

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Departamento de Odontologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Avaliação dos efeitos da curcumina e bpV(pic) como moduladores da via
PI3K-PTEN-AKT-mTOR na morfologia de modelo *in vitro* de mucosite oral**

Victor Paiva Barbosa

Brasília, 24 de janeiro de 2023

Victor Paiva Barbosa

Avaliação dos efeitos da curcumina e bpV(pic) como moduladores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR na morfologia de modelo *in vitro* de mucosite oral

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra

Coorientadora: Juliana Amorim dos Santos

Brasília, 2023

Victor Paiva Barbosa

Avaliação dos efeitos da curcumina e bpV(pic) como moduladores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR na morfologia de modelo *in vitro* de mucosite oral

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 24 de janeiro de 2023

Banca examinadora:

Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra (Orientadora)

Profa. Dra. Nilce Santos de Melo (Membro Titular)

Profa. Ma. Ana Gabriela Costa Normando (Membro Titular)

Mylene Martins Monteiro (Suplente)

*Dedico este trabalho à comunidade científica, que produz conhecimento por meio da
colaboração.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília (UnB), por promover um ensino público e de qualidade.

Ao Programa de Iniciação Científica da UnB e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de fazer ciência e pelo financiamento dos meus projetos.

À minha querida mãe, Roneide, que tornou todas as minhas realizações possíveis. Minha eterna gratidão por todos os conselhos, sacrifícios e dedicação. Você tem o meu amor de forma incondicional.

À minha segunda mãe, Elena, que me tem como seu filho e sempre fez de tudo por mim.

Ao meu pai, Gilson, pelo apoio e vibração pelas minhas conquistas.

À minha irmã Thaynara, que sempre esteve do meu lado e à minha irmã Mayara, que faleceu durante minha graduação e não conseguiu ver meu diploma, mas que, de alguma forma, intercede por mim.

À minha orientadora, Eliete, por todos os ensinamentos. Obrigado por sua competência e exigência como orientadora, visando sempre a formação de excelentes profissionais.

À minha coorientadora, Juliana, por todo aprendizado e amizade. Obrigado por compartilhar experiências sobre ciência e a vida, e por estar presente em momentos de dificuldade.

Ao Laboratório de Histopatologia Oral da UnB, grupo do qual me orgulho de fazer parte. Muito obrigado por toda colaboração e suporte nos diversos aspectos da vida, Bruna Bastos, Isabella, Larissa, Lídia, Mylene, Quele e Vitória.

Aos meus professores de graduação, grandes mestres dedicados à geração de grandes profissionais.

À minha meia dupla, Luana, por ser minha fiel companhia durante toda a graduação, por sempre almejar o aprimoramento do nosso atendimento e pela parceria fora da UnB.

À minha colega Juliana Maria, que não mede esforços para ajudar o próximo e por ser a querida guardiã da Turma 76.

A todos os meus colegas da Turma 76, pelo tempo que passamos juntos dentro e fora da UnB. Tenho convicção de que serão grandes nomes da Odontologia. Agradeço especialmente ao meu estimado grupo de colegas composto por Ana Gabriela, Ana Luiza de Castro, Bruna Dias, Lucas, Patrícia, Susana e Yanka, por sempre me ajudar, ensinar e tornar o período da graduação mais confortável.

À Ana Luiza Vaz, por ser minha amiga conselheira e confidente.

A todos que contribuíram para a realização da formatura da Turma 76 por meio da compra de rifas.

Aos meus pacientes durante o período de graduação, por possibilitarem meu aprendizado e evolução profissional.

Ao Hospital Universitário de Brasília, composto por funcionários sempre dispostos a permitir o funcionamento pleno dos atendimentos.

A todos que cruzaram meu caminho e contribuíram de alguma forma para que eu ocupasse minha atual posição.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

RESUMO

Mucosite oral (MO) é uma condição inflamatória e efeito adverso que afeta muitos pacientes sob tratamento antineoplásico. Essa condição pode impactar a qualidade de vida dos pacientes e ainda não há intervenções padrão de referência. Nesse contexto, moduladores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR são potenciais alternativas para acelerar o tratamento de lesões na mucosa. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da curcumina e bpV(pic), moduladores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, em modelo *in vitro* de MO, com foco na viabilidade celular, toxicidade e alterações no citoesqueleto. O modelo foi estabelecido utilizando monocultura de queratinócitos humanos imortalizados e cultura primária de fibroblastos humanos gengivais. Três estímulos foram usados para induzir o modelo: lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, extrato proteico de *Porphyromonas gingivalis* e radiação ionizante. Os efeitos da curcumina e bpV(pic) foram avaliados por teste de viabilidade e imunofluorescência com faloidina e DAPI. A área celular e nuclear e o diâmetro das células foram mensurados utilizando o software ImageJ. Tratamento com curcumina aumentou a viabilidade de fibroblastos ($p < 0,01$) e a área nuclear ($p < 0,005$) e reduziu a área citoplasmática de queratinócitos ($p < 0,05$). Tratamento com bpV(pic) também aumentou a viabilidade de fibroblastos ($p < 0,05$) e a área nuclear ($p < 0,0001$) e reduziu a área citoplasmática de queratinócitos ($p < 0,001$). Os tratamentos foram capazes de modular o modelo *in vitro* de MO induzindo proliferação e processo de reparo. Os resultados reforçam a evidência disponível de que moduladores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR podem ser tratamentos adjuvantes efetivos no manejo da mucosite, otimizando a qualidade de vida dos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: Mucosite oral; PI3K-PTEN-AKT-mTOR; Curcumina; bpV(pic); Modelo *in vitro*; Reparo.

