

**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<sup>1</sup>, Juliana Amorim dos Santos<sup>1</sup>, Ana Gabriela Costa Normando<sup>1</sup>, Gabriel Álvares Borges<sup>1</sup>,  
Cristiane Helena Squarize<sup>2</sup>, Eliete Neves Silva Guerra<sup>1</sup>

1. Laboratório de Histopatologia Oral, Universidade de Brasília, Brasil.
2. Laboratório de Biologia Epitelial, Universidade de Michigan, EUA.

**Resumo**

**Introdução:** A via PI3K-PTEN-AKT-mTOR é sinalizadora de proliferação, migração, remodelação e reepitelização. Assim, a aplicação de moduladores tópicos são alternativas com potencial para o tratamento de lesões na mucosa, como a mucosite oral. **Objetivo:** Analisar os efeitos da curcumina e bpV(pic) na modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR em modelo *in vitro* de mucosite oral. **Metodologia:** O modelo foi composto de monocultura de queratinócitos humanos imortalizados e cultura primária de fibroblastos humanos gengivais com adição de dois estímulos bacterianos e radiação ionizante. Após os tratamentos moduladores, a viabilidade celular e as alterações do citoesqueleto foram analisadas por teste de atividade metabólica e imunofluorescência. **Resultados:** Curcumina e bpV(pic) aumentaram a viabilidade e área nuclear de fibroblastos e reduziram a área citoplasmática de queratinócitos. **Conclusão:** Os tratamentos foram capazes de modular a resposta celular, sugerindo indução de proliferação e reparo.

**Palavras-chave:** Viabilidade; Citoesqueleto; Imunofluorescência.

**Apoio financeiro:** CNPq.

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UnB.

**Introdução**

A mucosite é uma complicação comum da terapia antineoplásica que se caracteriza por eritema e úlceras na mucosa do trato gastrointestinal (Elad et al., 2020). A mucosite oral (MO) pode impactar significativamente a qualidade de vida dos pacientes, além de ser fator limitante para a terapia oncológica, exigindo cuidados específicos, como hospitalizações para controle da infecção, alívio da dor e nutrição parenteral (Barkokebas et al., 2015; Elad et al., 2020). Embora ainda não haja recomendação padrão de abordagem para essa condição, sugere-se que as estratégias para prevenção e tratamento atuem principalmente na redução da carga bacteriana, na modulação das cascatas inflamatórias e/ou na otimização do reparo tecidual (Sonis, 2009).

Nesse contexto, a via PI3K-PTEN-AKT-mTOR coordena diversas funções, como crescimento celular, sobrevivência e progressão do ciclo celular (Zoncu et al., 2011), e a modulação dessa via pode atuar de forma importante no processo de reparo (Castilho et al., 2013). Em contraste, o gene homólogo da fosfatase tensina (PTEN) atua como antagonista da via, sendo assim, a inibição de PTEN leva à superexpressão de proteínas da via PI3K-AKT-mTOR, resultando em aumento da proliferação e migração celular (Pulido et al., 2018).

Como alternativa potencial, a curcumina possui propriedades antioxidantes, analgésicas e anti-inflamatórias (Kahkhaie et al., 2019; Li et al., 2020). Ademais, a curcumina é capaz de inibir o complexo 1 de mTOR e PTEN (Petiti et al., 2019; Borges et al. 2020a). Assim, esse componente apresenta um potencial tratamento para mucosite oral durante fases inflamatórias (Bowen et al., 2019). Outrossim, bpV(pic) é outro componente promissor associado à via PI3K-PTEN-AKT-mTOR (Walker et al., 2019), pois a aplicação tópica de bpV(pic) tem demonstrado indução de reparo e regeneração tecidual pela inibição de PTEN (Borges et al., 2020b).

Logo, o objetivo deste estudo é analisar os efeitos da curcumina e bpV(pic) na modulação da 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 no citoesqueleto.

