

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**IMPACT OF RESVERATROL ON BONE REPAIR OF RATS
EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE INHALATION:
HISTOMORPHOMETRIC AND BONE-RELATED
GENE EXPRESSION ANALYSIS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Paulista - UNIP, para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

FELIPE CALILE FRANCK

SÃO PAULO
2016

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**IMPACT OF RESVERATROL ON BONE REPAIR OF RATS
EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE INHALATION:
HISTOMORPHOMETRIC AND BONE-RELATED
GENE EXPRESSION ANALYSIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista - UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro.

SÃO PAULO

2016

Franck, Felipe Calile.

Impact of resveratrol on bone repair of rats exposed to cigarette smoke inhalation : histomorphometric and bonerelated gene expression analysis / Felipe Calile Franck. - 2016.

15 f. : il. color. + CD-ROM

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Clínica Odontológica: Cirurgia Buco Maxilo Facial.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fernanda Vieira Ribeiro.

1. Resveratrol. 2. Plantas. 3. Medicinal. 4. Cicatrização óssea.
5. Ratos. 6. Expressão gênica. 7. Fumantes I. Ribeiro, Fernanda Vieira (orientadora). II. Título.

FELIPE CALILE FRANCK

**IMPACT OF RESVERATROL ON BONE REPAIR OF RATS
EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE INHALATION:
HISTOMORPHOMETRIC AND BONE-RELATED
GENE EXPRESSION ANALYSIS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Paulista – UNIP, para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

____/____/201____
Prof. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro
UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

____/____/201____
Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati
UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

____/____/201____
Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos *meus pais*, à *toda minha família, minha namorada Cintia Nogueira, aos amigos Francisco de Nadai e Danilo Pino* que me ajudaram nessa caminhada. Momentos de dificuldade existiram e junto com eles o cansaço e o desânimo, porém, essas pessoas foram essenciais para que todas as barreiras vencidas se transformassem em méritos.

AGRADECIMENTOS

À minha namorada, conselheira e companheira *Cintia de Freitas Nogueira*, conhecedora de toda minha trajetória durante este mestrado, me apoiando e me dando ânimo a todo momento para que sempre seguisse em frente.

Aos meus pais, Mônica Simoni Calile Franck e Claudio Franck, por me orientarem e apoiarem assiduamente nas escolhas profissionais, fruto da melhor educação que fizeram questão, com todo o suor, de me conceder.

À toda minha família, primos e tios que, cada um a sua maneira, torce pelo meu crescimento pessoal e profissional.

À professora doutora Fernanda Vieira Ribeiro, orientadora deste trabalho, por ter me aceito como orientando, tendo em mim depositado grande confiança durante todo o decorrer deste trabalho. Espero ter correspondido às expectativas.

Aos professores doutores Márcio Zaffalon Casatti, professora doutora Suzana Pimentel, professora doutora Fernanda Vieira Ribeiro e professor doutor Bruno Braga Benatti por me concederem uma experiência única de vida, a real oportunidade de realizar parte desta pesquisa na Universidade de Toronto, Canadá.

À toda equipe de Periodontia da UNIP/SP: professor doutor Fabiano Ribeiro Cirano, doutor Renato Corrêa Viena Casarin, doutora Mônica Grazieli e doutora Denise Carleto Andia pelo trabalho conjunto e pelo apoio durante todo o percurso.

À coordenadora professora doutora Cíntia Helena Coury Saraceni e aos demais professores do curso de Mestrado em Odontologia da UNIP, que têm trabalhado incansavelmente para o crescimento desse reconhecido Programa de Pós-Graduação da UNIP/SP.

Ao amigo *Danilo Siqueira Pino*, que percorreu simultaneamente toda esta jornada do início ao fim, sempre prestativo nas tarefas, trocas de plantões e nos trabalhos.

Ao amigo Francisco de Nadai Dias, que tenho grande admiração pela pessoa

e profissional que é, sendo uma das principais pessoas que me fizeram chegar até aqui.

Ao amigo Marcelo Vitale e sua esposa Paloana, pelo companheirismo e o espaço cedido em sua casa durante algumas das idas à cidade de São Paulo.

À Michelle Sanchez Aguiar, sempre com extrema eficiência ajudando em toda a parte laboratorial desta pesquisa.

Aos colegas do curso de Mestrado da UNIP/SP, Pedro Denofrio, Renata Moura, Juliano Silva, Nancy Peçanha, Roberto Shiota e Aladim Júnior, visto que tivemos a oportunidade de aprimorar juntos nossos conhecimentos, cada um na sua área de atuação, no decorrer das atividades.