ABSTRACT

Oral mucositis (OM) is an inflammatory condition and common adverse reaction that affects many people under antineoplastic treatment. This condition may impact patients' quality of life and there is still no standardized approaches recommendation. In this setting, PI3K-PTEN-AKT-mTOR pathway modulators are potential alternatives to accelerate mucosal lesions treatment. The aim of this study was to analyze the effects of curcumin and bpV(pic), both PI3K-PTEN-AKT-mTOR pathway modulators, in an *in vitro* model of OM, focusing on the analysis of cell viability, toxicity, and cytoskeleton alterations. The *in vitro* model was established using monoculture strains of immortalized human keratinocytes and primary culture of human gingival fibroblasts. Three stimuli were used to induce the OM model: lipopolysaccharide of *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* protein extract, and ionizing radiation. Curcumin and bpV(pic) effects were analyzed by viability test and immunofluorescence using phalloidin and DAPI. Cellular and nuclear area and diameter of cells were measured using ImageJ. Treatment with curcumin increased fibroblasts' viability ($p < 0.01$) and nuclear area ($p < 0.005$), and reduced cytoplasmatic area of keratinocytes ($p < 0.05$). Treatment with bpV(pic) also increased fibroblasts' viability ($p < 0.05$) and nuclear area ($p < 0.0001$), and reduced cytoplasmatic area of keratinocytes ($p < 0.001$). The treatments were capable of modulate the *in vitro* model of OM inducing cell proliferation and healing process. The results reinforce the currently available evidence that PI3K-PTEN-AKT-mTOR pathway modulators could be effective adjuvant treatments in mucositis management, optimizing patients' quality of life.

KEYWORDS: Oral mucositis; PI3K-PTEN-AKT-mTOR; Curcumin; bpV(pic); *in vitro* model; Healing process.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Efeitos da curcumina e bpV(pic) na viabilidade celular de queratinócitos e fibroblastos. As barras representam média \pm desvio padrão. Significância estatística: One-way ANOVA e teste de Dunnet; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 18
- Figura 2** - Efeitos da curcumina e bpV(pic) na área citoplasmática, área nuclear e diâmetro de queratinócitos. As barras representam mediana (IQR). Significância estatística: teste de Kruskal-Wallis; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ 19
- Figura 3** - Imunofluorescência de queratinócitos corados com faloidina (verde) e DAPI (azul) - Ampliação de 63X (barras de escala = 25 μ M). (A) Grupo controle; (B) Grupo BpV(pic); (C) Grupo curcumina. 19
- Figura 4** - Efeitos da curcumina e bpV(pic) na área citoplasmática, área nuclear e diâmetro de fibroblastos. As barras representam mediana (IQR). Significância estatística: teste de Kruskal-Wallis; ** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$ 20
- Figura 5** - Imunofluorescência de fibroblastos corados com faloidina (verde) e DAPI (azul) - Ampliação de 63X (barras de escala = 25 μ M). (A) Grupo controle; (B) Grupo BpV(pic); (C) Grupo curcumina. 20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bpV(pic)	Bisperoxovanádio 5-hidroxipiridina
DAPI	<i>4'6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride</i>
DMEM	Meio Eagle Dulbecco Modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FG	Fibroblastos gengivais
HaCat	Queratinócitos humanos imortalizados
HCl	Ácido clorídrico
KGF-1	Fator de crescimento de queratinócitos-1
LPS	Lipopolissacarídeo
MASCC/ISOO	<i>Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology</i>
ME	Matriz extracelular
MO	Mucosite oral
mTOR	Proteína alvo da rapamicina
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NF-kB	Fator nuclear-kB
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PG	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PTEN	Homólogo da fosfatase tensina
RI	Radiação ionizante
USD	Dólar americano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1 CULTURA CELULAR	15
2.2 MODELO <i>IN VITRO</i> DE MUCOSITE ORAL	15
2.3 MODULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K-PTEN-AKT-MTOR	15
2.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	16
2.5 CYTOSKELETON MORPHOLOGY	16
2.6 STATISTICAL ANALYSES	17
3 RESULTADOS.....	17
3.1 VIABILIDADE CELULAR	17
3.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA	18
4 DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
ANEXOS	26
NORMAS DA REVISTA.....	26

1 | INTRODUÇÃO

A mucosite oral (MO) é uma reação adversa comum da terapia antineoplásica. É uma condição inflamatória que afeta cerca de 20% a 40% dos pacientes submetidos à quimioterapia convencional para tumores sólidos, aproximadamente de 60% a 85% dos pacientes que recebem altas doses de quimioterapia e relativamente de 80% a 100% daqueles submetidos à radiação ionizante (RI) para câncer de cabeça e pescoço [1–3].

Os tratamentos oncológicos podem desencadear uma cascata de eventos biológicos que resultam em lesões eritematosas e atróficas com sensação de queimação a lesões ulcerativas confluentes, dolorosas e profundas que penetram a submucosa com formação de pseudomembrana [4,5]. As úlceras raramente envolvem o tecido queratinizado e muitas vezes afetam a mucosa móvel [6]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as lesões de mucosite oral em 5 graus: Grau 0 - Sem alteração; Grau 1 - Dor e eritema; Grau 2 - Formação de úlcera, com alimentação viável com sólidos; Grau 3 - Apenas dieta líquida; e Grau 4 - Alimentação não possível [7]. Desse modo, a MO influencia diretamente a qualidade de vida dos pacientes, prejudicando a ingestão alimentar e a capacidade de falar, além de aumentar as chances de infecções sistêmicas. [8].