**Metodologia**

O modelo *in vitro* de mucosite oral foi estabelecido a partir de monocultura de queratinócitos humanos imortalizados (HaCat), cultura primária de fibroblastos humanos gengivais e a adição de três diferentes estímulos: 10 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* para o experimento de viabilidade celular e 1 µg/mL para os experimentos de imunofluorescência, 5 µg/mL de extrato proteico de *Porphyromonas gingivalis* e 8 grays (Gy) de radiação ionizante (RI). Ambos tipos celulares foram cultivados em placas de 10 cm utilizando meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina. Os experimentos foram realizados de acordo com os seguintes grupos: modelo de MO (LPS, PG e RI) + veículo; modelo de MO + curcumina 2,5 µM; e modelo de MO + bpV(pic) 1 µM.

Os efeitos celulares decorrentes dos tratamentos foram avaliados a partir de teste de viabilidade celular, realizado em nove replicatas, e análise morfológica do citoesqueleto das células com coloração dos microfilamentos de actina por faloidina, realizada em três replicatas biológicas. A área celular e nuclear, assim como o diâmetro das células, foi mensurada a partir do software ImageJ e a estatística analítica foi calculada utilizando o software GraphPad Prism 9. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. O teste paramétrico One-way ANOVA e o pós teste de Dunnett para análises multivariáveis foi aplicado para dados de distribuição normal e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi aplicado para dados de distribuição não paramétricos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão para distribuição normal ou como mediana com primeiro e terceiro quartil para distribuição não paramétrica. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

### Viabilidade celular e teste de toxicidade

Após 24h de tratamento, ambos moduladores não demonstraram efeitos citotóxicos. A aplicação de bpV(pic) 1  $\mu$ M induziu aumento na viabilidade celular quando comparado ao grupo tratado com veículo, com significância estatística para os fibroblastos ( $125,79 \pm 24,15$ ) ( $p < 0,05$ ), sugerindo atividade mitocondrial otimizada (Figura 1). Cao et al. (2011), ao utilizarem a mesma concentração de bpV(pic), evidenciaram migração celular aumentada em células epiteliais de córnea humana, enquanto Lai et al. (2007) reportaram resultados positivos utilizando 5  $\mu$ M de bpV(pic) para o reparo de células epiteliais de pulmão. De acordo com a literatura, bpV(pic) aplicado topicamente é uma abordagem terapêutica potencial para melhorar o processo de reparo em lesões na mucosa (Borges et al., 2020b). Esse evento é relacionado a uma regulação positiva da via PI3K causada pela inibição reversível de PTEN, promovendo aumento da proliferação e migração celular (Pulido, 2018). Os achados deste trabalho convergem com essas informações.

Em relação à curcumina, a aplicação de 2,5  $\mu$ M atenuou a agressão promovida pelos estímulos após 24h, aumentando significativamente a viabilidade celular de fibroblastos ( $133,81 \pm 29,35$ ) quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 1). Curcumina parece apresentar efeito bidirecional quanto às diferenças entre células neoplásicas e não neoplásicas. De acordo com Ma et al. (2021), essas diferenças são referentes aos diferentes tipos celulares, concentração do componente e os métodos experimentais. Apesar de altas doses de curcumina terem sido sugeridas para a modulação da via PI3K em células neoplásicas (Borges et al., 2016, 2020a), doses baixas do componente para o reparo em células não neoplásicas são bem estudadas e essa hipótese torna a curcumina uma alternativa promissora para o reparo de lesões de mucosite. Objetivando evitar feridas crônicas, já há diversas formulações de curcumina tópica, como emulsões, fibras, filmes, hidrogéis e nanoformulações (Mohanty e Sahoo, 2017). Além disso, a literatura sugere que a curcumina é efetiva no controle sintomatológico da mucosite oral (Normando et al., 2019).