A todos(as) os(as) funcionários(as) do *campus* Indianópolis da UNIP/SP, em especial à Secretaria dos Cursos de Pós-Graduação, que são parte integrante do bom funcionamento e do apoio aos alunos; ao auxílio recebido da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Brasília, Distrito Federal - Brasil) para a realização deste trabalho.

Aos auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp - Processo 2014/09480-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq – Processos 308045/2014-9 e 441464/2014-9) e Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (Fapema - Processo 00459/14) recebidos em apoio a esta pesquisa.

Ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial Santa Casa de Piracicaba, por compreender os diversos momentos em que me ausentei para cumprir deveres do mestrado.

A Deus, por me conceder saúde e permitir que eu siga colhendo os frutos do conhecimento.

EPÍGRAFE

“Todas as vitórias ocultam abdicações”

Simone de Beauvoir

RESUMO

Este estudo investigou o efeito de resveratrol (resv) na cicatrização óssea e sua influência na expressão gênica de marcadores relacionados à osteoblasto/clastogênese em ratos expostos à inalação da fumaça de cigarro. Foram criados dois defeitos críticos na calota craniana de cada rato, atribuídos como: FUM + RESV - administração diária de resv (10 mg / Kg) e exposição à fumaça (n: 20); FUM + PLA - administração diária de placebo e exposição à fumaça (n: 20) e salina - administração diária de placebo, sem exposição à fumaça (n: 20). A administração do resv associado à inalação da fumaça do cigarro ocorreu durante 30 dias. Depois, os animais foram submetidos à eutanásia. Um dos defeitos de calvária foi processado para análise histomorfométrica, o outro defeito foi recolhido para quantificação na expressão de mRNA em Bone morphogenetic protein (BMP) 2, Osteopontina (OPN), Runted-related transcription factor-2 (Runx2), Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (Lrp-5), Osteoprotegerina (OPG), Osterix (Osx), Beta Catenina -1 (β -catenina), Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1 (Dkk1) e receptor ativador de NF-KB ligand (RANKL) analisados por PCR *Real Time*. Os resultados histomorfométricos apresentaram menor remanescente de defeito na calota craniana no grupo FUM + RESV quando comparado ao grupo FUM + PLA ($p < 0,05$). A análise da expressão gênica indicou que o uso sistêmico de resv promoveu maior expressão de Runx2, ao mesmo tempo que foi detectado menor expressão gênica de Dkk1 no grupo FUM + RESV, em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$). Além disso, foi observado o aumento da expressão de Lrp-5 no grupo FUM + RESV quando comparado ao grupo placebo ($p < 0,05$) e a redução nos níveis de mRNA em RANKL / OPG foi observada no mesmo grupo em relação ao grupo FUM + PLA ($p < 0,05$). Em conclusão, o resv melhorou a reparação de defeitos ósseos críticos de calvária, modulando a expressão gênica de importantes marcadores da remodelação óssea em ratos expostos à fumaça do cigarro.

Palavras-chave: Resveratrol. Plantas. Medicinal. Cicatrização óssea. Ratos. Expressão gênica. Fumantes.

ABSTRACT

This study investigated the effect of resveratrol (resv) on the bone healing and its influence on gene expression of bone related markers of smoking rats. It were created two calvarial defects of each rat, which were assigned to: SMK+RESV - daily administration of resveratrol (10 mg/Kg) and smoke exposure (n: 20); SMK+PLA - daily administration of placebo and smoke exposure (n: 20); Saline - daily administration of placebo and no smoke exposure (n: 20). Administration of substances occurred for 30 days following surgery. Exposition to cigarette smoke inhalation was performed for 7 days before surgery and 30 days after calvarial defects creation. After, the animals were submitted to euthanasia. One of the calvarial defects was processed for histomorphometric analysis, and the tissue relative to the other defect was collected for mRNA quantification of Bone morphogenetic protein (BMP) 2, Osteopontin (OPN), Runted-related transcription factor-2 (Runx2), Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (Lrp-5), Osteoprotegrin (OPG), Osterix (Osx), β -catenin, Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1 (Dkk1) and receptor activator of NF-KB ligand (RANKL) by Real-time PCR. Histomorphometric results showed lower remained defect in SMK+RESV group when compared to SMK+PLA group ($p<0.05$). The gene-expression analysis showed lower values of mRNA of RANKL/OPG in SMK+RESV group when compared to SMK+PLAC ($p<0.05$) and reduced gene expression of Dkk1 when compared to the other groups ($p<0.05$). Additionally, higher levels of Lrp-5 was observed in non-smoking animals when compared to rats exposed to smoke inhalation, independently of resveratrol treatment ($p<0.05$). In conclusion, resveratrol optimizes the repair of critical-sized bone defects, up-regulating the gene expression of important bone remodeling markers in rats exposed to cigarette smoke inhalation, thereby highlighting its therapeutic potential for treating smoking-related bone impairment.