A patobiologia da MO envolve 5 fases sobrepostas e inter-relacionadas: Iniciação - RI e agentes quimioterápicos causam lesões no DNA das células, promovendo a morte das células epiteliais basais e a gênese de espécies reativas de oxigênio (EROs); Sinalização e amplificação - A terapia antineoplásica e as EROs ativam fatores de transcrição, como o NF-kB, que pode causar apoptose e regula a expressão de numerosas citocinas pró-inflamatórias, que podem exercer feedback positivo sobre o NF-kB para amplificar sua resposta; Ulceração - Os mecanismos acima suportam a formação de úlceras que penetram a submucosa e uma pseudomembrana; e Cicatrização - Guiada pela matriz extracelular (MEC) da submucosa, o reparo das lesões ocorre espontaneamente após cessação do tratamento antineoplásico [9,10].

Ponderando a patobiologia da MO, o tratamento atual de pacientes está focado na prevenção de infecções secundárias, alívio da dor e manutenção do suporte dietético [11]. A *Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology* (MASCC/ISOO) recomendam o uso de benzidamina, terapia de fotobiomodulação intraoral, crioterapia oral e fator de

crescimento de queratinócitos humanos recombinantes-1 (KGF-1) como intervenções para MO [11]. No entanto, ainda não há uma recomendação específica de abordagens padronizadas para mucosite oral [11]. Portanto, a comunidade científica deve continuar a se esforçar para o desenvolvimento de novas intervenções para o tratamento da MO, visando a segurança e o mínimo de efeitos adversos.

Nesse contexto, a pesquisa em andamento tem como alvo a interrupção/modulação das vias inflamatórias, a redução da carga bacteriana e a promoção da cicatrização como potenciais abordagens terapêuticas [12,13]. Uma vez que a via PI3K-PTEN-AKT-mTOR coordena várias funções, como o crescimento celular, a sobrevivência e a progressão do ciclo celular [14], a modulação dessa via pode desempenhar um papel importante no processo de reparo [15]. Embora poucos estudos avaliem essa modulação em campos da MO, muitos autores a têm visado o reparo acelerado de lesões de mucosa. [16–18].

Como uma alternativa de tratamento potencial, a curcumina é um polifenol natural isolado de *Curcuma longa* Linn e possui propriedades antioxidantes, analgésicas e anti-inflamatórias. [19,20]. A característica anti-inflamatória baseia-se principalmente na inibição de NF-κB [21]. Uma vez que NF-κB e EROs desempenham um papel crítico na patogênese da MO [9], a curcumina representa um potencial agente de tratamento para MO durante as fases inflamatórias [22]. Em relação ao potencial de modular a via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, a curcumina é capaz de inibir o complexo 1 de mTOR 1 e PTEN [23,24]. Esse composto parece ter um efeito bidirecional quando diferentes tipos de células, doses e métodos experimentais são levados em consideração [25]. Assim, a sinalização de reparo em células não neoplásicas é uma hipótese que necessita de mais análises para o reparo de lesões de MO.

Da mesma forma, o bisperoxovanádio 5-hidroxipiridina, conhecido como bpV(pic), é outro composto promissor associado à via PI3K [26]. A aplicação tópica de bpV(pic) demonstrou indução de reparo e regeneração tecidual devido à sua inibição reversível de PTEN, um antagonista da via de sinalização [27].

Portanto, o objetivo deste estudo é analisar os efeitos da curcumina e bpV(pic) em relação à via PI3K-PTEN-AKT-mTOR em um modelo *in vitro* de mucosite oral, utilizando monocultura de queratinócitos humanos imortalizados e cultura primária de fibroblastos humanos gengivais, com foco na viabilidade celular, toxicidade e alterações do citoesqueleto.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 | CULTURA CELULAR

Monocultura de queratinócitos humanos imortalizados (HaCat), descritas na *American Type Culture Collection* (ATCC), e cultura primária de fibroblastos humanos gengivais (FG) foram utilizadas para os experimentos. Os fibroblastos gengivais foram obtidos de pesquisa prévia aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Brasília (CAAE Nº 78679717.6.0000.0030). Ambas células foram armazenadas a -80°C e cultivadas em placas de 100mm utilizando o Meio Eagle Dulbecco Modificado (DMEM), 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina. As células foram incubadas em CO₂ a 5% e 37°C e passadas a cada 3-4 dias. Quando as células atingiam uma confluência de aproximadamente 80%, elas eram tripsinizadas e distribuídas em novas placas para os experimentos ou para fazer passagem. Os FG foram utilizados até a 6ª passagem.

2.2 | MODELO *IN VITRO* DE MUCOSITE ORAL

O modelo de mucosite foi feito a partir de três estímulos, conforme estabelecido em estudo prévio do Laboratório de Histopatologia Oral da Universidade de Brasília [28]: lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* 0111:B4 na concentração de 10µg/ml para ensaio de viabilidade celular e 1µg/ml para experimentos de imunofluorescência adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e extrato proteico de *Porphyromonas gingivalis* (PG) na concentração de 5µg/ml, por 1h, seguido de 8 grays (Gy) de RI. O extrato proteico de PG foi preparado na Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, conforme descrito por Albiero et al., 2017 [29] e doado ao Laboratório de Histopatologia Oral da Universidade de Brasília.

2.3 | MODULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K-PTEN-AKT-MTOR

Após a replicação do modelo *in vitro*, as células foram tratadas com potenciais moduladores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR.

Curcumina pura (referência: #08511 e peso molecular: 368,38) adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) em forma de pó foi usada. A foi preparada diluindo o pó em dimetil sulfoxido (DMSO) até a concentração de 2,5 μ M.

Utilizou-se BpV(pic) (referência: SML0885 e peso molecular: 367,27) adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) em forma de pó. A *stock-solution* foi preparada diluindo o pó em água mili-Q até a concentração de 1 μ M.