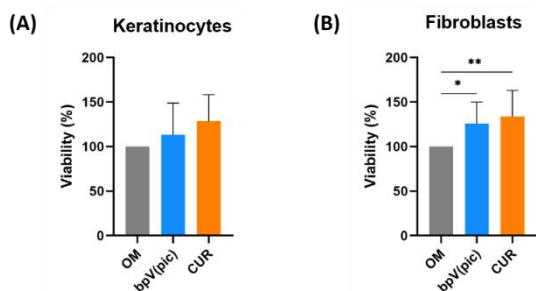


Figura 1 – Efeitos do bpV(pic) e curcumina na viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos. Barras representam média  $\pm$  desvio-padrão. Significância estatística: One-way ANOVA e pós teste de Dunnett; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### Imunofluorescência

Nenhuma alteração morfológica na área nuclear (Figura 2B) ou diâmetro (Figura 2C) de queratinócitos tratados com bpV(pic) ou curcumina foi observada. Entretanto, o tratamento com bpV(pic) foi capaz de reduzir significativamente a área citoplasmática (Figura 2A) - mediana (IQR): 1173,72 (802,91-1275,94) bpV(pic) vs. 1091,44 (958,09-1809,49) veículo ( $p < 0,001$ ), assim como a curcumina (mediana (IQR): 1143,68 (632,29-1731,81) curcumina vs. 1091,44 (958,09-1809,49) veículo) ( $p < 0,05$ ), sugerindo proliferação aumentada. Imunofluorescência de queratinócitos está apresentada na Figura 3.

Em relação aos fibroblastos, não houve diferença relacionada à área citoplasmática (Figura 4A) ou diâmetro (Figura 4C). Contudo, bpV(pic) aumentou significativamente a área nuclear de fibroblastos (Figura 4B) (mediana (IQR): 242,45 (107,10-477,95) bpV(pic) vs. 165,82 (107,98-376,77) veículo) ( $p < 0,0001$ ). Curcumina também foi capaz de aumentar a área nuclear 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. Imunofluorescência de fibroblastos está apresentada na Figura 5.

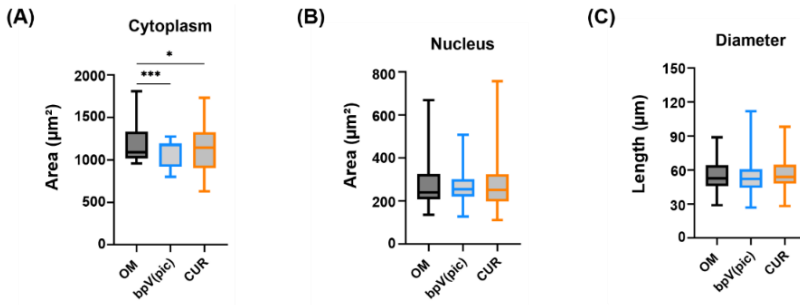


Figura 2 – Efeitos do bpV(pic) e curcumina na área citoplasmática, nuclear e diâmetro de queratinócitos. Barras representam mediana (IQR). Significância estatística: teste Kruskal-Wallis; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

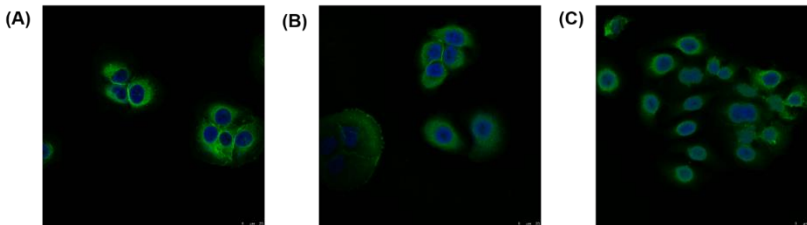


Figura 3 – Imunofluorescência de queratinócitos corados com faloidina (verde) e DAPI (azul). Magnificação de 63X (barra de escala = 25 µm). (A) Grupo controle; (B) BpV(pic); (C) Curcumina.