Keywords: Resveratrol. Plants. Medicinal. Bone healing. Rats. Gene expression. Smoking.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 CONCLUSÃO	13
REFERÊNCIAS.....	14

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo é especificado por apresentar efeito negativo frente à cicatrização óssea, sendo esta teoria apoiada por inúmeros estudos clínicos e experimentais que mostram o impacto nocivo do fumo sobre a reparação de defeitos ósseos, na consolidação óssea, regeneração óssea e no processo de regeneração pós-extração dentária (GIORGETTI et al., 2010, PATEL et al., 2013, OZKAN et al., 2014). Além disso, o tabagismo tem sido relacionado ao aumento e prevalência na gravidade de lesões peri-implantares, sendo considerado fator de risco para a perda óssea ao redor de implantes (ATIEH et al., 2013, NEGRI et al., 2016).

O impacto negativo do tabagismo sobre a cicatrização óssea está relacionado a alguns mecanismos fisiopatológicos que predispõem os fumantes à perda óssea, incluindo alterações no ativador do receptor do fator nuclear kappa-B (RANK), ativador do receptor ligando fator nuclear kappa-B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) [sistema RANK-RANKL-OPG, fatores-chave relacionados ao osso] (TANG et al., 2009) e angiogênese óssea (MA et al., 2010).

Outros estudos demonstraram que a exposição à nicotina - principalmente com doses elevadas - inibiu as expressões de genes relacionados à atividade osteogênica, como proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), colágeno tipo I alpha 1 (COL-I), cadeia de colágeno tipo I Alpha 2 (COL II), fator de crescimento transformante-β (TGF-β), fosfatase alcalina (ALP), RANKL e OPG (GIORGETTI et al., 2010, MA et al., 2011). Em consonância, Yamano et al. (2010) mostrou que o ARNm de níveis de osteoprotegerina (OPN), COL-II, a proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) e do núcleo de ligação do factor alfa-1 (Cbfa-1) aumentaram após quatro semanas de exposição dos ratos à fumaça do cigarro, se comparados ao grupo controle.

Diferentes terapias têm sido investigadas a fim de minimizar os efeitos deletérios na condição de tabagismo em relação à cicatrização óssea, estimulação de osteogênese e microcirculação e/ou modular à resposta imuno-inflamatória hospedeira. Neste contexto, Franco et al. (2013) avaliaram a regeneração de

defeitos ósseos implantados com biomaterial e estimulados pela terapia à laser de baixa intensidade em ratos submetidos ao tabagismo. De acordo com os autores, o efeito osteogênico do protocolo de laser-terapia não é suficiente para melhorar a regeneração óssea na presença do tabagismo. Assim como terapias alternativas, o impacto na utilização de compostos naturais em relação aos efeitos do fumo no reparo ósseo tem sido investigados em outros estudos.

Nos últimos anos, um dos compostos medicinais mais estudados foi o resveratrol (resv) (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), um polifenol encontrado principalmente na casca da uva e no vinho. Tem sido evidenciado pela comunidade científica que o resv apresenta um potente efeito antioxidante, antitumoral e anti-inflamatório (YAR et al., 2014), trazendo benefícios na prevenção e tratamento de algumas doenças (SCHMATZ et al., 2009, EL-MOWAFY et al., 2011). Além disso, promove efeitos benéficos sobre os marcadores inflamatórios e de *stress* oxidativo em fumantes, reduzindo as concentrações de proteína C-reativa, de triglicerídeos e aumento dos níveis de antioxidantes em fumantes, sugerindo seu papel terapêutico anti-inflamatório e antioxidante nestes pacientes alvo (BO et al., 2013). Complementando, resv tem a capacidade de inibir os efeitos deletérios do cigarro em diferentes tecidos (KURUS et al., 2009, ARCAND et al., 2013), incluindo o tecido ósseo (ANDREOU et al., 2004).

Em relação ao metabolismo ósseo, resv é capaz de estimular a formação e inibição dos processos de perda óssea e aumento na expressão gênica de Runx2 e OPN, ambos marcadores com propriedades osteogênicas (BOISSY et al., 2005). Em estudo desenvolvido por nosso grupo, houve maior expressão gênica de BMP-2, BMP-7 e OPN no tecido ósseo reparado em animais submetidos a tratamento com resv, quando comparado ao grupo placebo (CASARIN et al., 2014). Estudos recentes mostraram também que os benefícios decorrentes do resv no metabolismo ósseo podem ocorrer por meio de um aumento na sinalização da via canônica Wnt, estimulando e estabilizando células nucleares mesenquimais de β -catenina, além disso, promovem a ativação na diferenciação de células osteoblásticas (ZHOU et al., 2009, ABED et al., 2014).