Assim, as células foram tratadas com curcumina 2,5 μ M e bpV(pic) 1 μ M logo após aplicação de RI. Essas concentrações foram definidas em um estudo anterior por meio de teste de viabilidade [24,29]. Dessa maneira, os experimentos foram realizados de acordo com os seguintes grupos: modelo de mucosite oral (LPS, PG e IR) + veículo; modelo de mucosite oral + curcumina (2,5 μ M); e modelo de mucosite oral + bpV(pic) (1 μ M).

2.4 | TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5x10³ e incubadas por 24h. Em seguida, os estímulos e tratamentos foram aplicados em 9 replicatas técnicas de acordo com o grupo experimental. Após 24h, 10 μ L de solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foram adicionados e as células foram incubadas, protegidas da luz, por 4h. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de isopropanol acidificado (25mL de isopropanol + 104 μ L de HCl 100%) em cada poço. A toxicidade celular foi aferida comparando-se a absorbância entre os grupos experimentais e o grupo controle. A absorbância foi medida a 570nm em uma leitora de microplaca Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

2.5 | CYTOSKELETON MORPHOLOGY

As células foram plaqueadas sobre lamínulas estéreis de vidro 18x18 mm (Menzel Glaser, Thermo Scientific) inseridas em placas de 6 poços com densidade de 5x10⁴ e incubadas durante 24h. Os tratamentos foram aplicados separadamente em triplicata de acordo com os grupos experimentais. Decorridas 24h dos tratamentos, as células aderidas às lamínulas foram lavadas com PBS (2x), fixadas com 1mL de paraformaldeído a 4% por 10min, lavadas com PBS (2x), permeabilizadas com 1mL de Triton 0,1% e lavadas com PBS (2x). Em seguida, o

citoesqueleto das células foi corado com faloidina (referência: P5282) adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) por 40min, as células foram lavadas com PBS (2x) e os núcleos celulares foram corados com DAPI Fluoromount-G® (SouthernBiotech). As imagens foram obtidas em um microscópio confocal SP8 LIGHTNING (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e a área do citoplasma, a área dos núcleos e os diâmetros celulares foram obtidos com o software ImageJ [30].

2.6 | STATISTICAL ANALYSES

O teste de viabilidade foi realizado com nove replicatas técnicas e a imunofluorescência com doze replicatas técnicas. Os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 9 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. O teste paramétrico One-way ANOVA e o teste de Dunnett para análise multivariável foram aplicados para os dados de distribuição normal. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi aplicado para distribuição assimétrica. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) para distribuição normal ou como mediana, com primeiro e terceiro quartil, para distribuição assimétrica. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 | RESULTADOS

3.1 | VIABILIDADE CELULAR

Após 24h de tratamento, ambos moduladores não apresentaram efeitos citotóxicos e a bpV(pic) 1 μ M induziu um aumento da viabilidade celular em queratinócitos (média \pm DP: 113,17 \pm 35,67), em comparação com o grupo sem tratamento. Entretanto, houve diferença estatística apenas na viabilidade dos fibroblastos quando comparados ao grupo controle (DP médio \pm : 125,79 \pm 24,15) ($p < 0,05$), sugerindo atividade mitocondrial otimizada.

O tratamento com curcumina 2,5 μ M após 24h atenuou a agressão promovida pelos estímulos, aumentando significativamente a viabilidade celular em fibroblastos (DP médio \pm : 133,81 \pm 29,35) quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$),

enquanto aumentou a viabilidade em queratinócitos sem diferença estatística (DP médio \pm : 128,59 \pm 29,59). A análise da viabilidade celular é apresentada na Figura 1.

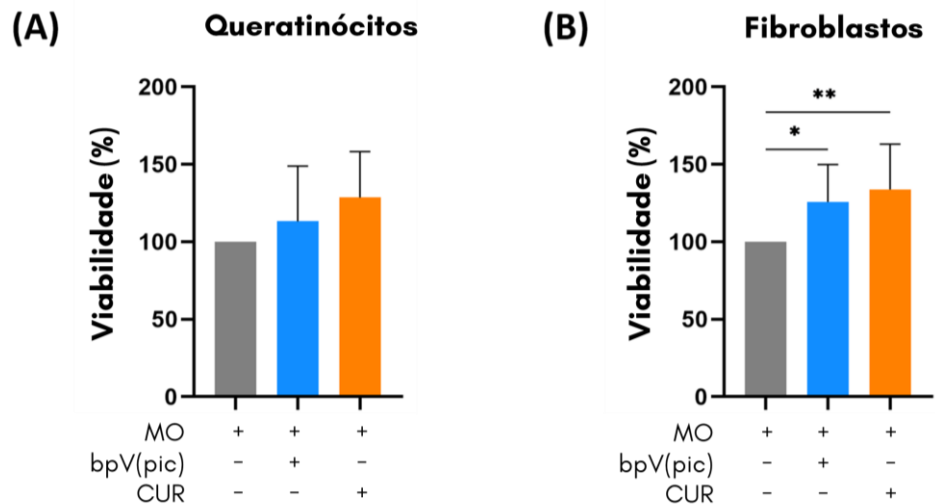


Figura 1 – Efeitos da curcumina e bpV(pic) na viabilidade celular de queratinócitos e fibroblastos. As barras representam média \pm desvio padrão. Significância estatística: One-way ANOVA e teste de Dunnet; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.2 | IMUNOFLUORESCÊNCIA

O tratamento com bpV(pic) foi capaz de reduzir significativamente a área citoplasmática de queratinócitos (Figura 2A) (mediana (IQR): 1173,72 (802,91-1275,94) bpV(pic) vs. 1091,44 (958,09-1809,49) veículo) ($p < 0,001$), bem como curcumina (mediana (IQR): 1143,68 (632,29-1731,81) curcumina vs. 1091,44 (958,09-1809,49) veículo) ($p < 0,05$), sugerindo aumento da proliferação. No entanto, não foram observadas alterações morfológicas na área dos núcleos (Figura 2B) ou diâmetro (Figura 2C) de queratinócitos tratados com bpV(pic) ou curcumina. A imunofluorescência de queratinócitos é apresentada na Figura 3.