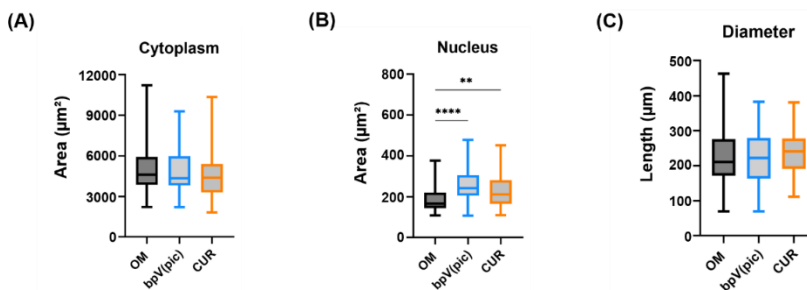


Figura 4 – Efeitos do bpV(pic) e curcumina na área citoplasmática, nuclear e diâmetro de fibroblastos. Barras representam mediana (IQR). Significância estatística: teste Kruskal-Wallis; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

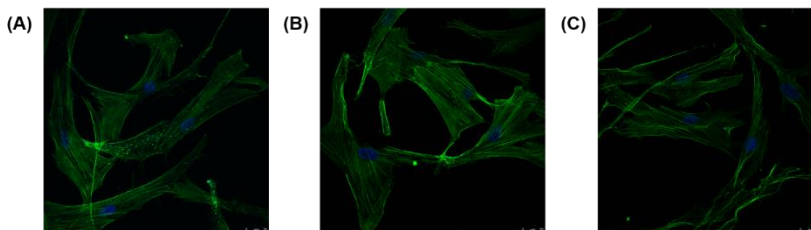


Figura 5 – Imunofluorescência de fibroblastos corados com faloidina (verde) e DAPI (azul). Magnificação de 63X (barra de escala = 25 µm). (A) Grupo controle; (B) BpV(pic); (C) Curcumina.

O processo de reparo é um mecanismo complexo em resposta a uma agressão envolvendo diversas vias de sinalização intra e intercelulares para restaurar a integridade tecidual e homeostase (Gurtner et al., 2008). Inflamação, nova formação tecidual e remodelação são os três estágios clássicos do reparo que requer migração e proliferação celular e ocorrem de forma interposta (Eming et al., 2014). No mesmo sentido, o citoesqueleto, composto por microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários, integra e orquestra funções responsáveis por vários mecanismos celulares, como motilidade celular, migração, diferenciação e proliferação (Cheng e Eriksson, 2017). Quanto à morfologia celular, ambos tratamentos foram capazes de reduzir significativamente a área citoplasmática de queratinócitos, sugerindo proliferação aumentada, uma vez que o nucleoplasma é maior em relação ao citoplasma em células com proliferação ativa (Udayashankar et al., 2016). Em contraste, os tratamentos aumentaram significativamente a área nuclear de fibroblastos, indicando progressão do ciclo celular, visto que o aumento da transcrição é facilitado em núcleos maiores (Webster et al., 2009).

## Conclusões

A modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR aumentou significativamente a viabilidade celular de fibroblastos após a aplicação associada de estímulos bacterianos e radiação ionizante. Além disso, os medicamentos foram capazes de interagir com o citoesqueleto. Dessa forma, a inclusão de bpV(pic) e curcumina como possíveis intervenções para mucosite oral é uma possibilidade de oferecer acesso a um tratamento efetivo e de baixo custo aos pacientes, uma vez que atinja alto nível de evidência. Curcumina e bpV(pic) são efetivos no modelo *in vitro* de mucosite oral induzindo proliferação celular e sobrevivência, reforçando a evidência atual de que eles podem ser tratamentos adjuvantes no manejo da mucosite.