Dado o potencial do resv na reparação, estímulo e inibição da perda óssea,

associado aos danos causados pelo tabagismo no tecido ósseo, é relevante investigar os possíveis benefícios deste composto natural no estímulo da reparação óssea e na presença desta condição sistêmica. Embora existam alguns dados moleculares sobre os efeitos positivos do resv em cascata imunoinflamatória e processos relacionados ao metabolismo ósseo, a influência deste composto na reparação de defeitos ósseos críticos na presença do fumo ainda não é conhecida. Espera-se que no presente estudo, possamos esclarecer a influência deste composto natural em processos de neo-formação óssea, na presença da fumaça do cigarro.

2 CONCLUSÃO

Em conclusão, a administração do resv demonstrou melhorias relacionadas à reparação em defeitos críticos de calvária e modulação nos níveis de expressão gênica ligadas ao mecanismo ósseo. Além disso, o resv apresentou significativa redução na expressão gênica de Dkk1 e RANKL / OPG. Estes resultados sugerem que a utilização crônica desta substância representa uma estratégia terapêutica útil durante os processos de reparação óssea na presença o tabagismo, desempenhando um bom prognóstico na reparação de defeitos ósseos.

REFERÊNCIAS

1. Andreou V, D'Addario M, Zohar R, Sukhu B, Casper RF, Ellen RP, Tenenbaum HC. Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke-associated hydrocarbon combined with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. *J Periodontol.*; 2004; 75(7):939-48.
2. Arcand S, Sharma K, Al-Dissi AN, Cadete VJ, Sawicki G, Weber LP. Resveratrol protects against functional impairment and cardiac structural protein degradation induced by secondhand smoke exposure. *Can J Cardiol.*; 2013; 29(10):1320-8.
3. Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM Jr, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.*; 2013; 84(11):1586-98; doi: 10.1902/jop.2012.120592.
4. Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kas- semM, Plesner T, Delaisse JM. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res.*; 2005; 65:9943-52.
5. Bo S, Ciccone G, Castiglione A. Anti-inflammatory and antioxidant effects of resveratrol in healthy smokers a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Curr Med Chem.*; 2013; 20(10):1323-31.
6. Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires PR, Ghiraldini B, Duarte PM, Ribeiro FV. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*; 2014; 43: 900-906.
7. El-Mowafy AM, Salem HA, Al-Gayyar MM, El-Mesery ME, El-Azab MF. Evaluation of renal protective effects of the green-tea (EGCG) and red grape resveratrol: role of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Nat Prod Res.*; 2011; 25(8):850-6.
8. Franco GR, Laraia IO, Maciel AA, et al. Effects of chronic passive smoking on the regeneration of rat femoral defects filled with hydroxyapatite and stimulated by laser therapy. *Injury*; 2013; 44(7):908-13.
9. Giorgetti AP, César Neto JB, Ruiz KG, et al. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*; 2010; 110:447-452.
10. Kurus M, Ugras M, Ates B, Otlu A. Apricot ameliorates alcohol induced testicular damage in rat model. *Food Chem. Toxicol.*; 2009; 47:2666-72.
11. Ma T, Tan MS, Yu JT, Tan L. Resveratrol as a Therapeutic Agent for Alzheimer's Disease. *Biomed Research International*; 2014; 350516, p 13.

12. Negri BM, Pimentel SP, Casati MZ, Cirano FR, Casarin RC, Ribeiro FV. Impact of a chronic smoking habit on the osteo-immunoinflammatory mediators in the peri-implant fluid of clinically healthy dental implants. *Arch Oral Biol.*; 2016; 70:55-61; doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.05.014.
13. Ozkan A, Bayar GR, Altug HA, Sencimen M, Dogan N, Gunaydin Y, Ergodan E. The effect of cigarette smoking on the healing of extraction sockets: an immunohistochemical study. *J Craniofac Surg.*; 2014; 25(4):e397-402.
14. Patel RA, Wilson RF, Patel PA, Palmer RM. The effect of smoking on bone healing. *Bone Joint Res.*; 2013; 2:102-11.
15. Schmatz R, Schetinger MR, Spanevello RM, Mazzanti CM, Stefanello N, Maldonado PA, Gutierrez J, Corrêa Mde C, Girotto E, Moretto MB, Morsch VM. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*; 2009; 84(11-12):345-50.
16. Yar AS, Menevse S, Alp E. The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and -2, nuclear factor kappa beta, matrix metalloproteinase-9, and sirtuin 1 mRNA expression in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. *Genetics and Molecular Research*; 2011; 10 (4): 2962-2975.
17. Zhou H, Shang L, Li X, et al. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells. *Exp Cell Res.*; 2009; 315(17):2953-62.