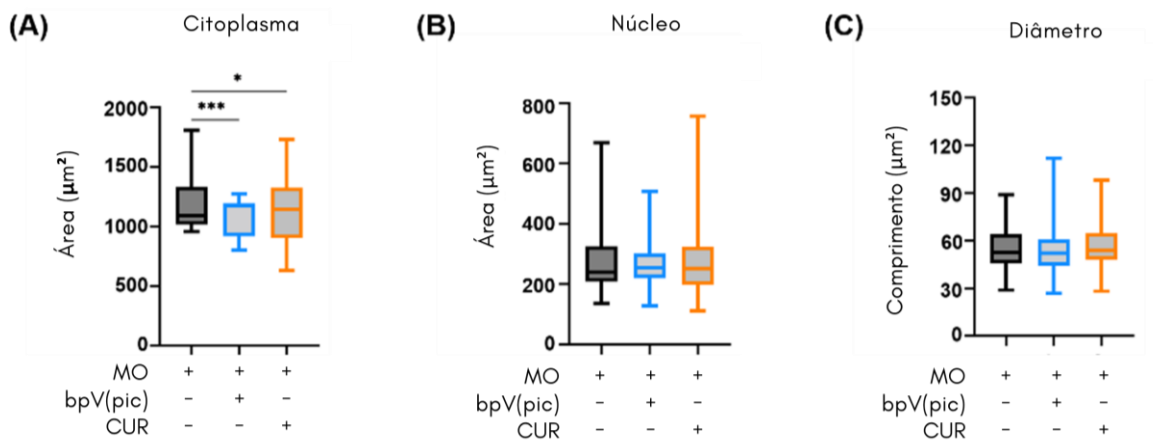


Figura 2 - Efeitos da curcumina e bpV(pic) na área citoplasmática, área nuclear e diâmetro de queratinócitos. As barras representam mediana (IQR). Significância estatística: teste de Kruskal-Wallis; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

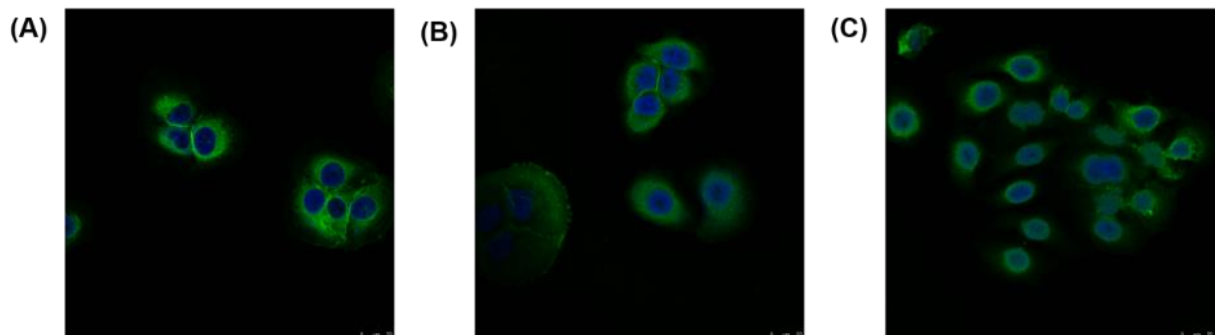


Figura 3 - Imunofluorescência de queratinócitos corados com faloidina (verde) e DAPI (azul) - Ampliação de 63X (barras de escala = $25\mu\text{M}$). (A) Grupo controle; (B) Grupo BpV(pic); (C) Grupo curcumina.

Em relação aos fibroblastos, não houve diferença relacionada à área citoplasmática (Figura 4A). No entanto, a bpV(pic) aumentou significativamente a área dos núcleos de fibroblastos (Figura 4B) (mediana (IQR): 242,45 (107,10-477,95) bpV(pic) vs. 165,82 (107,98-376,77) veículo) ($p < 0,0001$). A curcumina também foi capaz de aumentar a área dos núcleos de fibroblastos (mediana (IQR): 211,24 (108,72-451,62) curcumina vs. 165,82 (107,98-376,77) veículo) ($p < 0,01$), sugerindo progressão do ciclo celular. Não houve diferença em relação ao diâmetro das células (Figura 4C) A imunofluorescência dos fibroblastos é apresentada na Figura 5.

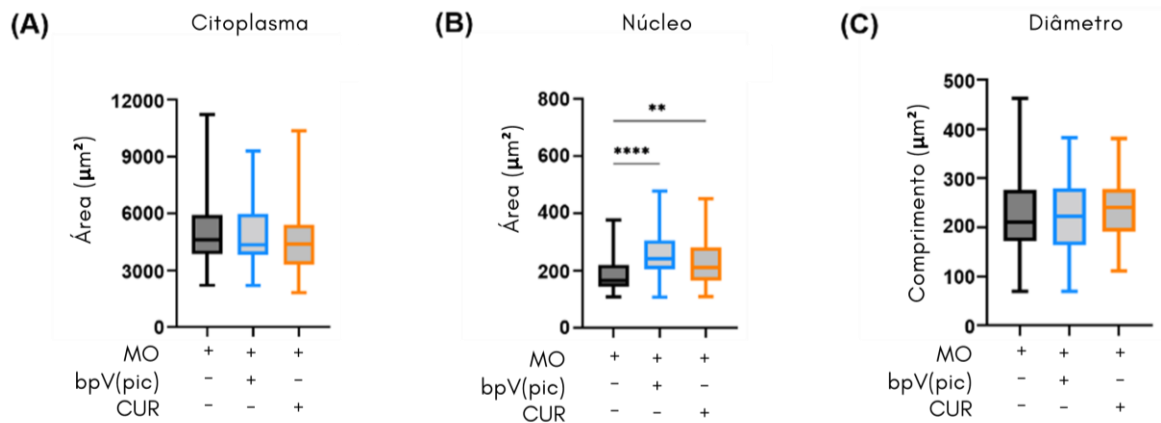


Figura 4 - Efeitos da curcumina e bpV(pic) na área citoplasmática, área nuclear e diâmetro de fibroblastos. As barras representam mediana (IQR). Significância estatística: teste de Kruskal-Wallis; ** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$.