## Referências bibliográficas

- Amorim dos santos, J. et al. Modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR em modelo *in vitro* de mucosite oral. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília, p. 1–71, 2020.
- Barkokebas, A. et al. Impact of oral mucositis on oral-health-related quality of life of patients diagnosed with cancer. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 44, n. 9, p. 746–751, out. 2015.
- Borges, G. A. et al. Curcumin downregulates the PI3K–AKT–mTOR pathway and inhibits growth and progression in head and neck cancer cells. *Phytotherapy Research*, n. February, p. 1–14, 2020a.
- Borges, G. A. et al. In vivo and *in vitro* effects of curcumin on head and neck carcinoma: a systematic review. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 46, n. 1, p. 3–20, 2016.
- Borges, G. A.; P., W. L. Pharmacological PTEN inhibition: Potential clinical applications and effects in tissue regeneration. *Regenerative Medicine*, v. 15, n. 2, p. 1329–1344, 2020b.
- Bowen, J. et al. The pathogenesis of mucositis: updated perspectives and emerging targets. *Supportive Care in Cancer*, v. 27, n. 10, p. 4023–4033, 2019.
- Cao, L. et al. Downregulation of PTEN at corneal wound sites accelerates wound healing through increased cell migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. v. 52, n. 5, p. 2272-2278, 2011.
- Castilho, R.; Squarize, C.; Gutkind, J. Exploiting PI3K/mTOR signaling to accelerate epithelial wound healing. *Oral Diseases*, v. 19, n. 6, p. 551–558, 2013.
- Cheng, F.; Eriksson, J. E. Intermediate filaments and the regulation of cell motility during regeneration and wound healing. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2017.
- Elad, S. et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*, v. 126, n. 19, p. 4423–4431, 2020.
- Eming, S. A. et al. Wound Repair and Regeneration: Mechanisms, Signaling, and Translation. *Science Transl Med*, v. 322, n. 265, p. 265sr6, 2014.
- Gurtner, G. C. et al. Wound repair and regeneration. *Nature*, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.
- Kahkhaie, K. R. et al. Curcumin: a modulator of inflammatory signaling pathways in the immune system. *Inflammopharmacology*, v. 27, n. 5, p. 885–900, 2019.
- Lai J.P. et al. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) as a molecular target in lung epithelial wound repair. *Br J Pharmacol*. V. 152, n. 8, p. 1172-1184, 2007.
- Li, H. et al. Curcumin, the golden spice in treating cardiovascular diseases. *Biotechnology Advances*, v. 38, n. February 2019, p. 107343, 2020.
- Ma, B. et al. Curcumin ameliorates palmitic acid-induced SaOS-2 cell apoptosis via inhibiting oxidative stress and autophagy. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2021, 2021.
- Mohanty, C.; SAHOO, S. K. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discovery Today*, v. 22, n. 10, p. 1582–1592, 2017.
- Normando, A. G. C. et al. Effects of turmeric and curcumin on oral mucositis: A systematic review. *Phytotherapy Research*, v. 33, n. 5, p. 1318–1329, 2019.
- Petiti, J. et al. Curcumin induces apoptosis in JAK2-mutated cells by the inhibition of JAK2/STAT and mTORC1 pathways. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 23, n. 6, p. 4349–4357, 2019.
- Pulido, R. PTEN inhibition in human disease therapy. *Molecules*, v. 23, n. 2, p. 1–25, 2018.
- Rodrigues-Oliveira, L. et al. Direct costs associated with the management of mucositis: A systematic review. *Oral oncology*, v. 118, p. 105296, abr. 2021.
- Schneider, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.
- Sonis, S. T. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncology*, v. 45, n. 12, p. 1015–1020, 2009.
- Udayashankar, U. et al. Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. *Journal of Cytology*, v. 33, n. 3, p. 125–129, 2016.
- Walker, C. L. et al. Bisperoxovanadium mediates neuronal protection through inhibition of PTEN and activation of PI3K/AKT-mTOR signaling after traumatic spinal injuries. *Journal of Neurotrauma*, v. 36, n. 18, p. 2676–2687, 2019.
- Webster, M.; WIKIN, K. L.; COHEN-FIX, O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *Journal of Cell Science*, v. 122, n. 10, p. 1477–1486, 2009.
- Zoncu, R. et al. MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011.