P, Banerjee A, Maity P, et al. 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.
47. Tello Velasquez J, Watts ME, Todorovic M, Nazareth L, Pastrana E, Diaz-Nido J, et al. Low-dose curcumin stimulates proliferation, migration and phagocytic activity of olfactory ensheathing cells. *PLoS One*. 2014; 9(10):e111787. doi: 10.1371/journal.pone.0111787. eCollection 2014.
48. Tonnesen HH, Greenhill JV. Studies on curcumin and curcuminoids. XXII. Curcumin as a reducing agent and as a radical scavenger. *Int J Pharma* 1992; 87 (2): 79-87.
49. Vallianou NG, Evangelopoulos A, Schizas N, Kazazis C. Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin. *Anticancer Res*. 2015; 35(2):645-51.
50. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 853(1-2):183-9.

51. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: a review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2011; 10:12. Doi: 10.1186/1476-4598-10-12
52. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev*. 1991; 11 (2): 95-103
53. Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophysics* 1989; 14 (2): 175-85
54. Zou P, Helson L, Maitra A, Stern ST, McNeil SE. Polymeric curcumin nanoparticle pharmacokinetics and metabolism in bile duct cannulated rats. *Mol Pharm*. 2013; 10(5): 1977–87.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



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



Proc. CEUA nº 15/2014

Araraquara, 17 de junho de 2014.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado **"AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOSE-RESPOSTA DE CMC 2.24 NO MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR LPS EM ROEDOR"** (Proc. CEUA nº 15/2014) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para **AGOSTO/2016**.

Atenciosamente.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao
Prof. Dr. CARLOS ROSSA JUNIOR
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

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

Araraquara, 18 de março de 2016.

DAYANE DE ALMEIDA BRANDÃO