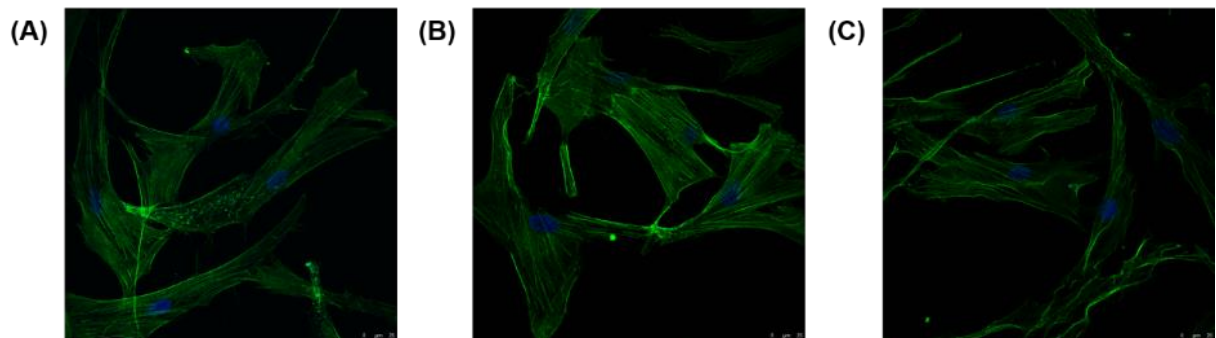


Figura 5 - Imunofluorescência de fibroblastos corados com faloidina (verde) e DAPI (azul) - Ampliação de 63X (barras de escala = 25μM). (A) Grupo controle; (B) Grupo BpV(pic); (C) Grupo curcumina.

4 | DISCUSSÃO

Não há uma intervenção padronizada para a MO e o tratamento atual dos pacientes é focado na prevenção de infecções secundárias, alívio da dor e manutenção do suporte dietético [11]. Nesse contexto, moduladores da via de sinalização PI3K-PTEN-AKT-mTOR, como bpV (pic) e curcumina, representam uma potencial abordagem, uma vez que essa via está ligada a importantes funções celulares, incluindo proliferação celular, sobrevivência e, portanto, reparo de lesões. [31].

O processo de reparo é um mecanismo complexo em resposta a uma agressão envolvendo várias vias intracelulares e intercelulares para restaurar a integridade tecidual e a homeostase. [32]. Inflamação, nova formação de tecido e remodelação são os três estágios clássicos do reparo que ocorrem de forma sobreposta e requerem migração e proliferação celular. [33]. Da mesma forma, o

citoesqueleto celular, composto por microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários, integra e orchestra funções responsáveis por muitos mecanismos celulares, como motilidade, migração, diferenciação e proliferação celular [34].

Em relação à morfologia celular, ambos tratamentos foram capazes de reduzir significativamente as áreas citoplasmáticas de queratinócitos, sugerindo aumento da proliferação, uma vez que a quantidade de citoplasma em relação ao nucleoplasma é menor em células com proliferação ativa. [35]. Em contraste, os tratamentos aumentaram significativamente a área dos núcleos de fibroblastos, indicando progressão do ciclo celular, uma vez que o aumento da transcrição é facilitado em núcleos maiores. [36].

A curcumina parece ter um efeito bidirecional em relação às diferenças entre células neoplásicas e não neoplásicas e de acordo com Ma et al., 2021 [25], essas diferenças podem ser analisadas levando-se em consideração diferentes tipos de células, doses de fármacos e métodos experimentais. Apesar de altas doses de curcumina já terem sido sugeridas para a modulação da via PI3K em células tumorais [24,37], doses mais baixas desse composto para sinalização de reparo em células não neoplásicas é bem estudada e essa hipótese transforma a curcumina em uma alternativa promissora também para o reparo de lesões de MO. Com o objetivo de evitar lesões crônicas, já existem várias formulações de curcumina tópica, como emulsão, fibras, filmes, hidrogéis e nanoformulações. [38]. Uma revisão sistemática de ensaios clínicos de 2019 [13] conclui que a curcumina é eficaz no controle da sintomatologia da mucosite oral.

Além disso, o bpV(pic) aplicado topicamente é uma potencial abordagem terapêutica para melhorar o processo de reparo em lesões da mucosa, de acordo com uma revisão sistemática de 2020 [27]. Esse evento tem relação com uma regulação positiva da via PI3K causada pela inibição reversível de PTEN, promovendo maior proliferação e migração celular [39]. Esses dados convergem com nossos achados no modelo *in vitro* de MO.

Assim, além da dificuldade na ingestão alimentar e na capacidade de fala dos pacientes, a necessidade de nutrição parenteral, maior administração de analgésicos sistêmicos, tratamento de infecções sistêmicas e internações prolongadas aumentam o custo para o tratamento da MO (de 4,18 para 299.214,14 USD por ano) impactando tanto o orçamento dos pacientes quanto os sistemas públicos de saúde. [40].

Dessa forma, a inclusão do bpV(pic) e da medicina tradicional usando curcumina nas possíveis intervenções para MO é uma possibilidade de oferecer acesso a cuidados econômicos e eficazes para pacientes com MO, uma vez que as pesquisas atinjam alto nível de evidência.

5 | CONCLUSÃO

A curcumina e bpV(pic) são efetivos em modelos *in vitro* de MO, induzindo proliferação e sobrevivência celular e reforçando a evidência atual disponível de que poderiam ser um tratamento adjuvante da mucosite. Portanto, nosso estudo é capaz de auxiliar a elucidar os mecanismos biológicos por trás dos efeitos positivos observados clinicamente.

REFERÊNCIAS

1. Villa A, Sonis ST. Pharmacotherapy for the management of cancer regimen-related oral mucositis. *Expert Opin Pharmacother*. 2016;17(13):1801–7.
2. Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T. Radiation-Induced Oral Mucositis. *Front Oncol*. 2017;7(MAY).
3. Correa MEP, Kin K, Cheng F, Chiang K, Kandwal A, Loprinzi CL. Systematic review of oral cryotherapy for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer*. 2019;
4. Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, Bateman E, Blijlevens N, Gibson RJ, et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care Cancer*. 2013;21(11):3233–41.
5. Shankar A, Roy S, Bhandari M, Rath GK, Biswas AS, Kanodia R, et al. Current trends in management of oral mucositis in cancer treatment. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2017;18(8):2019–26.
6. Villa A, Sonis S. Toxicities associated with head and neck cancer treatment and oncology-related clinical trials. *Curr Probl Cancer [Internet]*. 2016;40(5–6):244–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2016.06.001>
7. Lalla R V, Saunders DP, Peterson DE. Chemotherapy or Radiation-Induced Oral Mucositis. *Dent Clin North Am*. 2014;58(2):341–9.
8. Barkokebas A, Silva IHM, de Andrade SC, Carvalho AAT, Gueiros LAM, Paiva SM, et al. Impact of oral mucositis on oral-health-related quality of life of patients diagnosed with cancer. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(9):746–51.
9. Sonis ST. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncol [Internet]*. 2009;45(12):1015–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.08.006>
10. Lalla R V, Brennan MT, Gordon SM, Sonis ST, Rosenthal DI, Keefe DM. Oral Mucositis Due to High-Dose Chemotherapy and / or Head and Neck Radiation Therapy. *JNCI Monogr*. 2019;2019:17–24.
11. Elad S, Cheng KKF, Lalla R V, Yarom N, Hong C, Logan RM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2020;126(19):4423–31.
12. Lüer S, Troller R, Aebi C. Antibacterial and antiinflammatory kinetics of curcumin as a potential antimucositis agent in cancer patients. *Nutr Cancer [Internet]*. 2012;64(7):975–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22973975/>
13. Normando AGC, de Meneses AG, de Toledo IP, Borges GÁ, de Lima CL, dos Reis PED, et al. Effects of turmeric and curcumin on oral mucositis: A systematic review. *Phyther Res*. 2019;33(5):1318–29.
14. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. MTOR: From growth signal integration to

- cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2011;12(1):21–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3025>
15. Castilho R, Squarize C, Gutkind J. Exploiting PI3K/mTOR signaling to accelerate epithelial wound healing. *Oral Dis*. 2013;19(6):551–8.
 16. Squarize CH, Castilho RM, Bugge TH, Gutkind JS. Accelerated wound healing by mTOR activation in genetically defined mouse models. *PLoS One*. 2010;5(5).
 17. Jere SW, Houreld NN, Abrahamse H, N. HN, Heidi A, Houreld NN, et al. Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3 β) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2019;50(February):52–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.03.001>
 18. Hu X, Zhang H, Li X, Li Y, Chen Z. Activation of mTORC1 in fibroblasts accelerates wound healing and induces fibrosis in mice. *Wound Repair Regen*. 2020;28(1):6–15.
 19. Kahkhaie KR, Mirhosseini A, Aliabadi A, Mohammadi A, Mousavi MJ, Haftcheshmeh SM, et al. Curcumin: a modulator of inflammatory signaling pathways in the immune system. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2019;27(5):885–900. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00607-3>
 20. Li H, Sureda A, Devkota HP, Pittalà V, Barreca D, Silva AS, et al. Curcumin, the golden spice in treating cardiovascular diseases. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2020;38(February 2019):107343. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.010>
 21. Ghasemi F, Shafiee M, Banikazemi Z, Pourhanifeh MH, Khanbabaei H, Shamshirian A, et al. Curcumin inhibits NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways in cervical cancer cells. *Pathol Res Pract*. 2019;215(10):1–6.
 22. Bowen J, Al-Dasooqi N, Bossi P, Wardill H, Van Sebille Y, Al-Azri A, et al. The pathogenesis of mucositis: updated perspectives and emerging targets. *Support Care Cancer*. 2019;27(10):4023–33.
 23. Petiti J, Rosso V, Lo Iacono M, Panuzzo C, Calabrese C, Signorino E, et al. Curcumin induces apoptosis in JAK2-mutated cells by the inhibition of JAK2/STAT and mTORC1 pathways. *J Cell Mol Med*. 2019;23(6):4349–57.
 24. Borges GA, Elias ST, Amorim B, de Lima CL, Coletta R Della, Castilho RM, et al. Curcumin downregulates the PI3K–AKT–mTOR pathway and inhibits growth and progression in head and neck cancer cells. *Phyther Res*. 2020;34(12):3311–24.
 25. Ma B, Guan G, Lv Q, Yang L. Curcumin Ameliorates Palmitic Acid-Induced Saos-2 Cell Apoptosis Via Inhibiting Oxidative Stress and Autophagy. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021;2021:5563660.
 26. Walker CL, Wu X, Liu NK, Xu XM. Bisperoxovanadium mediates neuronal protection through inhibition of PTEN and activation of PI3K/AKT–mTOR signaling after traumatic spinal injuries. *J Neurotrauma*. 2019;36(18):2676–87.

27. Borges GA, P. WL, Webber LP, M Marques AE, Guerra ENS, Castilho RM, et al. Pharmacological PTEN inhibition: Potential clinical applications and effects in tissue regeneration. *Regen Med.* 2020;15(2):1329–44.
28. Amorim dos Santos J, Nascimento-Filho CHV, Normando AGC, Lima CL, Borges GA, Castilho RM, et al. Modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR em modelo *in vitro* de mucosite oral. Undergrad Course Final Monogr (Undergraduate Course Dent – Dep Dent Sch Heal Sci Univ Brasília. 2020;1–71.
29. AlbieromL, Stipp RN, Saito MT, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, et al. Viability and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Progenitor Cells Are Maintained After Incubation With Porphyromonas gingivalis Protein Extract. *J Periodontol.* 2017 Nov;88(11):e188--e199.
30. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul;9(7):671–5.
31. Yang H-L, Tsai Y-C, Korivi M, Chang C-T, Hseu Y-C. Lucidone Promotes the Cutaneous Wound Healing Process via Activation of the PI(3)K/AKT, Wnt/ β -catenin and NF- κ B Signaling Pathways. *Biochim Biophys acta Mol cell Res.* 2017 Jan;1864(1):151–68.
32. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314–21.
33. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014;6(265):1–36.
34. Cheng F, Eriksson JE. Intermediate Filaments and the Regulation of Cell Motility during Regeneration and Wound Healing. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Sep;9(9).
35. Udayashankar U, Guduru VS, Ananthaneni A, Ramisetty SD, Kuberappa PH, Namala S. Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. *J Cytol.* 2016;33(3):125–9.
36. Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci.* 2009 May;122(Pt 10):1477–86.
37. Borges G Ivaes A, Fortunato RD, Xavier AD, D. CR, Rêgo DF, Assad DX, et al. In vivo and *in vitro* effects of curcumin on head and neck carcinoma: a systematic review. *J Oral Pathol Med.* 2016;46(1):3–20.
38. Mohanty C, Sahoo SK. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discov Today.* 2017 Oct;22(10):1582–92.
39. Pulido R. PTEN Inhibition in Human Disease Therapy. *Molecules.* 2018 Jan;23(2).
40. Rodrigues-Oliveira L, Kowalski LP, Santos M, Marta GN, Bensadoun R-J, Martins MD, et al. Direct costs associated with the management of mucositis: A systematic review. *Oral Oncol.* 2021;118:105296

ANEXOS

NORMAS DA REVISTA

MANUSCRIPT REQUIREMENTS BY TYPE

The Journal of Dental Research accepts the following types of manuscripts for consideration:

Original Research Reports: These manuscripts are based on clinical, biological, and biomaterials and bioengineering subject matter. Manuscripts submitted as research reports have a limit of 3,200 words (including introduction, materials and methods, results, discussion and; excluding abstracts, acknowledgments, figure legends and references); a total of 5 figures or tables; 40 references; and must contain a 300-word abstract.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are required to report all sources of support for their project or study, including but not limited to: grant funds, commercial sources, funds from a contributors' institution. Do not refer to a study being "partially funded by the cited sources." Consultancies and funds paid directly to investigators must also be listed. Authors are required to specify during the submission process if their paper received funding from NIH, NIDCR, or any other NIH Institute or Center and provide the grant number. To comply with the NIH Public Access Mandate, for qualifying NIH- funded papers, the Journal of Dental Research will deposit the final, copyedited paper to PubMed Central on behalf of the authors.

Any perceived or actual conflicts of interest need to be identified in the acknowledgments section. The JDR abides by the International Committee of Medical Journal Editors guidelines for the Ethical Considerations in the Conduct and Report of Research (<http://www.icmje.org>). Authors are requested to include this information in the acknowledgments section and the corresponding author must confirm that all co-authors have reported any potential conflicts.

Authors are required to provide a written statement of author contributions as part of your Acknowledgements. Include as many authors as you have, note their completed roles, and conclude with the following statement. "All authors gave their final approval and agreed to be accountable for all aspects of the work." For example:

Author contributions

Author 1: Contributed to conception, design, data acquisition and interpretation, drafted and critically revised the manuscript.

Author 2: Contributed to conception, design, data acquisition and interpretation, performed all statistical analyses, drafted and critically revised the manuscript.

Author 3: Contributed to conception, design, and critically revised the manuscript.

FONTS

Limit fonts used in any figure to Times, Times New Roman, Arial, Frutiger, and Sabon. Other fonts cannot be guaranteed to reproduce properly.

Files containing figures and tables should be clearly labeled to indicate their placement in the text or appendix. Tables should be viewable in a portrait view. Tables that are created in a landscape view are more suitable for an appendix.

If the online version is in color and the printed version in black and white, please submit separate files for each version. Figures should be identical except in color or grayscale. The cost of color figures in the print version will be borne by the authors. Rates for color reproduction are \$300 per initial page of color and \$150 for each additional page of color. However, there are no charges for figures and diagrams printed in black and white. Color figures may be included in the online version of JDR with no extra charges.

REFERENCES

The Journal of Dental Research (JDR) adheres to the CSE (8th Edition) editorial style. All submitted manuscripts should be formatted in this style:

<http://www.scientificstyleandformat.org/Tools/SSFCitation-Quick-Guide.html>.